

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08701

研究課題名（和文）生体由来3次元スキヤフォールドを用いた再生肝臓による生存率改善とECM解析

研究課題名（英文）Improvement of survival rate and ECM analysis using bio-engineered liver derived 3D scaffold

研究代表者

福光 剣（Fukumitsu, Ken）

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：70700516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓より作製した脱細胞化組織を用いて内部に細胞を生着（再細胞化）させ、培養液を循環させる方法を応用し、ラットの血液を循環させる方法を確立、本システムを用いて抗血小板作用を有するポリマーを新たに開発した。また、胆管の再構築において、生体の肝臓より採取し培養したorganoidを用いることにより、in vitroで増殖・凍結保存させることができる細胞を用いることで、胆管上皮細胞を必要な時に必要な量を確保できることとなった。これにより、人工肝臓の作製においてこれまで困難であった血液還流時の血栓形成の抑制、胆管の再構築が技術的に可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器不全に対する移植医療は、依然としてドナー不足という深刻な問題を抱えており、肝不全に対する脳死、生体肝移植が広く行われるようになったにも関わらず、ドナー不足のため多くの患者が待機した状態のままで亡くなっている。移植可能な肝臓をin vitroにおいて人工的に作製することは、肝不全の患者の治療機会の増加となる。また、リスクを背負って生体ドナーとなる方の身体的、心理的負担から解放されることに繋がり、より安全な医療へ貢献することとなる。これまで、解決できなかった2つの課題について、解決策となる研究成果であり、今後は臨床応用に向けてさらに発展させていかなければならない。

研究成果の概要（英文）：We established a method for circulating rat blood by using decellularized tissue prepared from rat liver to allow cells to attach and grow inside (recellularization). And using this culture system, we developed a method to circulate rat blood into the decellularized liver and a new polymer with anti-platelet activity. In addition, we developed the reconstruction system of bile duct. By using organoids harvested and cultured from livers, we were able to secure the necessary amount of bile duct epithelial cells when needed. This made it technically possible to reduce thrombus formation during blood perfusion and reconstruct bile ducts, which had been difficult in the past in the fabrication of bio-artificial livers.

研究分野：再生医学

キーワード：脱細胞化 細胞外基質 胆管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

臓器不全に対する移植医療は、依然としてドナー不足という深刻な問題を抱えており、肝不全に対する脳死、生体肝移植が広く行われるようになったにも関わらず、ドナー不足のため多くの患者が待機した状態のままで亡くなっている。

近年 Tissue Engineering の技術進歩に伴い、生体臓器由来の脱細胞化組織を 3 次元スキャフォールドとして用いて様々な臓器を *in vitro* で作製することが試みられている。2010 年、肝臓において脱細胞化および再細胞化した肝臓を作製したとの報告がなされた。具体的には、臓器に界面活性剤を還流して細胞成分のみを除去して ECM を 3 次元構造を保持したまま残存させ (脱細胞化) その 3 次元 ECM を足場として新たな細胞を注入し定着させることで臓器の組織構造を再構築する事ができる (再細胞化)。この脱細胞化組織を用いた研究は以下の 3 段階に分ける事ができ、それぞれの段階で技術革新を求められている。

まず、Decellularization (脱細胞化) に関しては、界面活性剤を門脈から還流することで細胞成分のみが除去されるが、プロトコールは十分に確立されていない。細胞成分除去のための物理的な細胞膜破壊方法 (凍結や振動など) 界面活性剤の種類や PH、最終的な滅菌方法など、技術的な改善点は多岐にわたる。

