

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19592

研究課題名（和文）移植可能な真の代替肝臓の開発を目指した胆汁産生と排泄機能復元への挑戦

研究課題名（英文）Bile Duct Regeneration for Transplantable Functional Liver Graft

研究代表者

八木 洋（Yagi, Hiroshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：20327547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：肝臓の再生機序を理解する上で、立体的な胆管構造と胆汁の産生・排泄機能の再構築は必須の課題であるが、複雑な三次元構造と細胞同士の相互関係を復元することは非常に困難である。我々は脱細胞化肝臓骨格内の立体構造を利用することで胆管の再生を目指した研究を進めてきた。本研究成果によって、脱細胞化骨格が持つ立体構造を利用することで、これまで困難であった三次元胆管構造の再生への道筋が示された。また成熟細胞はもとより、肝前駆細胞単独での機能的胆管再生の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

本研究はこれまで肝臓再生研究の最大の障壁となっていた「胆汁産生と排泄」機能をもった肝臓を、ヒトiPS細胞とブタ由来の臓器骨格を用いることで実現しようとする非常に挑戦的な研究である。本研究成果は、世界初の胆汁産生を伴う肝臓再生の実現化はもちろん、今後の臓器再生における極めて斬新な研究ツールへの発展、あるいは体内における肝再生の新たな基礎的知見の創出に繋がり、最終的にヒトiPS細胞を用いた再生肝臓が創出されれば、今後の医療を大きく変える代替臓器開発に大きな布石となり得る。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed implantation of the engineered graft with a large number of human iPS cell derived multiple cell types into the pre-clinical porcine model inducing immune-deficient, by the nation-wide collaboration work. Importantly, the work includes the validation of the production process, the establishment of the safety evaluation criteria for the product by the proteomics analysis as well as the bile duct regeneration. These effective collaborations of medicine and engineering approach will successfully provide the novel technology for large-scale organ reconstruction with bile production and novel therapeutic option for end-stage liver disease.

研究分野：移植外科

キーワード：脱細胞化 臓器再生 胆管再生 肝臓移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表者は2008年から米国で肝細胞の保存・培養の基礎的技術を学んだ後、ラットの肝障害を是正する幹細胞を用いた新しいタイプの人工肝臓を開発した (Tissue Eng Part A 2008)。更に究極の人工肝臓とも言える臓器骨格を足場に用いた再生肝臓についての研究を開始し、脱・再細胞化及びラットへの移植を成功させて Nat Med 誌に発表し (Nat Med, 2010)、その技術を元に立体臓器培養技術を提案し米国で共同特許を取得した。その後本学に帰室し、2011年から「科研費若手 A」の補助によって世界初となる脱細胞化技術の大動物へのスケールアップを実現し (Cell Transplant 2013)。この結果を元に2013年から「AMEDの再生医療実現拠点ネットワーク事業」の採択を受け大動物の臓器骨格に大量の細胞を充填する手法や安全かつ効果的に移植する技術を世界に先駆けて開発した (Transplant Plenary, AASLD 2016, Keynote Lecture, ATW 2016)。この研究によってブタ/ヒト iPS 細胞由来の肝細胞と血管内皮細胞を充填した肝臓骨格を移植した結果、再生肝臓中に胆汁産生細胞を認める画期的な成果を創出した。一方これまで長年に渡って世界的に肝再生研究が進められたにも関わらず、未だに胆汁産生・排泄の実現化は成されず、黄疸を治癒し得る代替肝臓の作製は達成されていない。肝臓を臓器として再生させる意味で一步先んじている我々の技術もこのままでは胆汁排泄ルートがないため、胆汁うっ滞性肝障害によって機能を失うことが予想される。そこで今回、生体由来の臓器骨格が複数の異なる細胞を注入しても本来の場所に生着して機能する優れた特性を持つことから、胆管上皮細胞を胆管骨格から注入すれば胆管壁に生着して胆汁排泄ルートが確保され、これまで実現しなかった代替再生肝臓の実現化が夢ではないと考え、本研究申請に至った。

