

令和 7 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2024

課題番号：22K18186

研究課題名（和文）肝細胞/ECMダブルインジェクションによる肝臓内肝組織構築

研究課題名（英文）Reconstruction of Liver Tissue In Situ through Dual Injection of Hepatocytes and ECM

研究代表者

白木川 奈菜（Shirakigawa, Nana）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：90724386

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：肝移植に代わる肝再生医療の実現を目指し、肝細胞と肝臓由来細胞外マトリックス（ECM）を組み合わせたダブルインジェクション法による肝組織構築を検討した。1年目は肝内でゲル化可能なECM基材を開発し、マウス肝内でのゲル形成に成功。2年目は薬剤投与により肝硬変モデルマウスを作製し、同モデルへの肝細胞移植を実施、生着を確認した。3年目は凍結切片により細胞の局在と生着を評価したが、肝小葉構造の形成には至らず、今後は微小環境の最適化が課題と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肝細胞と肝臓由来ECMを同時に注入することで、生体内において機能的な肝組織の構築を試みた点で、再生医療分野に新たなアプローチを提示する学術的意義がある。特に、体内でゲル化可能なECM基材の開発や、肝疾患モデル動物に対する応用は、微小環境の設計による組織再構築の実現性を示す重要な成果である。社会的には、深刻なドナー不足に直面している肝移植医療に対し、より低侵襲で適用可能な再生医療技術の確立は、新たな治療選択肢を提供する可能性があり、将来的な臨床応用に向けた大きな一歩となる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop an alternative to liver transplantation by constructing liver tissue within the native liver using a double injection method involving hepatocytes and liver-derived extracellular matrix (ECM). In the first year, ECM materials capable of gelation in vivo were developed. Mixtures of type I collagen or gelatin with genipin successfully formed stable gels under physiological conditions. In the second year, a liver cirrhosis mouse model was established by drug administration, and hepatocyte/ECM co-injection led to successful cell engraftment. In the third year, cryosections were prepared to evaluate tissue formation. Although transplanted hepatocytes were localized and survived, lobule-like structures were not observed. Further improvement of ECM composition and optimization of the microenvironment are necessary to promote organized tissue development and functional recovery.

研究分野：生物化学工学

キーワード：再生医療 肝臓 細胞外マトリックス 肝障害

## 1. 研究開始当初の背景

健康な肝臓は全体の 70%を切除しても機能を十分に発揮し、マウス・ラットでは 1 週間、ヒトでは半年程度で再生する特異な臓器である。しかし、慢性肝不全の肝臓は線維化が進行して肝臓本来の再生能力や肝機能が著しく低下するため、移植に頼らざるを得ない。ドナー不足は世界的な問題となっている。一方、急性肝不全に対して全肝の 5%程の肝細胞を用いた人工肝臓を適用すると、肝機能を補助して救命し得る (Y. Yamashita, *et al.*, *Cell Transplant*, 2003) ことから、患者体内で健康な肝臓環境を再現し、少規模でも新たな肝組織を構築できれば肝不全からの回復が期待される。

体内で肝組織を構築する取り組みとして、立野らは、肝臓に障害を持つ免疫不全の uPA/SCID マウスを作製してヒト肝細胞を脾臓経由で移植すると、約 2 ヶ月でヒト肝細胞に置換された肝臓を持つキメラマウスを作製できることを報告した (C. Tateno, *et al.*, *Am J Pathol*, 2004)。鶴頭らは、重度の肝不全マウスの腎被膜下に肝実質細胞と肝非実質細胞を混合して移植することで、一年半かけてレシピエントマウス肝臓と同重量の肝組織が構築されることを報告した (R. Utoh, *et al.*, *J Hepatol*, 2018)。

本研究では、ヒトに対する臨床応用が進まない理由について、肝組織構築にかかる時間が長すぎるためではないかと考えた。極めて重度の肝障害を誘発して肝再生刺激を得られるマウス体内という特殊な環境であっても肝組織構築に数カ月もの期間を要する。その上、マウスでの 1 週間は大型動物での半年に匹敵する。すなわち、大型動物では肝組織構築が進む前に肝不全により死亡してしまうのではなかろうかと考え、もっと軽度の肝障害モデルマウスにおいて、数週の短期間で肝組織構築し得る手法の開発が臨床応用へのブレイクスルーとなると期待し、その開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウスと、マウスの次のスケールであるラットにおいて、既往の報告より軽度の肝障害環境下で数週の短期間で肝組織構築を達成する手法を開発することを目的とした。

肝臓は腸で栄養を吸収した血流 (腸管血流) が流れ込むため、肝細胞の生着には栄養豊富、かつ、十分な血流が必要であると考え、肝臓内での組織構築を着想した。また、肝細胞が機能発現を行うためには、肝臓内と同じ細胞外マトリックス (Extracellular Matrix; ECM) に含まれていることが望ましいと考えた。

