

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：2130018

研究課題名（和文） 細胞修飾を基盤とした肝再生療法の創出

研究課題名（英文） Development of liver-target therapy based on cellular modification technology

研究代表者

大橋 一夫 (OHASHI KAZUO)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40364062

研究成果の概要（和文）：

肝細胞を用いた新規治療を開発することを目指した研究展開を加速するにあたり、本研究においては、遺伝子修飾および細胞表面修飾を基盤とした肝細胞修飾法を開発した。アデノウイルスベクターを用いた HGF 遺伝子導入修飾により、生体内に移植した際にはアポトーシスの発生を防止し、従来の肝細胞と比較して高い細胞生着を得た。また、PEG-リン脂質重合体を用いた肝細胞表面への薄膜修飾法の開発にも成功した。

研究成果の概要（英文）：

The present study was conducted to establish two different approaches for modifying hepatocytes. First, HGF gene transduction was conducted to isolated hepatocytes in suspension. The study showed that transplantation of HGF-transduced hepatocytes in vivo resulted in significant higher engraftment due to protection from apoptosis that occur after being transplanted in vivo. Second, hepatocyte surface modification technology was established using PEG-lipids. This modification allows hepatocytes to be coated ultra-thin polymer complexes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学、再生医療、細胞治療、遺伝子治療、細胞表面修飾、免疫隔離

1. 研究開始当初の背景

肝臓移植は、末期肝臓疾患に対する最終治療手段として多くの患者の救命をもたらしてきた。しかしながら、臓器提供ドナーの絶対的不足という、解決することがほぼ不可能な世界的問題を抱えている。数少ない提供ド

ナーゆえの国際的問題も生じており、2008 年 5 月に 78 カ国が参加したイスタンブールサミットでの Istanbul 宣言においては、「国外患者への臓器移植治療は、自国内患者の治療機会を減じない時に限り許容される」および「必要な数の臓器を確保し、臓器提供の自給

自足を達成するための努力をすべきである」という内容が宣言された。日本においては、平成9年の臓器移植法施行以来、肝臓の臓器提供数は59例（平成20年10月30日現在：日本臓器移植ネットワークホームページより）と、肝疾患患者への普遍的治療とはなり得ていない実情にある。これらの観点から、臓器レベルではなく、細胞レベルにおける治療展開にむけて、より多くの病態と患者を救うための技術開発を加速させることが重要である。細胞を基盤とした治療においては、特に、肝細胞を用いた細胞移植治療やティッシュエンジニアリング治療が期待されている現状にある。

肝臓は数千以上の異なる働きを複雑に行うため、その大部分を担う「肝細胞」を用いることが必要となる。肝細胞を病態肝に移植する肝細胞移植の臨床試験が2000年頃から欧米施設で開始され、これまでに100例以上実施されている。一部の肝疾患においては肝臓移植に匹敵する効果も報告されている。しかしながら、肝臓内での移植細胞の生着率は15%前後と低い。また、ティッシュエンジニアリングの研究開発においても、肝臓外部位における生着率の改善が重要課題である。肝細胞を用いた細胞療法さらなる発展には、肝細胞の生着率を向上させ、高機能を発揮させるための要素技術開発が最も重要である。

これらの背景のもと、肝細胞の生着向上を目指して、申請者はこれまでに、細胞周囲環境を制御するアプローチとして、移植肝細胞のHGF系シグナル活性化法、肝細胞への効率の高い遺伝子導入法、肝臓外部位における細胞長期生着法、さらに、シート状肝組織を用いた3次元化肝組織作製法、肝細胞の大量増殖法を開発してきた。肝ティッシュエンジニアリングにおいては、作製組織の維持期間において世界的記録を数々樹立している。今後の展開において、細胞自体の制御、すなわち、肝細胞膜や遺伝子発現の修飾や、他細胞との細胞構成の制御が可能となれば、より効果的な細胞基盤治療の新機軸となり得ると確信している。本申請研究は、治療に用いる肝細胞自体に施す修飾法を開発し、既開発の細胞周囲環境の制御アプローチと統合することにより、肝細胞を用いた新しい治療戦略を展開することを目標としている。

