

令和元年6月25日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10066

研究課題名（和文）ブタ脱細胞化肝をbioscaffoldとした細胞充填補助肝グラフトの開発

研究課題名（英文）Development for recellularized liver graft derived from decellularized liver matrix in porcine model

研究代表者

浦橋 泰然（Urahashi, Taizen）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90277161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：実験用ブタ臓器を用いて脱細胞肝担体を作成し、分離培養した肝細胞などを経脈管的に注入して細胞充填を行い、循環培養装置へ接続して、持続灌流を行いながら脱細胞肝担体の再組織化を試みた後、作製した肝担体を実際にブタに異所性移植をおこなったところ、一部であるが、肝小葉構造および小葉内脈管構造が認められた。充填する細胞数の確保に難渋したが、細胞充填および移植可能な脱細胞肝の作製条件や肝組織の成熟に必要な組織構成細胞の必要量、ヒト臨床応用を想定した安全かつ確実な手術手技などが本研究を通して徐々に明らかになり、臓器再生のための一助となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器移植は、臓器不全に対する有効な治療法であるが、ドナー臓器の供給不足や拒絶反応も含めた様々な合併症が避けて通れない状況が続いている。近年発展を遂げている再生医療分野でも、未だ細胞・組織単位での応用が検討されている段階である。細胞から臓器単位への再生に飛躍させるためには、足場環境を「臓器単位」で確保する必要があり、本研究のような理想的な足場環境である脱細胞化技術の開発意義は大きいと思われた。また実際にヒトへの応用可能な再生臓器作出を実現させるために、臓器単位での肝再組織化を目指した本研究の成果は意義であるものであり、これを継続・発展させることが必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We report the results of a pilot study aimed at developing a human-scale whole implantable porcine liver by transplanting recellularized liver graft derived from decellularized liver matrix. Porcine livers were decellularized and the so-obtained liver scaffolds were processed to investigate the vascular patency, degree of decellularization, and scaffold biocompatibility in vitro. Whole liver scaffolds with re-seeding using hepatocytes, endothelial cells and so on were implanted in porcine to assess whether these constructs would determine their biocompatibility in vivo. The explanted recellularized liver scaffolds showed maintenance of these cells engrafted in their putative native locations within the decellularized organ and displayed a liver-like tissue in vivo. Our study shows that whole-organ liver decellularization is possible with maintenance of structure suitable to support recellularized liver tissue for a significant advancement in the bioengineering of whole organs.

研究分野：臓器移植、再生医療

キーワード：臓器移植 再生医療

1. 研究開始当初の背景

臓器移植は臓器不全に対する治療法として現時点での最終的解決策であるが、供給されるドナー不足などの問題は、未だ解決までには至っていない。一方、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療は、移植医療がもつこの2つの根本的な問題である、慢性的なドナー不足と拒絶の危険性の双方を一度に解決できる画期的な手法として大きな期待が寄せられているが、現在のところ、細胞・組織単位での臨床応用が検討されているのが現状である。臓器を新たに再構築するためには、生体細胞が長期に生着可能な、一定体積の足場を基盤とした機能的な組織再生が必須であり、さらに血管構造を有し、組織全体に行き渡る循環血流の維持が必要となることが検討されてきた。細胞から臓器単位への再生に飛躍させるためには、足場環境を「臓器単位」で確保する必要があり、近年臓器本来の三次元構造の骨格基盤のみを残したまま臓器を保存する脱細胞化技術を用いて、細胞再充填による新たな臓器創生を行う方法が注目されている。しかし実際にヒトへの応用を視野に入れた大動物レベルでの検討が報告されているが、未だ有望な結論までには至っていない。

2. 研究の目的

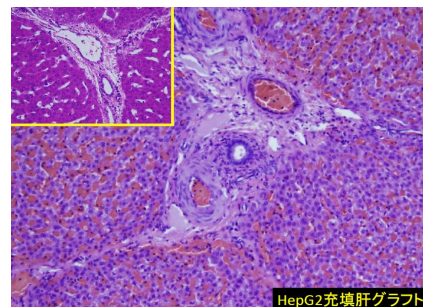
上記背景に基づき、本研究の主な目的は臨床応用可能な大動物での脱細胞臓器担体の作製および細胞充填による臓器再生を行うための基盤づくりを実現化することである。実際にヒトへの応用可能な再生臓器作出を実現させるために、臓器単位での肝再組織化を目指した。そのために実験用ブタ臓器を用いて、(1)細胞充填および移植可能な脱細胞肝の作製条件 (2)肝組織の成熟に必要な組織構成細胞の必要量 (3)肝組織再生のための細胞充填の至適方法 (4)ヒト臨床応用を想定した安全かつ確実な手術手技などの確立を主な目的とした。