2. 研究の目的

本研究は、肝臓再生実現化の最大の障壁である「胆汁産生と排出」機能を備えた、真の再生肝臓の作出を目的とし、これまで我々が開発してきた生体臓器由来の脱細胞化した骨格構造に細胞を再充填するノウハウを生かし、ブタ由来の胆管上皮細胞および最終的にヒト iPS 細胞由来の主たる肝臓構成細胞 (肝細胞、胆管上皮細胞、血管内皮細胞) を再充填・生着させ、独自開発した立体臓器培養装置内部で循環培養し機能評価した上で、ブタ肝障害モデルに移植し、1ヶ月に渡り再生肝臓の胆汁排泄を含めた再生肝臓としての機能を総合的に評価する。

3. 研究の方法

(1)ブタ肝臓から分離した胆管上皮細胞およびヒト iPS 細胞由来の肝構成細胞を肝臓骨格へ充填し体外循環下で評価する。理工学部の須藤ら、東京大学の宮島らの協力の元、ブタ肝臓およびヒト iPS 細胞から分離・分化させた胆管上皮細胞を、脱細胞処理した骨格に残存する胆管構造から注入し、他の肝構成細胞と共に三次元循環培養装置内で培養し、内部構造や胆汁酸産生能を経時的に評価する。

(2)ブタ肝臓骨格とブタ細胞で作製した再生肝臓を肝障害ブタに移植し、機能を評価する
研究項目 1 で作製した三種類の分離細胞を充填した肝臓を特許出願した肝障害ブタモデルに移植し、胆汁産生能を含めた体内での成熟化を経時的に観察する。

(3)ヒト iPS 細胞から分化誘導した胆管上皮細胞を用いて再生肝臓を作製し肝障害ブタに移植後、機能を評価する。研究項目 2 の充填細胞をすべてヒト iPS 細胞由来の肝構成細胞に置き換え、肝障害ブタモデルに胆管・血管吻合を施して移植し、体外に誘導した胆管カテーテルからの胆汁産生・排泄の直接的評価など臨床病理学的にヒト iPS 細胞を用いた再生肝臓の機能を総合的に評価する。

4. 研究成果

(1)胆管上皮細胞の単離技術の確立

本検討は研究協力者である慶應義塾大学理工学部の須藤らの技術協力の元行なった。ラット肝臓門脈からコラゲナーゼを還流させて胆管構造のみを抽出し、Bile duct tree を得た (図 1A, B)。Bile duct tree を mince しコラゲナーゼによる処理を行い胆管上皮細胞を単離した (図 1C)。

単離された胆管上皮細胞は細胞数 1.0×10^6 個、viability 80%以上を目標としたが、初期の実験では目標値を達成できなかったため、技術検討を行い、①門脈の細分枝を処理し、トリプシンの漏れを防止し末梢のトリプシン循環効率を向上、②トリプシンの還流時間およびその後の Bile duct tree を得るまでの手技時間を短縮しトリプシンへの胆管上皮細胞の暴露時間を軽減、③mince 時の圧座による細胞損傷を防ぐため器具と mince 手技を改良することで、目標値を達成した。