2. 研究の目的

本研究は、肝細胞を利用した有効な肝疾患治療法を開発することを目的とする。その重要骨子は、治療に用いる肝細胞に様々な修飾を施す要素技術（遺伝子導入による機能修飾

や高分子による細胞膜の薄層コート等）を確立することにある。これらの修飾法を肝細胞に施す事により、生体内に移植した際の肝細胞の機能を高め、より高い治療効果を発揮する治療法の開発に結びつける計画である。治療に用いる細胞の機能を高めるなどの制御技術が開発できれば、細胞治療のより高い治療効果に直結することは疑いのないことである。研究代表者および共同研究者がこれまでに開発してきた、様々な肝細胞を用いた治療技術に、これらの細胞修飾法を組み合わせることにより、臓器移植に頼らない未来型医療の実現を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入による肝細胞遺伝子修飾法の確立

分離肝細胞に対し、アデノウイルスベクターを用い遺伝子修飾を行う実験を行う。肝細胞は、マウスから2ステップコラゲナーゼ灌流法にて分離し、パーコール低速遠心法等を用いて98%以上の純化を行った後に実験に用いる。HGF (hepatocyte growth factor) を発現するベクターを用いて、細胞懸濁浮遊状態の分離肝細胞に効率良く遺伝子導入を行う方法を探索する。アデノウイルスベクター感染肝細胞の機能を評価するとともに、HGF発現肝細胞を用いた生体内への肝組織作製実験を行う。さらに、肝組織作製の治療効果を把握することを目的に、急性肝不全を組織作製マウスに発症させ、その後の経緯を観察する。本実験における急性肝不全は、マウス肝臓の中葉と左葉を切除摘出し、さらに残肝への門脈血流を結紮する手術手技により誘導する。

(2) 肝細胞の細胞膜における高分子修飾法の確立

分離・精製したマウス肝細胞を用いた実験を行う。マレイミド基を有するPEG-リン脂質重合体と肝細胞を反応させ、脂質部分を肝細胞膜にアンカーさせることで細胞表面に固定することを試みる。反応条件の最適化を行いながら、本細胞膜修飾法自体が肝細胞に与える影響を以下の指標にて評価を行う。

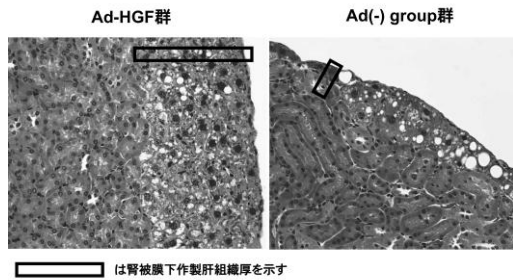
- ①細胞皿接着性
- ②培養下蛋白合成機能、薬剤代謝機能
- ③動物体内注入移植の際の生着率
- ④細胞シート等の肝再治療を目的とした細胞デバイス作製の可能性

4. 研究成果

(1) HGF 遺伝子導入による肝細胞遺伝子修飾法を基盤とした再生医療開発

肝細胞を臓器保存液である UW 液に懸濁させ、MOI=1、4℃、1時間でアデノウイルスベクターと反応させることにより、90%以上の肝細胞に遺伝子導入が可能なることを明らか

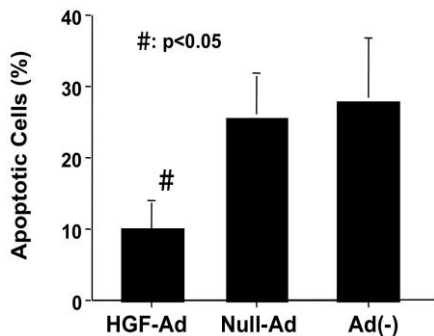
とした。この手法を用いて、HGF 発現アデノウイルスベクターにて肝細胞に遺伝子導入を行い、この遺伝子導入肝細胞を用いてマウスの腎被膜下に肝組織作製を行った。その結果、非遺伝子導入肝細胞と比較して、有意に



