

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06246・19K21341

研究課題名(和文) ヒトミニチュア人工肝臓を用いた革新的薬物効果検証モデルの創出

研究課題名(英文) Human miniature artificial liver for drug verification

研究代表者

宮田 辰徳 (Miyata, Tatsunori)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：80594887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：人工臓器の創出は薬剤開発の分野に貢献する。今回我々は、ラット肝臓を脱細胞化し、ヒト由来肝細胞によって再置換したミニチュアヒト人工肝臓を創成し、薬剤 ex-vivo スクリーニングツールとしての可能性を評価することを目的とした。6-8週齢のWistarラットから肝臓右葉を摘出し、培地で置換した脱細胞肝を作成した後、閉鎖型的人工肝臓スクリーニング回路に組み込んだ。回路には酸素富化装置として人工鼻を組み込んだ。さらに、脱細胞肝を再細胞化するため、ヒト切除肝から初代肝細胞を効率的に得るためのプロトコルを開発した。今後、ラット脱細胞肝をヒト初代肝細胞で置換をし、薬剤による肝障害等を評価する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤は肝臓で代謝されることが多い。新規薬剤の開発においては、有効性とともにも安全性についても十分な検討が必要である。現在、基礎的な動物実験で安全性を確認することが多いが、ヒト細胞での検討ではないためより安全性の確認を行うためにはヒト細胞の使用が望ましい。今回我々の行った研究により、新規薬剤スクリーニングキットとしてのヒトミニチュア肝臓の開発が進んだことにより、将来、治験を行う前に、解剖学的立体構造を有した状態でのヒト肝細胞を用いた安全性の確認を行うことができるようになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Creation of artificial organs contributes to the field of drug development for cancers. Here, we aimed to create a miniature human artificial liver in which rat decellularized liver was replaced with human primary hepatocytes, and to evaluate its potential as a drug ex-vivo screening tool. The liver was excised from 6-8 week-old Wistar rats, and the decellularized liver in which the medium was replaced was prepared. This liver was incorporated into a closed artificial liver screening circuit. An artificial nose was incorporated into the circuit as an oxygen enrichment device. Furthermore, in order to recellularize decellularized liver, we developed a protocol to efficiently obtain primary hepatocytes from human excised liver. In the future, we plan to replace the decellularized liver of the developed screening kit with human primary hepatocytes and evaluate liver damage by adding some drugs candidates for development.

研究分野：消化器外科、肝臓外科、トランスレーショナルリサーチ

キーワード：ミニチュアヒト人工肝臓 薬剤 ex-vivoスクリーニングツール 脱細胞鋳型肝臓 ヒト初代培養肝細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における肝臓の年間死亡数は、約3万人にのぼり、日本人の癌死因の第5位を占めている (国立研究開発法人国立がん研究センターがん情報サービス)。肝臓の約 90%を占める肝細胞癌は、化学療法及び放射線治療が効きにくく、長期生存のためには根治的切除が必須である。一方、根治的切除後も肝細胞癌は非常に再発をきたしやすく、背景肝の治療と共に入念な follow-upが必要となる。肝切除を行う際には、切除肝容量と肝機能のバランスが重要となる。本邦においては、幕内基準や肝障害度による術前の肝機能評価に基づき、患者の耐術性を評価して、安全な肝切除を行ってきた。腫瘍個数が4個以上の多発肝細胞癌は切除が困難であることから、化学療法が薦められている。一方で肝細胞癌に対する薬剤で有効なものはごくわずかに限られており、当該薬剤を用いても後々再発をきたすが多い。

人工臓器の創出は薬剤開発の分野にも貢献する。近年では、iPS細胞技術の進歩により、ヒトiPS細胞から分化させた細胞を用いた創薬が注目をあびている。当該技術の発達により、治験を開始する以前にヒトへの新規薬剤の効果や安全性を確認することができ、非常に重要なスクリーニングツールとなり得る。しかしながら、あくまでin vitroでの評価であり、人の薬物動態を踏まえた薬剤の効果及び安全性の評価には時間を要すると考えられる。ヒトの臓器に類似した構造を有する人工臓器を用いた薬剤投与の評価はこうした課題の解決に向けた糸口になる可能性がある。

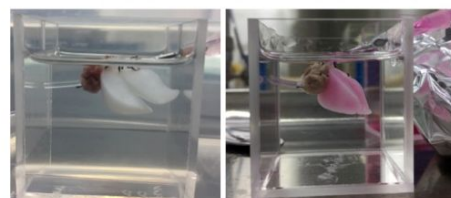
2. 研究の目的

ラット肝臓を脱細胞化し、ヒト肝培養細胞で再細胞化したヒトミニチュア人工肝臓を創成し、閉鎖型循環回路に組み込むことにより、解剖学的構造を有したヒト肝細胞による薬剤 ex-vivo スクリーニングツールとしての可能性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

全身麻酔下に、6~8週齢の Wistar ラットから肝臓を摘出した後、門脈から 4%Triton-X100 を還流しラット肝の脱細胞を行う。その後、DNase及びRNase で脱核した後、ラット脱細胞肝を得る。得られたラット脱細胞肝は、門脈からヒト血管内皮細胞(HUVEC)を播種し、人工肺を搭載した循環回路モデルにセットし、還流培養を行う。切除肝症例より正常部分肝を採取し、トリプシン及びコラゲナーゼ Iを用いてヒト初代培養肝細胞を得る。コラーゲン埋包したヒト肝細胞を脱細胞鋳型肝に直接播種し、ヒトミニチュア肝臓を得る。この際、細胞数は $5.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個を播種する予定である。

