



TITLE:

Bile duct regeneration with an artificial bile duct made of gelatin hydrogel non-woven fabrics(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Uemoto, Yusuke

CITATION:

Uemoto, Yusuke. Bile duct regeneration with an artificial bile duct made of gelatin hydrogel non-woven fabrics. 京都大学, 2022, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2022-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24289>

RIGHT:

京都大学	博士 (医学)	氏名	上本 裕介
論文題目	Bile duct regeneration with an artificial bile duct made of gelatin hydrogel non-woven fabrics (ゼラチンハイドロゲル不織布で作製した人工胆管による胆管再生)		
(論文内容の要旨)			
<p>胆管切除術は、胆管癌や良性胆管狭窄に対する外科的治療として行われる。胆管切除後の胆道再建の標準的な術式は胆管空腸吻合術であるが、手術手技の複雑さや逆流性胆管炎など解決すべき問題がある。切除された肝外胆管の代わりに人工胆管を間置することにより生理的な胆道再建が可能となり、胆管空腸吻合術に関連するさまざまな問題が解決できる可能性がある。人工胆管の開発は、自己組織、非分解性や分解性材料を用いるなど様々試みられてきたが、臨床使用には至っていない。</p> <p>ゼラチンは、生体適合性、分解性、免疫原性に優れたコラーゲンからなる天然高分子で、ゼラチンを材料にした医療材料 (Spongel®や Gelpart®) は実臨床で使用されており、臨床応用を検討する際に有利と考えられる。本研究ではゼラチンハイドロゲル不織布 (gelatin hydrogel nonwoven fabrics [GHNF]) を材料とした人工胆管を作製し、細胞実験と動物 (ラット) への移植実験で人工胆管としての適正を評価した。</p> <p>GHNF へ組織再生に重要な細胞が浸潤してくることを評価するために、シート状の GHNF 上に線維芽細胞 (L929) 凝集体を播種する実験を行った。L929 細胞凝集体から GHNF 内部へ経時的に L929 細胞が浸潤することを GHNF 断面にて確認した。内部に浸潤した L929 細胞は Ki67 陽性であり、細胞分裂能を維持していることが明らかとなった。L929 のコラーゲン mRNA の発現は平面培養より高値であった。続いて、シート状の GHNF と同構造 (線維径、大きさ、厚み、有孔度) のシート状のポリプロピレン不織布をコントロールとして、素材による細胞生着の違いを評価した。L929 をそれぞれで培養すると、GHNF はポリプロピレン不織布と比べて、より深部まで細胞が生着しており、組織再生に有利と考えられた。GHNF を用いて、人工胆管 (artificial bile duct [ABD]) を作製した。シート状の GHNF の密度 ($0.26 \pm 0.01 \text{ mg/mm}^3$) では吻合強度が不十分だったので、ABD は高密度 ($0.73 \pm 0.03 \text{ mg/mm}^3$) にした。</p> <p>ABD を用いて L929 の浸潤評価を行い、結果はシート状と同様に経時的な細胞浸潤が確認でき、培養を 1 週間、2 週間と継続すると、細胞間にシリウスレッド陽性のコラーゲン線維が確認された。SD ラットの肝外胆管を切除後、ABD を間置し、経時的 (移植後 2、6、12 週) に胆管再生について評価した。移植後 12 週までの成長 (体重変化)、血中ビリルビン値、肝胆道系酵素値についてはコントロール群 (開腹のみ) と比較して有意な変化はみられなかった。ABD 移植部位をサンプリングし、組織学的に評価した。2 週間では残存 ABD 内部に高度な細胞浸潤がみられたが、胆管上皮の再生は見られなかった。6 週間では ABD は完全に分解され、コラーゲン組織で置換された。胆管内腔の胆管上皮の再生が見られたが、移植部位の中央付近の上皮が欠損していた。12 週間では内腔は一様に胆管上皮で被覆されていた。再生した胆管上皮は胆管上皮マーカーの CK19 を発現していた。再生過程における血管新生について免疫染色 (CD31) で評価した。2 週間時点で ABD 内部に血管が誘導され、6 週間で最大、12 週間でも正常胆管と同等の血管像を認めた。</p>			

<p>胆管上皮の再生過程を Ki67 の免疫染色で評価した。6 週間時点で陽性細胞数は最大で、特に上皮欠損の断端の胆管上皮細胞で高発現であった。胆管断端の胆管上皮細胞の分裂増殖によって胆管上皮が再生することが示唆された。</p> <p>以上の結果から GHNF で作製した ABD は胆管再生に寄与することが示唆され、人工胆管の素材として有望であると考えられる。</p>
(論文審査の結果の要旨)
<p>肝外胆管切除後の標準的な胆道再建法は胆管空腸吻合術であるが、手術手技の複雑さや逆流性胆管炎など解決すべき問題がある。生理的な胆道再建を可能にする人工胆管によって、胆管空腸吻合術の問題が解決される可能性があるが、臨床使用できる人工胆管はいまだ開発されていない。本研究では生体適合性がよいと考えられているゼラチンを素材とした不織布 (gelatin hydrogel nonwoven fabrics [GHNF]) を用いて人工胆管を作製し、細胞実験とラットへの移植実験で人工胆管としての適正を評価した。GHNF と L929 細胞を用いた in vitro の実験によって、GHNF への細胞の移動、GHNF 内部での細胞機能の維持が示された。ポリプロピレン不織布を用いた比較実験では GHNF の方がより深部まで細胞が生着しており、組織再生に有利と考えられた。ゼラチン密度を高め、有孔度の低い GHNF でも同様の結果を示した。ラットの肝外胆管を切除し、GHNF による人工胆管 (artificial bile duct [ABD]) で欠損部を置換した実験において、経時的な胆管再生が示され、ラットの成長や血清値に異常がないことが確認された。再生された胆管壁には胆管上皮の再生を認め、胆管上皮のマーカーである CK19 を発現していた。Ki67 の免疫染色にて、胆管断端の胆管上皮細胞の分裂増殖によって胆管上皮が再生することが示唆され、胆管再生の一つの知見が示された。胆管壁内には血管構造が確認された。以上の結果から GHNF で作製した ABD は胆管再生に寄与することが示唆され、人工胆管の素材として有望であると考えられる。</p>
<p>以上の研究はゼラチン不織布の有用性と胆管の再生過程の解明に貢献し実臨床化に向けた人工胆管の開発に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 10 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降