そこで、本研究では肝臓内に対して、肝細胞/ECM ダブルインジェクションによる肝細胞移植を行うことで、より軽度の肝障害環境下における短期間での肝組織構築を目指した。

## 3. 研究の方法

肝臓の ECM の主成分である I 型コラーゲン、コラーゲンに熱を加え抽出して得られるゼラチン、肝臓由来 ECM の 3 種をインジェクションゲルの主成分として選定した。肝臓内部でのゲル化剤として、植物由来の天然の架橋剤であり、グルタルアルデヒド等の非天然の架橋剤より毒性が低いと言われているゲニピンをゲル化剤として用いた。

### (1) ゲル化条件の検討

コラーゲンと肝臓由来 ECM は中性化して 37°C 環境下に置くことでゲル化すること、ゼラチンを 37°C 環境下でゲル化させるためには架橋剤を用いる必要があることが知られている。また、コラーゲンと肝臓由来 ECM にゲル化剤を用いることで、ゲル化時間の短縮やゲル強度の向上が期待される。そこで、2.4 mg/mL コラーゲン、7.8 mg/mL 肝臓由来 ECM、10% ゼラチンにそれぞれ 0.45% ゲニピンを混合し、37°C で 1 日置いた。また、コラーゲンと肝臓由来 ECM はゲニピン無添加の条件も作製した。その後、ヤング率を測定し、ゲルの強度を評価した。

ゲニピン混合条件において、ゲル化に必要な時間を評価するため、2.4 mg/mL 肝臓由来 ECM、10% ゼラチンに対して 1% ゲニピンを混合し、37°C で 30 分、90 分、150 分静置後にゲル化及びヤング率を評価した。また、10% ゼラチンに対して 0.45% ゲニピン添加条件も作製し、同様に評価した。

## (2) 生体内におけるゲルの作製

2.4 mg/mL コラーゲン, 1% ゲニピン添加 7.8 mg/mL 肝臓由来 ECM, 1% ゲニピン添加 10% ゼラチンを用いてインジェクションによる肝臓内でのゲル形成を試みた。コラーゲンは 37°C でゲル化すること、ゲニピンは 37°C で活性が高まることから、針付きシリンジを用いて 7 週齢の雄性 ICR マウスの肝臓に対し、各 10~30  $\mu$ L の溶液をインジェクションした。インジェクション後は白熱電球を用いて、移植部位を温めながら閉腹した。3 時間後に摘出し、移植部位の組織学的評価を行った。

## (3) 肝細胞/ECM ダブルインジェクションによる肝臓内への肝細胞移植

40  $\mu$ M PKH26 溶液 100  $\mu$ L とマウス初代肝細胞  $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L-medium を混合し、5 分静置後、培地で 3 回洗浄してマウス初代肝細胞を赤色蛍光で染色した。染色した肝細胞を用いて 70% 肝切除を施した 7 週齢の雄性 ICR マウスの肝臓に対し、2.4 mg/mL コラーゲンを用いて肝細胞/ECM ダブルインジェクションにより肝細胞移植を行った。移植直後と移植 1 週間後において移植部位の凍結切片を作製し、蛍光観察及び組織学的評価を行った。また、チオアセトアミドを用いて肝繊維化モデルマウスの作製を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) ゲル化条件の検討

37°C で 1 日静置後に 2.4 mg/mL コラーゲン, 7.8 mg/mL 肝臓由来 ECM (L-ECM), 10% ゼラチンを用いて作製した各ゲルに対して応力試験機を用いて評価した。応力ひずみ線図の傾きからヤング率を算出したところ、コラーゲンゲルにおいても肝臓由来 ECM においてもゲニピンの添加によりヤング率が上昇した (図 1)。また、作製したゲルの中で 1% ゲニピン添加 10% ゼラチンゲルが最も高いヤング率であった。

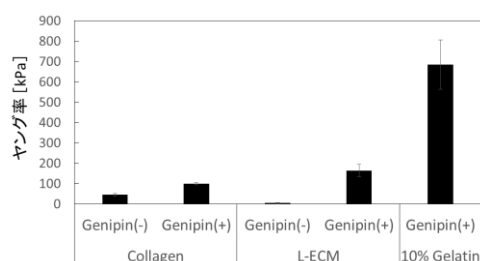


図 1, 各ゲルのヤング率

ゲル化に必要な時間を評価するため、各溶液を混

合し、37°C で 30 分、90 分、150 分静置後にゲル化及びヤング率を評価したところ、1% ゲニピン添加 2.4 mg/mL 肝臓由来 ECM は 30 分後にはゲル化し、150 分静置してもヤング率はあまり変わらなかった。一方、1% ゲニピン添加 10% ゼラチンは 30 分後にゲル化し、時間の経過とともにヤング率の上昇が見られた。また、0.45% ゲニピン添加 10% ゼラチンは 30 分静置してもまだゲル化していなかった。90 分後にはゲル化しており、150 分後は 90 分後よりもヤング率が上昇していた。これらの結果から、生体内でゲルを迅速に形成するために、ゲニピン添加濃度を 1% にして検討を進めることにした。また、経時的にヤング率の上昇が見られたことから、ゲニピンはゲル形成後も架橋反応を継続して進行していることが考えられた。架橋反応は移植細胞へも影響しうることが考えられ、ゲル形成能も維持しつつ、移植細胞へ影響を与えない濃度での使用が望ましいと考える。