次に、Recellularization (再細胞化) に関しては、肝臓は多種多様な細胞で構成されており、その立体構造も複雑かつ精密である。細胞の投与経路としては門脈、胆管、静脈の各脈管の他、実質腔に直接注入する方法も検討されている。いずれも一長一短あり、細胞腫によってもおそらく異なることが想定される。また細胞を注入した後の培養方法もまだ十分ではない。門脈から培養液を環流するが、培養液の組成だけでなく、流速、感染予防方法など解決すべき課題は多い。さらに、肝細胞や血管内皮細胞はある程度入手が容易であるが、胆管上皮細胞については、初代培養細胞の採取が困難であるうえに、適切な細胞株も存在せず、胆管構造の再構築は細胞源の入手が限られているため、未だ報告はない。

最後に、Implantation (移植) について、*in vitro* で作製した臓器は最終的に体内へ移植されることを目的としている。移植した際に問題となるのが、まずは血小板沈着による血栓形成である。脱細胞化組織は細胞外基質が露出しているため、血小板の沈着、凝集反応が起こり、容易に血栓形成が起こり、血流障害を来す。また、細胞外基質の液体の透過性が高いため、血液が臓器表面から漏出することや、血管壁が脆弱なことによる吻合の技術的な難しさも加味されなければならない。

この脱細胞化組織を用いた Bio-Engineered Liver に関する研究は、2010 年に上記論文が発表された後は、ヒトの細胞や大動物を用いた報告など、ヒトへの臨床応用を高く意識した研究報告が多い。しかし、作製した臓器にまだ移植可能な臓器として十分な組織構築と機能を再現できていない、移植時の出血と血栓形成コントロールが不十分であるなど、未解決の課題が依然として多いにも関わらず、移植可能な人工臓器作製の課題解決に向けて具体的な問題点は未だ解決されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで作製・改良してきた Bio-Engineered Liver について、生体に移植した際により高い機能を発現するための課題を解決することである。具体的な課題として、

- (1) 血液還流の際に血小板が沈着し血栓が形成され、血液還流障害が発生する。この血栓形成を予防するための方法を開発し、その有効性、安全性について評価する。
- (2) 胆管について、新しい細胞源を開発し、*in vivo* においてどの程度機能するかを評価する。

これらを達成することで、将来、ヒトに移植可能な人工再生臓器を実現するための課題解決につなげる。

3. 研究の方法

1. 血液還流システムの構築および血栓形成の評価

肝障害ラットの頸動脈に脱血管を挿入して Bio-Engineered Liver の門脈に接続、肝臓内を血液が循環した後に IVC に接続した送血管を通してラット経静脈へ返血する実験系を確立する。血栓形成抑制目的に Bio-Engineered Liver に血管内皮細胞や類洞上皮細胞を生着させるだけでなく、抗血栓形成作用を持つポリマーあるいは抗血小板抗体を用いる。ポリマーの開発は、東京大学との共同研究により開発を進める。組織学的評価として、肝細胞の *viability*、parenchymal space への移動率、血栓形成の程度を評価し、Bio-Engineered Liver が最も効率よく機能するために必要な細胞数、ポンプの流速、血栓形成予防に必要な薬剤の濃度などについて適正な条件を

定める。これらのデータに基づき、肝障害モデルラットに対して、脱細胞化組織を用いた肝臓組織を用いることで救命率向上に寄与するかを評価する。

2. 胆管構造の再構築

生体肝臓より摘出した肝臓組織より organoid を作製し、in vitro で spheroid を形成することにより、肝細胞と胆管上皮細胞の双方向への分化能を有する細胞を用いる。この細胞を、肝実質と胆管腔内に生着させ、これらの細胞の挙動を解析する。