(図1)

大きな肝組織の作製に成功した (図1)。生体内に移植した肝細胞のアポトーシス検索において、HGF 遺伝子発現肝細胞では、アポトーシス発生が有意に抑制され、その結果、マウス体内に移植した肝細胞の生着効率の向上と、大きな肝組織作製をなし得ることが明らかとなった (図2)。

次いで、両側の腎被膜下に肝組織を作製し



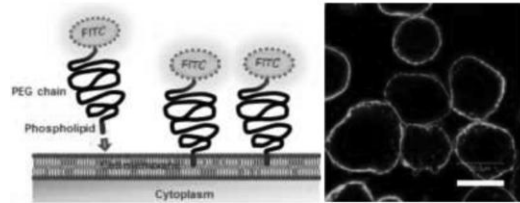
(図2)腎被膜下に移植した肝細胞のアポトーシス発生状況

たマウスに、肝部分切除+残肝の門脈血流結紮による急性肝不全を誘導し、治療効果を判定した。その結果、非遺伝子導入肝細胞により肝組織を作製したマウスでは、肝不全誘導24時間以内に全匹死亡したのに対し、HGF 遺伝子導入肝細胞で肝組織作製を行ったマウスでは、40%の生存率を得た。HGF 遺伝子導入肝細胞で肝組織作製を行ったマウスにおいては、種々の血液マーカー測定において、肝不全の著明な改善も確認した。これらの結果から、①HGF 遺伝子導入によって、生体内に移植した肝細胞のアポトーシスを防止できること、②HGF 遺伝子導入肝細胞は、機能的により大きな肝組織を作製し得ること、③HGF 遺伝子導入肝細胞を用いた肝組織作製は、急性肝不全病態の救命治療効果を発揮し得

ることが明らかとなった。

(2) 肝細胞の細胞膜における高分子修飾法の確立

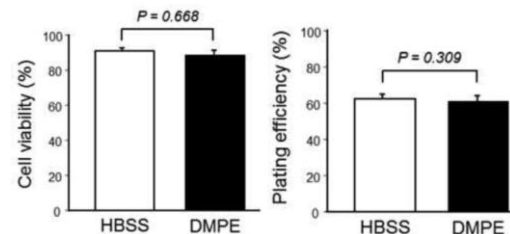
PEG-リン脂質重合体として、蛍光標識 PEG-DMPE (ミリスチン酸)、PEG-DPPE (パルミチン酸)、PEG-DSPE (ステアリン酸) を分離肝



(図3)PEG-リン脂質重合体を用いた肝細胞膜修飾の概念(左)と肝細胞膜表面の修飾像(右)

細胞と反応させ、数回の洗浄の後、細胞膜の修飾状況を測定した。その結果、蛍光標識 PEG-DMPEを用いることにより、99%以上の肝細胞の細胞膜に高分子修飾し得ることが明らかとなった (図3)。

次いで、蛍光標識PEG-DMPEにて細胞膜表面修飾を行った肝細胞と非修飾肝細胞を用いて、トリパンブルー排泄試験及び、培養皿接着試験を行った結果、本研究において開発した細胞膜表面修飾法自体は、肝細胞障害を惹起しないことを確認した (図4)。



(図4)細胞膜修飾肝細胞(DMPE)と非修飾肝細胞(HBSS)におけるcell viability(左)と培養皿接着率(右)

さらに、細胞膜修飾法が肝細胞機能に与える影響を探索した。具体的には、PEG-DMPE修飾肝細胞と非修飾肝細胞を培養し、肝臓特異的蛋白発現、薬物代謝能、ならびに肝臓特異的mRNA発現を評価した結果、いずれのパラメーターにおいても両群間に有意差を認めなかった。この結果から、本研究において開発した細胞膜表面修飾法自体は、肝細胞機能に負の影響を与えないことを確認した。また、同系マウスの体内移植実験を行ったところ、良好な肝細胞生着を確認した。当研究室では、温度応答性培養皿を用いて、肝細胞が2次元