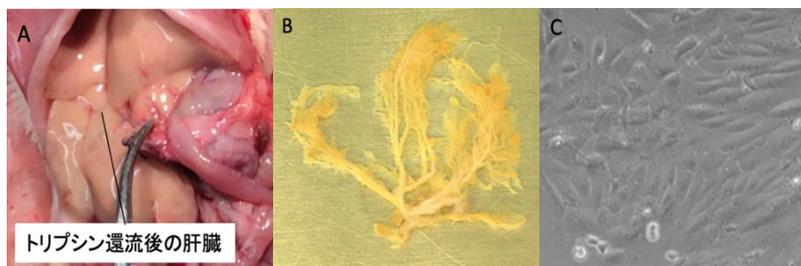
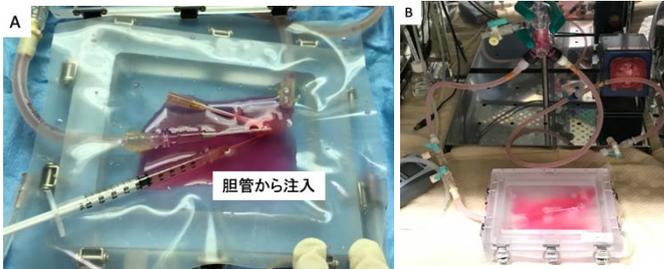


図 1. ラット肝臓からの胆管上皮細胞の単離

(2) 胆管上皮細胞を用いた注入・循環培養試験

1 の手順で単離した新鮮胆管上皮細胞を脱細胞化骨格内へ注入および循環培養するための至適条件を検討した。細胞注入は全て胆管から行い(図 2A)、希釈濃度は $1.0 \sim 5.0 \times 10^6 / \text{mL}$ に調整した。検討条件は循環培養経路、循環培養速度とし、循環培養装置(図 2B)内で 3 日間循環培養を行った後 HE 染色によって細胞の形態および分布を確認した。まず、循環培養経路については経門脈的循環と経胆管的循環について検討した。その結果、経門脈的循環では速度によらず胆管内に注入した細胞は脱核し管腔内に生着した所見は認められなかった。続いて、経胆管的循環による検討を行なった。0.5 mL/min の低速で循環培養を行なったところ、脱核の所見は認めなかったが細胞が間質へと浸潤拡散する所見が認められた。続いて $10 \mu\text{L}/\text{min}$ の超低速条件下で注入したところ、骨格内の胆管構造の管腔に沿って細胞が分布した(図 3A)。



また、共焦点顕微鏡を用いた 3 次元構造分析によって胆管上皮細胞の細胞核及び細胞質を染色して観察したところ、管腔に沿った胆管上皮細胞の分布および樹脂状に分岐した末梢胆管構造が 3 次的的に認められた(図 3B, C)。

図 2. 胆管への細胞注入手技と循環培養装置

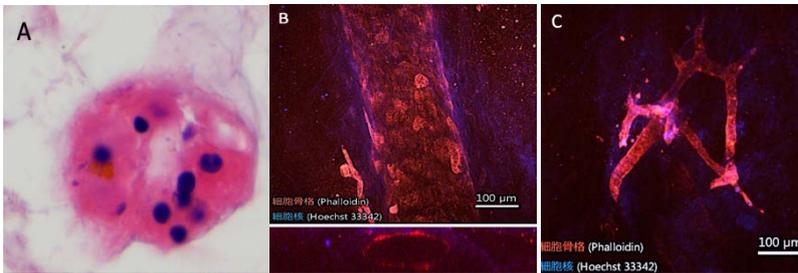


図 3. 胆管上皮細胞の骨格内への生着

(3) ヒト胆管癌細胞を用いた注入・循環培養条件の検討

胆管上皮細胞の脱細胞化骨格への注入・循環培養条件の検討に加えて、ヒト胆管癌細胞株 (HuCCT1, 理化学研究所 Cell Bank より分与, 図 4A) を用いて細胞注入および循環培養条件を検討した。細胞注入は全て胆管から行い、希釈濃度は $1.0 \sim 5.0 \times 10^6 / \text{mL}$ に調整した。検討 2 で胆管上皮細胞の生着が良好であった経胆管的超低速循環培養により 3 日間循環培養を行い、HE 染色および共焦点顕微鏡による観察を行なった。まず、循環培養経路については経門脈的循環と経胆管的循環を検討した。その結果、骨格内の胆管構造にびまん性に細胞が分布し、樹脂状構造が 3 次的的に再現された(図 4B, C)。

