

令和元年6月11日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10586

研究課題名(和文)ミニチュアヒト肝臓を用いた肝癌の浸潤・転移機序解明による革新的肝癌治療の開発

研究課題名(英文)Development of innovative treatment for liver cancer by elucidation of mechanism of invasion and metastasis liver cancer using miniature human liver

研究代表者

山下 洋市 (YAMASHITA, Youichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任准教授

研究者番号：00404070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラット摘出肝へのトリトンXの門脈還流により精緻な脈管構造を維持した脱細胞鋳型肝臓の作成に成功した。新しく人工肺装置を循環回路に組み込む事で最大2日間のex vivo還流培養を可能とした。ヒト初代培養肝細胞の採取プロトコルを確立し、肝動脈から播種・灌流培養する方法で類洞様構造を持つミニチュアヒト肝臓を創生した。遺伝子導入によりヒト初代培養肝細胞の不活化を実現したが肝特異機能が1/10に低下していた。還流回路にキーエンスを組み込み、循環する癌細胞を可視化する事に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミニチュアヒト肝臓の創生と高酸素供給を実現したその還流培養法の確立は、現在培養細胞で代替的に行われている新規薬物の毒性試験へ応用できる可能性がある。また、スケールアップする事で、ヒトの肝臓を創生する事が可能となり、移植グラフトなどへ応用できる可能性がある。初代培養を不活化する事で、スケールアップの際に最も問題となる細胞量の確保を克服できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in creating a decellularized liver maintaining a fine vasculature by portal vein infusion of Triton X to rat liver. By newly incorporating an artificial lung device into the circulation circuit, ex vivo culture was possible for up to 2 days. A protocol for collection of human primary hepatocytes was established, and a miniature human liver having like a sinusoid structure was created by seeding from the hepatic artery and ex vivo circulation culture. Immortalization of human primary culture hepatocytes was achieved by gene transfer, but the liver specific function was reduced to 1/10. We succeeded in visualizing circulating cancer cells using Keyence system in this circulatory circuit.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：ミニチュアヒト肝臓 脱細胞鋳型肝臓 ヒト初代培養肝細胞 不活化ヒト肝細胞 ex vivo還流培養 浸潤・転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移に関する研究は、細胞株を用いた *in vitro* の研究やマウスなどの小動物を用いた *in vivo* の実験を行う事で一定の成果を挙げてきたが、詳細な動的メカニズムの解明には、臓器中の癌を経時的にトレースおよびサンプリングして評価する必要がある。

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; HCC) は、『経門脈的に転移する』とされてその治療方針も決定されているが、一部血流に逆らったこの転移形式は不可思議な点もあり、尚且つそれを裏づける分子生物学的エビデンスは皆無であるのが現状である。

### 2. 研究の目的

再生医工学 (医工連携研究) によりミニチュアヒト肝臓を *ex vivo* で構築する。ラット脱細胞鋳型肝臓をスカフォードに肝切除症例より得たヒト初代培養肝細胞・ヒト初代培養胆管細胞、および HUVEC 株を経脈管的 (経門脈や経肝動脈) に播種し、*ex vivo* で可能な限り長期間還流培養する。これにヒト HCC 細胞株 (Hep G2、Huh 7、HLE など) を播種 (肝表から接種) して HCC の浸潤・転移を経時的にトレースおよびサンプリングして、そのメカニズムを明らかにする。GFP 導入 HCC 細胞株を用いた蛍光リアルタイムイメージングにて癌の動的傾向を評価し、循環回路中に漏れ出てくる Cancer Front を構築する細胞群の特徴を FCAS scan など解析する。得られた知見は HCC の Cancer Front に対する標的治療の開発に繋がる可能性がある。また、ミニチュアヒト臓器の創生は、そのものが新しい薬剤代謝スクリーニングキットにも応用できる。このようなミニチュアヒト臓器を用いた癌研究は広範な癌種に応用可能な、新しく強力な研究ツールの開発に繋がる可能性がある。