に配列した肝細胞シートの作製技術を開発しているが、本細胞膜修飾法は、単離細胞のみならず、培養下で作製した肝細胞シート組織体にも応用が可能であることも明らかとなった。これらの結果から、本研究において開発した肝細胞膜表面修飾法は、蛋白による機能付加や、細胞相互の制御等の今後の展開に有用な要素技術と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Kim K, Ohashi K, Utoh R, (他 2 名、2 番目). Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials*, **33**:1406-1413, 2012. 査読有
- ② Tatsumi K, Ohashi K, Teramura Y, (他 7 名、2 番目). The non-invasive cell surface modification of hepatocytes with PEG-lipid derivatives. *Biomaterials*, **33**: 821-828, 2012. 査読有
- ③ Ohashi K, Mukobata S, Utoh R, (他 4 名、1 番目). Production of islet cell sheet using cryopreserved islet cells. *Transplantation Proc* **43**: 3188-3191, 2011. 査読有
- ④ Saito T, Ohashi K, Utoh R, (他 6 名、2 番目). Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation*, **92**:1231-1236, 2011. 査読有
- ⑤ Ohashi K, Tatsumi K, Utoh R, (他 3 名、1 番目). Engineering liver tissues under the kidney capsule site provides therapeutic effects to hemophilia B mice. *Cell Transplantation*, **19**: 807-813, 2010. 査読有

[学会発表] (計 53 件)

- ① Utoh R, Ohashi K, Okano T. Engineering of liver tissues containing liver-specific non-parenchymal cells at the ectopic site. Joint Congress of Cell Transplant Society and International Xenotransplantation Society. Miami (USA) 2011 年 10 月 25 日
- ② Tatsumi K, Ohashi K, Tateno C, (他 5 名、2 番目). In vivo propagation and genetic modification of hepatocytes toward gene and cell therapy. Joint Congress of Cell Transplant Society and

International Xenotransplantation Society. Miami (USA) 2011 年 10 月 25 日

- ③ Tatsumi K, Ohashi K, Utoh R, (他 3 名、2 番目). Hepatocyte surface modification for liver regenerative medicine. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2010 Asia Pacific Meeting, Sydney (Australia) 2010 年 9 月 16 日

- ④ Ohashi K, Utoh R, Saito T, (他 6 名、1 番目). Cell sheet engineering toward bioengineering of functional neo-islets. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2010 Asia Pacific Meeting, Sydney (Australia) 2010 年 9 月 16 日
- ⑤ Ohashi K, Saito T, Utoh R, (他 5 名、2 番目). Therapeutic islet tissue engineering in subcutaneous site with scaffold-free approaches. 71th Scientific Sessions of American Diabetes Association. San Diego (USA) 2011 年 6 月 26 日

[図書] (計 9 件)

- ① 大橋一夫 肝細胞の再生増殖と肝組織構築 治療 **92**(4) 715-720, 2010.
- ② 小山文一、大橋一夫、岡野光夫、(他 1 名、2 番目). 肝ティッシュエンジニアリングへのアプローチ腎被膜下組織作製法とシート工学を用いた皮下肝組織作製法 分子細胞フロンティア 外科分子細胞治療学会編 199-206, 2010.
- ③ 大橋一夫 肝ティッシュエンジニアリング 白幡 聡編 みんなに役立つ血友病の基礎と臨床 医薬ジャーナル社 309-317, 2009.
- ④ 大橋一夫 皮下に第二の肝臓を創る 治療学 **43**(6): 85-87, 2009.
- ⑤ 大橋一夫 肝細胞移植と肝組織工学の現状 医学のあゆみ **229**: 844-849, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 一夫 (OHASHI KAZUO)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40364062

(2) 研究分担者

中山 正道 (NAKAYAMA MASAMICHI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00338980

辰巳 公平 (TATSUMI KOHEI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70555432

(3) 連携研究者

岩田 博夫 (IWATA HIROO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：30160120

水口 博之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)
大阪大学・薬学研究科・教授
研究者番号：50311387