## (2) 生体内におけるゲルの作製

2.4 mg/mL コラーゲン, 1% ゲニピン添加 7.8 mg/mL 肝臓由来 ECM, 1% ゲニピン添加 10% ゼラチンを用いてインジェクションによる肝臓内でのゲル形成を試みたところ、組織切片の HE 染色とマッソントリクローム染色の結果から、各条件で肝臓内にゲル形成が可能であることが明らかになった。

## (3) 肝細胞/ECM ダブルインジェクションによる肝臓内への肝細胞移植

PKH26 によりマウス初代肝細胞を赤色蛍光で染色した。染色直後に蛍光観察し、初代肝細胞を染色できていることを確認した。染色した初代肝細胞を肝細胞/ECM ダブルインジェクションにより肝臓内に移植した。移植肝細胞の組織形成を促すため、被移植マウスに 70% 肝切除を施したが、これにより、残りの肝臓に対する血流が上昇し、肝臓内部でのゲル形成が難しくなった。そこで、インジェクションの際には門脈を数分間クランプし、インジェクション後にクランプを外したところ、肝臓内でのゲル形成に成功した。染色した初代肝細胞を肝細胞/ECM ダブルインジェクションにより 70% 肝切除後の肝臓内に移植し、移植直後と 1 週間後に移植部位を評価したところ、移植直後の凍結切片の蛍光観察及び HE 染色による組織学的評価から、肝細胞/ECM ダブルインジェクションにより肝臓内に肝細胞を移植できていることが示された。一方、1 週間後の評価において、赤色蛍光を有する肝細胞を観察することには成功したが、観察された肝細胞は肝臓内に点在しており、組織形成やゲルの維持が難しいことが示唆された。

また、チオアセトアミドを用いて肝障害モデルマウスの作製に取り組み、1 回の投与による急性肝不全誘導モデルと 1 カ月の継続投与による慢性肝不全モデルの作製を試み、肝不全の指標である ALT、AST、総ビリルビンの血中濃度の上昇を認めた。肝障害モデルマウスに対し、肝細

胞/ECM ダブルインジェクションにより肝臓内に肝細胞を移植したが、肝臓内での肝組織形成には至らなかった。

これらの結果から、移植された肝細胞が肝組織を形成するまで、肝臓内でゲルを維持できていないことが考えられ、ゲル強度の向上が必要であると考え。一方、ゲニピンを用いて形成したゲルで肝細胞を培養したところ、生存率の低下が見られ、ゲニピン濃度の最適化が必要であると考え。

以上の結果より、肝臓の ECM の主成分である I 型コラーゲン、コラーゲンに熱を加え抽出して得られるゼラチン、肝臓由来 ECM を用いてインジェクションにより、肝臓内にゲルを形成することに成功した。しかしながら、形成したゲルの維持が難しく、肝細胞/ECM ダブルインジェクションにより肝臓内に肝細胞を移植できたが、組織形成には至らなかった。架橋剤の濃度や種類、またゲル化形成の仕組みを見直して、肝組織構築を目指していきたい。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 白木川 奈菜	4. 巻 103
2. 論文標題 脱細胞化肝臓を足場とした臓器工学的肝臓構築の試み	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 148 ~ 152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.103.4_148	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 新, 白木川 奈菜, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 門脈における肝組織構築に向けた基盤技術の開発
3. 学会等名 第62回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 白木川 奈菜
2. 発表標題 脱細胞化肝臓を足場とした臓器工学的肝臓構築の試み
3. 学会等名 第76回日本生物工学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 白木川 奈菜, 福村 将成, 井嶋 博之, 堺 裕輔
2. 発表標題 肝臓表面における肝組織構築に向けたニードルを有する足場基材の開発
3. 学会等名 第31回肝細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 白木川奈菜, 堺裕輔, 井嶋博之
2. 発表標題 肝細胞 / 細胞外マトリックスタブルインジェクション法の開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福村将成, 白木川奈菜, 堺裕輔, 江口晋, 井嶋博之
2. 発表標題 肝細胞移植のための多層スポンジニードル足場基材の創製
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鎌田彩海, 堺裕輔, 白木川奈菜, 井嶋博之
2. 発表標題 コラーゲンをを用いた三次元培養による肝前駆細胞の肝分化促進
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白木川奈菜, 福村将成, 比江島光司, 堺裕輔, 井嶋博之
2. 発表標題 肝臓表面における肝組織構築に向けたスポンジニードル基材の開発
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------