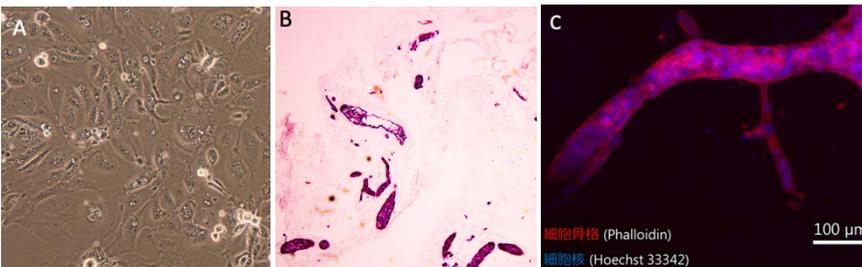


図 4. ヒト胆管癌細胞を用いた循環培養による細胞生着の検討

(4) 肝細胞、胆管上皮細胞、血管内皮細胞を用いた共培養試験

1 で確立した新鮮単離胆管上皮細胞を用いて 2 で確立した経胆管的超低速循環培養を行うと同時に、1 の胆管上皮細胞の単離中に得られる肝細胞を Percoll で処理を行い生細胞のみを回収して、経門脈的に、もしくは経静脈的に 3 回に分けて注入および循環培養を行なった。単離した肝細胞の目標は細胞数 5.0×10^7 個、viability 95%以上で、循環速度は $1 \text{ mL}/\text{min}$ とした。また、肝細胞と合わせて培養した血管内皮細胞も合わせて注入した。血管内皮細胞は 1.0×10^6 個を目標値とした。1 週間の循環培養の後、HE 染色および免疫染色 (ALB, CK19, いずれも Abcam 製) で形態および分布を評価した。胆管構造内への胆管上皮細胞の生着はいずれの条件でも良好であった。肝細胞は経門脈循環培養では門脈構造内で閉塞し循環培養は困難であったが、経静脈的循環培養では静脈周囲の間質へ浸潤拡散する所見が得られた(図 5A, B)。

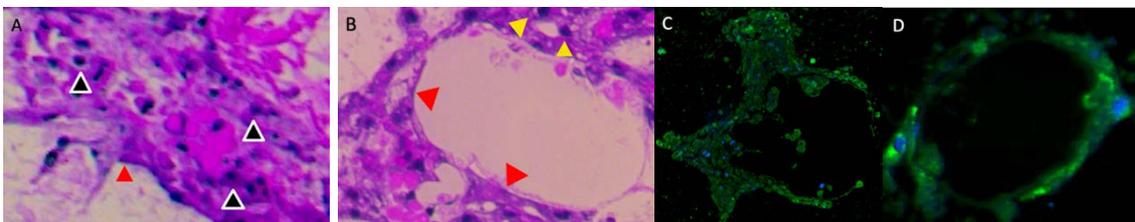


図 5. 共培養試験の生着検討

A, B: HE 染色、黒矢印: 肝細胞、黄矢印: 胆管上皮細胞、赤矢印: 血管内皮細胞
 C: 免疫染色 緑 ALB、青 DAPI
 D: 免疫染色 緑 CK19、青 DAPI

(5) 肝前駆細胞の確立および注入・循環培養試験

4 で得られた肝細胞から、肝細胞および胆管上皮細胞への分化能を有する肝前駆細胞 (Chemically-induced Liver Progenitors, Cell Stem Cell. 2016) を作製した (図 6A)。作製した肝前駆細胞が作製に用いた培地内で既報と同様に増殖能を有し、継代可能であることを確認した。この前駆細胞を脱細胞化骨格内の胆管構造に 2 と同条件下で注入し、1 週間の循環培養を行なった。HE 染色で注入した肝前駆細胞が脱細胞化骨格内の胆管構造へ生着することが確認された (図 6B)。また、胆管構造周囲の間質に肝前駆細胞が浸潤拡散し、肝細胞様に形態が変化している所見が認められた (図 6C, D)。