4. 研究成果

肝臓より作製した脱細胞化組織を用いて内部に細胞を生着（再細胞化）させ、培養液を循環させる方法を応用し、ラットの血液を循環させる方法を確認した。脱血した血液はそのままでは血液凝固反応が迅速に起こることで回路が閉塞してしまうため、少量の抗凝固剤を混和することで、血小板の機能を維持しながら血液循環を維持することとした。血栓形成の抑制については、抗血小板作用を有するポリマーを東京大学との共同研究により新たに開発した。既に人工心臓に應用されているポリマーの一部を改変することで、生体に適合性を持たせ、かつ安全性を担保したポリマーを新たに合成した。本新規ポリマーを用いて、血液還流後に血小板の沈着を評価したところ、ポリマーでコーティングされている部位は血小板の沈着が著明に抑制され、血液還流がスムーズになった。またそれに伴い、肝細胞の機能も向上することが示された。毒性試験についても、本ポリマーが肝細胞の生着率や生存率を障害することはないことを示した。この新規ポリマーは、人工再生肝臓を生体に移植する際の血栓形成の抑制に寄与すると期待される。

また、再細胞化する際の細胞源として、通常は成熟した細胞もしくは幼若な前駆細胞に変えて、肝細胞の系統と胆管上皮細胞への系統の 2 方向へ分化する幹細胞の性質を有する細胞群を用いた。この多分化能を有する細胞はスフェロイド培養にて増殖させ、脱細胞化組織内の胆管構造の内側に生着させたのち数日間培養した。この胆管上皮細胞は、胆管のもつ基本的なマーカーを発現していることが示された。また、共焦点顕微鏡において立体構造を確認したところ、短管腔内を裏打ちするように細胞が生着して、管腔構造を形成していることを確認した。さらに、機能的解析においても胆管上皮細胞が有するポンプ機能を再現していることが確認できた。この胆管上皮細胞と肝細胞をともに再細胞化したところ、形態学的にはこれらの細胞が接して配置しており、形態学的には肝細胞と胆管上皮細胞を互いに存在している組織像を再構築することが可能となった。