### 3. 研究の方法

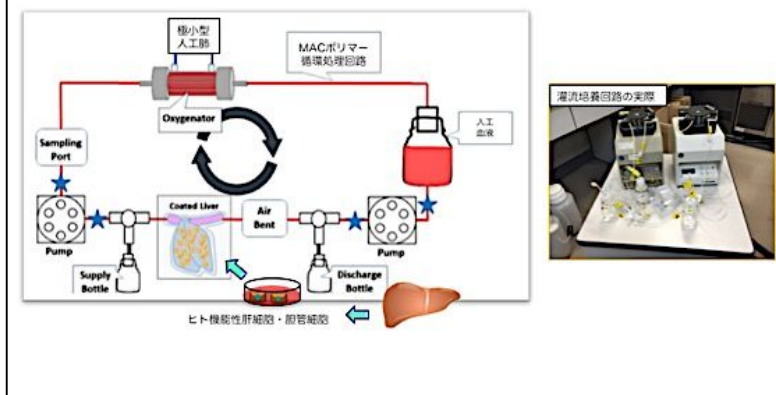
可能な限り精緻なラット脱細胞鋳型肝臓を得るプロトコルを確立する。このラット脱細胞鋳型肝臓をスカフォードとして、ヒト初代培養肝細胞、ヒト iPS 細胞由来分化肝細胞、不死化ヒト初代培養肝細胞などヒト由来肝細胞を播種する。人工肺や人工血液を組み込んだ高酸素供給を可能にした *ex vivo* 還流培養回路を新たに作製し、長期間 (目標は7日間) 還流培養する事で、「類洞形成」など高い組織構築を実現できるミニチュアヒト肝臓を創成する。このミニチュアヒト肝臓にエレクトロポレーション法で GFP 遺伝子を導入したヒト HCC 細胞株を肝表から播種して、GFP 蛍光リアルタイムイメージングを用いて HCC 細胞株を経時的にトレースして、HCC の浸潤・転移メカニズムを解明する。また、循環回路中に漏れ出てくる細胞群は全身循環に出現する「Cancer Front を形成する細胞群」と考えられるため、それらを FACS SCAN で採取して、細胞表面マーカーなど分子生物学的特徴を明らかにし、HCC の「Cancer Front」を target とした革新的治療を開発する。

### 4. 研究成果

ラット摘出肝へ緩衝液であるトリトン X を門脈還流する事により従来の方法より精緻な脈管構造を維持した脱細胞鋳型肝臓の作成に成功した。新しく極小型人工肺装置を作製し、それを循環回路に組み込む事で、最長2日間の *ex vivo* 還流培養が可能となった (図1)。

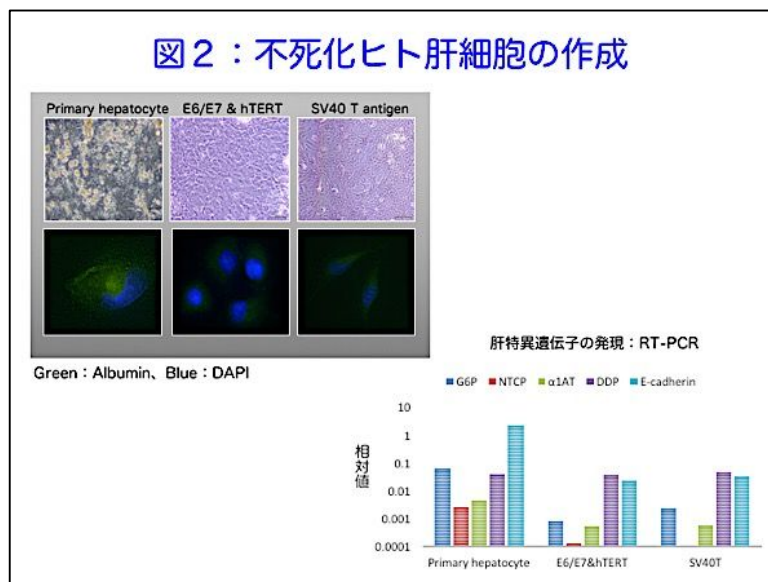
図1：ミニチュアヒト肝臓の *ex vivo* 還流培養

高酸素供給を可能にする灌流培養回路の模式図



病院倫理委員会からの承認を受け、肝切除臨床検体から、それぞれ 80%を越える高収率・高生存率を実現するヒト初代培養肝細胞の採取プロトコルを独自に確立し、そのヒト初代培養肝細胞を、ラット脱細胞鋳型肝臓の肝動脈から播種・灌流培養する方法で、組織学的に類洞様構造を持つミニチュアヒト肝臓の創生に成功した。このミニチュアヒト肝臓は、ex vivo 培養 2 日間に渡ってアルブミンを回路内に分泌する事を実証した。

ヒト初代培養胆管細胞の採取に関しては、まだ高収率・高生存率を実現できておらず、安定した採取を実現できるプロトコルを現在検討中である。不死化ヒト初代培養肝細胞の樹立に関しては、レンチウイルスを用いて、SV40 遺伝子や、テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子を導入する事で、増殖能を持つ不死化ヒト初代培養肝細胞株の樹立に成功した。しかし、肝特異遺伝子 (G6P, NTCP,  $\alpha$ 1AT, DDP, E-cadherin など) の発現を定量的 RT-PCR で評価したところ、ほぼ全ての遺伝子の発現が、ヒト初代培養肝細胞 (親株) と比較すると 1/10 以下に低下していた (図 2)。