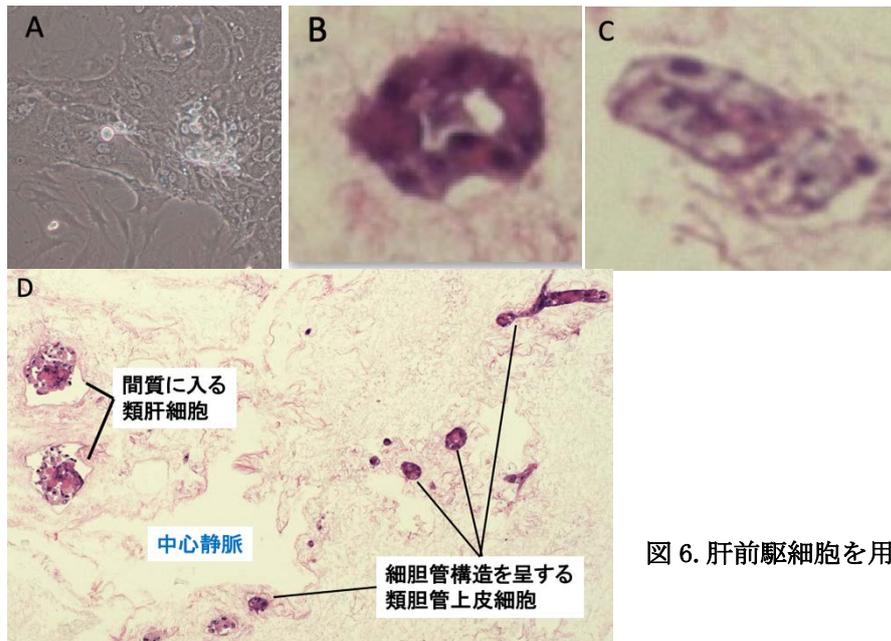


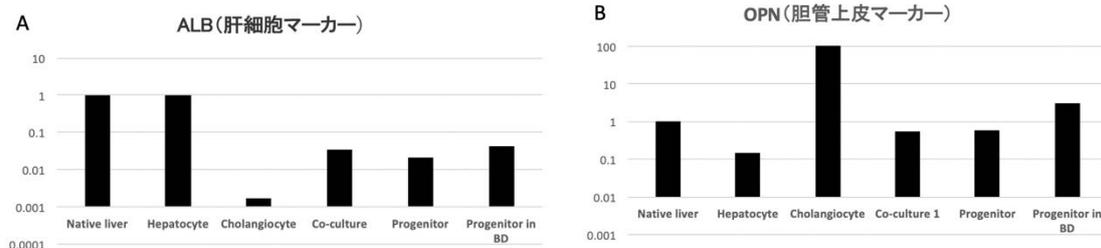
図 6. 肝前駆細胞を用いた循環培養の検討

(6) 遺伝子発現の比較

ラット肝臓の組織片、1 で得られた胆管上皮細胞、肝細胞、4 で検討した 3 細胞を用いた共培養後のサンプル、5 で作製した dish culture 下での肝前駆細胞、5 で検討した肝前駆細胞を用いた循環培養後のサンプルから RNA を抽出し、RT-qPCR を用いて遺伝子発現を比較した。肝細胞のマーカーとして ALB、胆管上皮細胞のマーカーとして OPN、毛細胆管のマーカーとして BSEP、胆管形成マーカーとして JAG 1 を検討した。

その結果、ALB については共培養後のサンプル、dish culture 下での肝前駆細胞、脱細胞化骨格内で肝前駆細胞の循環培養を行なったサンプルで同程度の発現が認められた (図 7A)。また、OPN、BSEP は dish culture 下での肝前駆細胞に比べて、脱細胞化骨格内で肝前駆細胞を循環培養したサンプルは共培養サンプルと同程度の発現が認められた (図 7B, C)。また、JAG1 については共培養サンプルと比べて脱細胞化骨格内で肝前駆細胞を循環培養したサンプルで発現上昇が認められた。 (図 7D)