胆管上皮細胞は採取だけでなく培養も難しく、再生肝臓の応用に用いるにあたり技術的に困難であったが、本技術を用いることで、in vitro で増殖させた後に脱細胞化組織に生着させ、組織内で成熟化させることで、必要な時に必要な数の胆管上皮細胞を入手できることとなった。これにより、人工肝臓の作製においてこれまで困難であった胆管の再構築を比較的安価で大量の細胞源を確保できる技術が確立できる見込みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kojima H, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Ogiso S, Miyauchi Y, Yamaoka R, Kawai T, Katayama H, Yoshitoshi-Uebayashi EY, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Komori J, Uemoto S.	4. 巻 18
2. 論文標題 Establishment of practical recellularized liver graft for blood perfusion using primary rat hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Transplant.	6. 最初と最後の頁 1351-13559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajt.14666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahito Minami, Takamichi Ishii, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Satoshi Ogiso, Yuya Miyauchi, Hidenobu Kojima, Takayuki Kawai, Ryoya Yamaoka, Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Maki Kotaka, Katsutarō Yasuda, Kenji Osafune, Shinji Uemoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative therapy	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 福光 剣	4. 巻 51
2. 論文標題 生体に移植可能な臓器作製～ドナー不足解消に向けて～	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 204-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka R, Ishii T, Kawai T, Yasuchika K, Miyauchi Y, Kojima H, Katayama H, Ogiso S, Fukumitsu K, Uemoto S	4. 巻 4
2. 論文標題 CD90 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with lymph node metastasis and poor prognosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 664-674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.25192	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 福光剣
2. 発表標題 The three-dimensional custom-made liver model for the contribution to the surgical safety
3. 学会等名 The 6th Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福光剣
2. 発表標題 再生医学と組織工学に基づく移植ドナー不足解消への試み
3. 学会等名 日本外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福光剣
2. 発表標題 Proposal of a new criterion for the resection of hepatocellular carcinoma: the ALPlat criterion
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福光剣
2. 発表標題 生体肝移植において腎機能障害が予後に与える影響についての検討
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福光 剣
2. 発表標題 再生医療と組織工学に基づく、ドナー不足解消を目指した細胞移植と臓器作製
3. 学会等名 日本肝移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福光 剣
2. 発表標題 細胞移植から臓器作製へ
3. 学会等名 日本肝移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福光 剣
2. 発表標題 手術の安全性向上における 3次元肝臓模型の有効性に関する検討
3. 学会等名 日本臨床外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenobu Kojima, Takamichi Ishii, Ken Fukumitsu, Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Shinji Uemoto
2. 発表標題 Vascularization of recellularized liver graft
3. 学会等名 8th International Forum of Liver Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidenobu Kojima, Takamichi Ishii, Ken Fukumitsu, Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Shinji Uemoto
2. 発表標題 Impact of endothelial cells on the engineered liver recellularized with primary rat hepatocytes
3. 学会等名 13th IHPBA World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidenobu Kojima, Takamichi Ishii, Ken Fukumitsu, Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Shinji Uemoto
2. 発表標題 Endothelialized liver scaffold-the impact of endothelial cells on recellularized liver-
3. 学会等名 第30回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島秀信、石井隆道、福光 剣、大島 侑、川本浩史、南 貴人、宮内雄也、山岡竜也、河合隆之、上本伸二
2. 発表標題 再細胞化肝臓における内皮化の効果
3. 学会等名 第54回肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島秀信、石井隆道、福光 剣、小木曾 聡、友藤克博、伊藤 孝、大島 侑、川本浩史、南 貴人、宮内雄也、上本伸二
2. 発表標題 脱細胞化骨格を用いた肝臓再生の試み
3. 学会等名 第21回日本異種移植研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南 貴人, 宮内 雄也, 小島 秀信, 大島 侑, 川本 浩史, 山岡 竜也, 河合 隆之, 上林 エレーナ 幸江, 安田 勝太郎, 福光 剣, 石井 隆道, 岡島 英明,
2. 発表標題 ヒトiPS由来肝細胞様細胞とラット脱細胞化肝臓骨格を用いた臓器作製
3. 学会等名 第20回日本異種移植研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福光剣、
2. 発表標題 当院における生体肝移植ドナーの適格基準
3. 学会等名 日本肝移植研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ken Fukumitsu, Siyuan Yao, Kojiro Taura, Takamichi Ishii, Satoru Seo, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, Shinji Uemoto
2. 発表標題 The significance of mapping biopsy to secure the surgical margin
3. 学会等名 肝胆膵外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福光剣、石井隆道、南貴人、瀬尾智、田浦康二郎、岡島英明、海道利実、上本伸二
2. 発表標題 The problem of custom-made liver model for navigation and our improvement
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福光剣、穴澤貴行、伊藤孝司、八木真太郎、加茂直子、秦浩一郎、山敷宣代、岡島英明、海道利実、上本伸二
2. 発表標題 当院における維持透析症例の生体肝移植成績
3. 学会等名 日本移植学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Satoshi Ogiso, Takahito Minami, Satoru Seo, Kojiro Taura, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, Shinji Uemoto
2. 発表標題 The three-dimensional custom-made liver model for the contribution to the surgical safety
3. 学会等名 The 6th Kansai-Yeungnam HBP Surgeons Joint Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福光剣、石井隆道、小木曾聡、安近健太郎、大島侑、川本浩史、南貴人、宮内雄也、小島秀信、岡本晋弥、岡島英明、海道利実、上本伸二
2. 発表標題 再生医学と組織工学に基づく移植ドナー不足解消への試み
3. 学会等名 日本外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Satoru Seo, Kojiro Taura, Hideaki Okajima, Toshimi Kaido, shinji Uemoto
2. 発表標題 Analysis of PTPE/TIPE from the point of view of surgical complication
3. 学会等名 13th IHPBA World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上本 伸二 (Uemoto Shinji) (40252449)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	石井 隆道 (Ishii Takamichi) (70456789)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	
研究分担者	河合 隆之 (Kawai Takayuki) (00813867)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	小木曾 聡 (Ogiso Satoshi) (10804734)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------