ヒト HCC 株 (Hep G2 と Huh 7) にエレクトロポレーション法で GFP と GNP 遺伝子を導入して蛍光発色させた。GFP/GNP 導入 HepG2 を ex vivo 還流回路で循環させ、その回路内にキーエンスを組み込み、循環する Hep G2 を可視化する事に成功した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sakamoto H, Shirakigawa N, Bual RP, Fukuda Y, Nakamura S, Miyata T, Yamao T, Yamashita Y, Baba H, Ijima H. A novel evaluation system for whole-organ-engineered liver graft by ex vivo application to a highly reproducible hepatic failure rat. Journal of Artificial Organs 2019 May 10. doi: 10.1007/s10047-019-01106-6. [Epub ahead of print] (査読あり) .

〔学会発表〕(計 8 件)

白木川 奈菜, 坂本 裕希, 趙 宰庸, 山尾 宣暢, 宮田 辰徳, 山下 洋市, 馬場 秀夫, 井嶋 博之. 「医工連携による移植用肝臓構築を目指して」. 第 4 回 TR 推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会.九州大学医学部百年講堂 (福岡県) . 2016 年.

白木川 奈菜, 坂本 裕希, 山下 洋市, 吉住 朋晴, 馬場 秀夫, 前原喜彦, 井嶋 博之. 「臓器工学的ラット肝グラフトの性能評価」. 第 52 回九大生体材料・力学研究会.九州大学医学部百年講堂 (福岡県) . 2016 年.

坂本裕希, 中村俊介, 趙宰庸, 白木川奈菜, 山尾宣暢, 宮田辰徳, 山下洋市, 馬場秀夫, 井嶋博之. 医工連携による臓器工学的ラット肝グラフトおよびその評価系の開発. 第16回日本再生医療学会総会. 仙台国際センター(宮城県). 2017年.

吉田梢, 近藤美香, 中村俊介, 坂本裕希, 白木川奈菜, 水本博, 宮田辰徳, 山尾宣暢, 中尾陽佑, 山下洋市, 馬場秀夫, 井嶋博之. 「灌流型臓器保存システムの提案とその温度依存性の検討 2018年」. 第55回化学関連支部合同九州大会. 2018年.

Fukuda U, Cho J, Sakamoto H, Shirakigawa N, Yamao T, Miyata T, Yamashita Y, Baba H, Ijima H. 「Development of miniature human liver with mouse decellularized liver」. 5th TERMIS World Congress 2018(国際学会). 2018年

福田 有嘉子, 坂本 裕希, 白木川 奈菜, 宮田 辰徳, 山尾 宣暢, 山下 洋市, 馬場 秀夫, 井嶋 博之. 「臓器工学的的手法によるミニチュアヒト肝臓構築に向けた基礎検討」. 第54回九大生体材料・力学研究会. 2018年.

井嶋 博之, 福田 有嘉子, 坂本 裕希, 白木川 奈菜, 宮田 辰徳, 山尾 宣暢, 山下 洋市, 馬場 秀夫. 「スクリーニングモデルとしてのミニチュアヒト肝臓構築に向けた試み」. 日本動物実験代替法学会. 2018年.

井嶋 博之, 福田 有嘉子, 中田 捷太, 貫島 匡生, 坂本 裕希, 白木川 奈菜, 宮田 辰徳, 山尾 宣暢, 中尾 陽佑, 山下 洋市, 馬場 秀夫. 「脱細胞化肝臓を鋳型とした再細胞化肝グラフトの機能性評価」. 第18回日本再生医療学会総会. 2019年.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 井嶋 博之

ローマ字氏名: IJIMA Hiroyuki

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 工学研究院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10274515

研究分担者氏名: 辻田 英司

ローマ字氏名: TSUJITA Eiji

所属研究機関名: 独立行政法人 国立病院機構 福岡東医療センター

部局名: 外科

職名: 医長

研究者番号(8桁): 20389414

研究分担者氏名: 相島 慎一

ローマ字氏名: AISHIMA Shinichi

所属研究機関名: 佐賀大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 70346774

研究分担者氏名: 白木川 奈菜 平成30年9月30日付けで退職

ローマ字氏名：SHIRAKIGAWA Nana

所属研究機関名：九州大学

部局名：工学研究員

職名：助教

研究者番号（8桁）：90724386

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。