図1:ラット脱細胞肝および培地置換肝



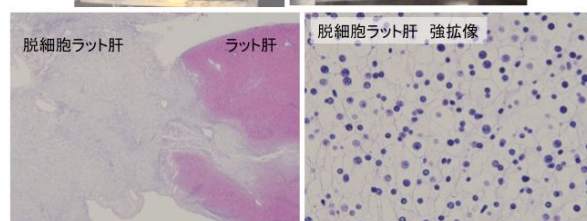
4. 研究成果

(1) ヒトミニチュア肝臓の創生:腹腔内麻酔による全身麻酔下に、6-8週齢の

Wistarラットから肝右葉を摘出した。

還流システム内で門脈から4% Triton-X100を3時間還流させ、ラット肝の脱細胞を行った(図1)。本脱細胞肝は、H&E染色にて細胞質が脱細胞

化されていることを確認した。また、血管内染色により精緻な脈管構造を維持した脱細胞鋳

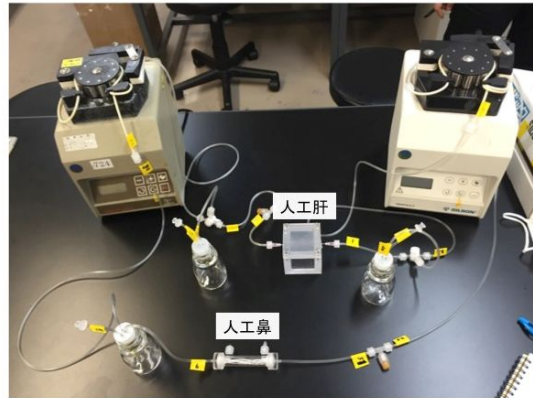


化されていることを確認した。また、血管内染色により精緻な脈管構造を維持した脱細胞鋳

型肝臓であることを確認した。本肝臓を還流システム内で培地置換し、ヒト初代培養肝細胞を播種する準備が整った。

- (2) 次に、ヒトミニチュア ex-vivoモデルに用いる閉鎖型循環回路を作成した。2つのポンプと人工肝臓を留置するケース、薬剤を注入するポート及び培地を採取するポートを組み込んだ回路をまず作成した。人工肝臓を留置するケースは37℃のインキュベーター内に留置することとした。人工肝障害の軽減を図るための条件を検討するためのPreliminaryな実験として、本回路にラット全肝をはめ込み、酸素富化の有無、培地へのラット血液添加の有無(培地と1対1希釈)の条件下で、ラット肝細胞障害抑制の観点から最も優れた循環条件を探索した。結果としては、酸素富化装置有り、血液添加有りの条件で肝細胞障害が抑制されることをH&E染色で確認した。よって、ヒトミニチュアex-vivoモデルに用いる循環回路には、酸素富化装置である人工鼻を組み入れた(図2)。

図2: 薬剤ex-vivo スクリーニングキット



- (3) ヒト初代肝細胞の取得: 肝切除症例 (n=5)の切除標本非癌部より、トリプシン添加型コラーゲナーゼ還流法を用いてヒト肝細胞の取得を行った。大腸癌肝転移症例の他、肝細胞癌、肝内胆管癌症例の非癌部、巨大肝血管腫症例も本検討の対象に含めた。取得細胞数は平均で450万個、生存率平均は71.9%とviabilityを維持したヒト初代培養肝細胞を得るプロトコルを確立した。各々のviabilityの違いを検討したところ生存率に明らかな差は認めなかったが、取得細胞数は100万から1500万個であり、症例毎のばらつきを認めた。ヒトミニチュア人工肝臓(右葉のみ)を得るためには500万から1000万個の肝細胞が必要と見積もっていることから、ex-vivoモデルに適応させるためには、より効率的なプロトコルの改善や症例の選択が必要であることが示唆された。用いる切除肝容量を増やしての効率的な肝細胞取得を引き続き行う予定としている。

これまでの結果より、ex-vivo薬剤評価ツール開発の重要なマイルストーンをいくつか満たしてきている。今後の課題として、いかにヒト初代培養肝細胞を効率的に、そして大量に得ることができるかが重要であることがわかった。症例選択やプロトコルの改善を図りながら、引き続き本スクリーニングの開発を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sakamoto Hiroki, Shirakigawa Nana, Bual Ronald Perocho, Fukuda Yukako, Nakamura Shunsuke, Miyata Tatsunori, Yamao Takanobu, Yamashita Yo-ichi, Baba Hideo, Ijima Hiroyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 A novel evaluation system for whole-organ-engineered liver graft by ex vivo application to a highly reproducible hepatic failure rat model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 222 ~ 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10047-019-01106-6	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 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
2. 発表標題 脱細胞化マウス肝右葉を鋳型としたミニチュアヒト肝臓構築の試み
3. 学会等名 第55回 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山根颯一郎, 池上康寛, 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
2. 発表標題 縫合可能な組織工学的人工胆管の開発と胆管上皮細胞の取得に関する検討
3. 学会等名 第55回 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第55回 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukako Fukuda, Jaeyong Cho, Hiroki Sakamoto, Nana Shirakigawa, Takanobu Yamao, Tatsunori Miyata, Yo-ichi Yamashita, Hideo Baba, Hiroyuki Ijima
2. 発表標題 Development of miniature human liver with mouse decellularized liver
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 臓器工学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
3. 学会等名 第54 回九大生体材料・力学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第31回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井嶋博之, Bual Ronald, 白木川奈菜, 宮田辰徳, 山尾宣暢, 山下洋市, 馬場秀夫
2. 発表標題 臓器特異的細胞外マトリックスナノファイバー不織布を用いた肝組織工学
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019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
研究協力者	山下 洋市 (Yamashita Yo-ichi)		
研究協力者	井嶋 博之 (Ijima Hiroyuki)		
研究協力者	山尾 宣暢 (Yamao Takanobu)		