肝前駆細胞は既報においては肝細胞、胆管上皮細胞へ分化させるためには Matrigel を用いたそれぞれの分化誘導刺激が必要であるが、今回の実験結果は肝前駆細胞が脱細胞化骨格内での循環培養によって肝細胞、胆管上皮細胞双方への分化傾向を示し、さらに骨格内で胆管形成が促された可能性が示唆された。



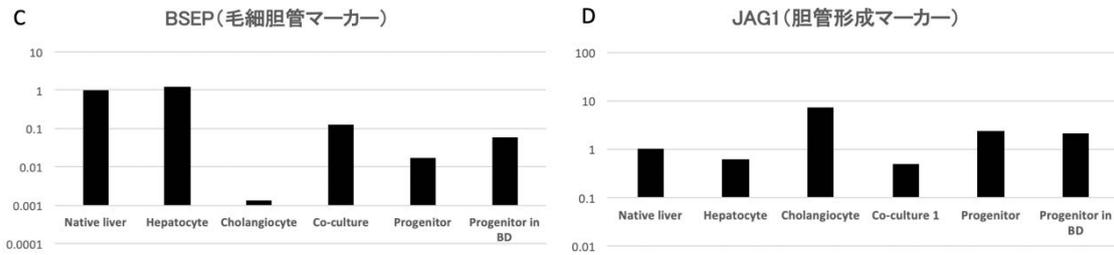


図 7. qPCR による遺伝子発現の評価
Gene expression level (Native Liver = 1)

5. 本研究全体の結果の意義

脱細胞化骨格内の胆管構造に対する細胞注入及び循環培養について、至適条件を確認することができた。また、その条件下では骨格内にびまん性に細胞が分布し、3次元的な胆管構造を再現することが確認された。さらに、肝前駆細胞においても同様の循環培養が可能であり、培養後の遺伝子発現の変化から骨格内で循環培養することによって、肝前駆細胞が胆汁輸送系の機能に関する細胞へ分化する可能性が示唆された。今後、脱細胞骨格と前駆細胞の分化に関する詳細を検討していくとともに、肝前駆細胞の双方向性の分化能と脱細胞化骨格を活かすことで、末梢の肝細胞、胆管上皮細胞の連続的な胆汁輸送系を再構築することを目指していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蛭川和也、八木洋、須藤亮、黒田晃平、篠田昌宏、北郷実、阿部雄太、大島剛、掘周太郎、北川雄光
2. 発表標題 肝脱細胞化骨格による胆管構造の再生
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蛭川和也、八木洋、須藤亮、黒田晃平、篠田昌宏、北郷実、阿部雄太、大島剛、掘周太郎、北川雄光
2. 発表標題 脱細胞化骨格を用いた胆管構造の再生
3. 学会等名 第119回 日本外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蛭川和也、八木洋、須藤亮、黒田晃平、篠田昌宏、北郷実、阿部雄太、大島剛、掘周太郎、北川雄光
2. 発表標題 肝脱細胞化骨格による胆管構造の再生
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部外科学（一般・消化器） 肝胆膵移植班 スタッフ紹介 八木洋
<https://www.keio-hppts.jp/about/surgeons-DrYagi>
 慶應義塾大学医学部外科学（一般・消化器） 肝胆膵移植班 スタッフ紹介 八木洋
<https://www.keio-hppts.jp/about/surgeons-DrYagi>

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	須藤 亮 (Sudo Ryo) (20407141)	慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授 (32612)	
研究分担者	水口 裕之 (Mizuguchi Hiroyuki) (50311387)	大阪大学・薬学研究科・教授 (14401)	

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