3. 研究の方法

(1)実験用ブタ臓器を用いて脱細胞肝を作製し、これに(2)従来までの dish 培養を用いた細胞培養で確保したヒト肝芽腫細胞(HepG2)とブタ由来の血管内皮細胞、間葉系幹細胞などを経脈管的に注入し細胞充填を行ない、(3)循環培養装置により効率的に細胞再充填し、(4)得られた細胞充填型移植用肝グラフトをブタ生体内に移植する。免疫抑制剤投与下に術後7日間生存実験し、病理解剖などにて得られた所見を元に、上記目的達成のための方法を検討した。さらに充填細胞ソース確保のために、従来の dish 培養から浮遊攪拌培養装置を導入し、viability の高い、効率的な細胞培養方法を模索した。また肝組織再生のための細胞充填の至適方法として、循環培養装置を開発・導入し、実際に応用可能なレベルまで検討した。

4. 研究成果

実験用ブタ臓器を用いて脱細胞肝担体を作成し、分離培養した肝細胞などを経脈管的に注入して細胞充填を行い、循環培養装置へ接続して、持続灌流を行いながら脱細胞肝担体の再組織化を試みた後、作製した肝担体を実際にブタに異所性移植をおこなったところ、一部であるが、肝小葉構造および小葉内脈管構造が認められ、臓器レベルでの再組織化が可能であることが示唆された(図)。また新たに脱細胞化した腎臓に肝細胞を充填して、腎臓を再肝臓化する実験を行い、一部小葉構造を持つ肝細胞集塊が認められた。このように脱細胞化した臓器担体に細胞を再充填することにより、別臓器への再組織化にも応用できる可能性が考えられた。しかしそのためには大量の充填細胞が必要になり、従来までの dish 培養方法では、大動物実験に使用できるまでに多大な時間と労力がかかってしまっていた。その為、充填する細胞ソースの確保と至適充填方法の開発が欠かせないと判断して、これまでの方針を変更し、(1)大量の充填細胞確保のための従来の dish 培養ではなく、新たに導入した3次元浮遊攪拌培養装置を使用することで、大量培養へのスケールアップを模索した。また(2)肝組織再生のための細胞充填の至適方法に関しては、循環培養装置を作製し、これに脱細胞化担体を接続、細胞充填を行うことにより、移植前の至適細胞充填方法の検討を行った。上記(1)に関して、3次元浮遊攪拌培養として、攪拌細胞培養用バイオリアクターを用いて、HepG2 細胞の3次元浮遊攪拌培養を試みた。培養条件を調整することで、従来の dish 培養法を変わらない細胞培養が可能であり、これを大型の攪拌培養装置に応用する実験を行った。また上記(2)の循環培養装置に関しては、脱細胞肝担体に肝細胞(HepG2)を経脈管的に注入して細胞充填を行い、循環培養装置へ接続して、持続灌流を行いながら再組織化を試みた。48時間の循環培養を行なった結果、肝細胞の一部は、脱細胞担体内で集簇し、細胞塊として維持されており、さらに培養液および培養担体からアルブミン産生が認められ、灌流培養内の細胞が viable であることが考えられた。当初の目的である細胞充填および移植可能な脱細胞肝の作製条件やヒト臨床応用を想定した安



HepG2充填肝グラフト

全かつ確実な手術手技などは、本研究により十分な成果が挙げられたと思われた。また肝組織の成熟に必要な組織構成細胞の必要量や肝組織再生のための細胞充填の至適方法に関しては、3次元浮遊攪拌培養装置の導入と細胞充填のための循環培養装置を模索・改良し、現在も研究を継続中である。当初予定していた目的とは別の新たな成果が得られてきており、本研究を継続・発展させる必要があると思われた。以上より本研究を通して、脱細胞化技術を応用した細胞再充填による新たな臓器創生を行うための方法が徐々に明らかになり、臓器再生のための一助となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) 浦橋泰然、笠原尚哉、寺谷工、北山丈二、佐田尚宏、水田耕一：脱細胞化技術による再生医療：移植可能な肝臓再生への試み。特集 小児外科領域の先端的医療の展開 (): 再生医療の最前線 小児外科 49: 505-509, 2017. 【査読なし】

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 浦橋泰然、笠原尚哉、寺谷工：脱細胞化臓器を用いた移植可能な再生臓器技術の展望 「再肝臓化」した肝および腎グラフトの開発を中心に。(一般口演) 第116回日本外科学会定期学術集会 大阪 2016年4月16日
- 2) 浦橋泰然、笠原尚哉、寺谷工：「腎臓を肝臓化する試み」ブタ臓器脱細胞化技術を用いた肝細胞充填腎グラフトの開発。(一般口演) 第15回日本再生医療学会総会 大阪 2016年3月19日
- 3) 浦橋泰然、笠原尚哉、小林英司、寺谷工：脱細胞化臓器は別機能を持った新たな臓器と変わり得るか？ ブタ臓器脱細胞化技術を用いた肝細胞充填肝グラフトおよび腎グラフトの開発 第115回日本外科学会定期学術集会 シンポジウム 名古屋 2015年4月18日

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：笠原 尚哉

ローマ字氏名：Kasahara Naoya

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：50382891

研究分担者氏名：寺谷 工

ローマ字氏名：Teratani Takumi

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 70373404

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。