

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591868

研究課題名(和文) ヒト肝再構築シートを用いた肝再生医療の前臨床研究

研究課題名(英文) Reconstruction of human liver sheet for preclinical study of liver regenerative medicine

研究代表者

江口 晋 (EGUCHI, Susumu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80404218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓領域の再生医療は困難を極めており、その発展が待ち望まれている。本研究では、“細胞シート”に着目し、ヒト肝再構築シートを利用した肝再生医療技術の確立を目的とした。手術検体の非癌部より、生存率80%以上でヒト初代肝細胞を調製する手法を確立した。播種密度を制御することで、肝細胞単独培養シートを作製した。また、ヒト初代肝細胞またはHepaRG細胞を線維芽細胞上で培養することにより、肝細胞/線維芽細胞複合シート(EHFS)の作製に成功した。EHFSは血管新生因子(VEGF、TGF β 1、HGF)の産生が優れており、皮下性血管誘導肝組織の構築を可能にした。本技術は、新しい肝再生医療技術として期待される。

研究成果の概要(英文)：The liver regenerative medicine is extremely-difficult to establish, and the further research is looked forward to. In this study, we describe a novel liver regenerative medicine technology using reconstructed human liver sheet. Human primary hepatocytes with more than 80% of viability were isolated from surgical liver segment. Hepatocyte-only sheets were constructed by culturing it in suitable cell density. The engineered hepatocytes/fibroblast sheets (EHFSs) were constructed by culturing hepatocytes or HepaRG cells (well-differentiated hepatic cells derived from a human liver tumor) on a fibroblast. The EHFSs showed superior expression levels of vascularization-associated growth factors (VEGF, TGF β 1, and HGF) in vitro. In addition, the EHFSs formed vascularized subcutaneous human liver tissues in mice. This technology could be expected as novel liver regenerative medicine technology.

研究分野：消化器外科・肝移植・再生医学

キーワード：再生医療 肝臓 細胞シート ヒト 移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝再生に関する研究は、幹細胞分画からのアプローチで行なわれてきたが、臨床治療では反映されておらず、依然として肝不全の究極治療は肝移植でしかない。

(2) 脳死移植が少ない本邦では、生体部分肝移植が発展してきたが、ドナーの苦痛を伴わない治療法の確立が急務である。

(3) 分離肝細胞をシート状培養することにより、高次機能を保持した状態で運搬や積層化などを行なうことが可能となり、臨床応用への道が近づくと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 手術検体より調製したヒト初代肝細胞から細胞シートを作製し、*in vitro*での機能解析を行う。

(2) ヒト肝細胞シートの重層化、肝非実質細胞との混合培養による組織再構築を行う。

(3) ヒト肝細胞シートの *in vivo*での機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト初代肝細胞の調製

肝癌等に対する外科的切除により得た非癌部組織を用い、二段階コラゲナーゼ灌流法により初代肝細胞を分離した。

密度勾配遠心により、調製肝細胞の生/死細胞を分離した。

トリパンブルーにより、密度勾配遠心前後の生存率を評価した。

(2) ヒト初代肝細胞シート (HS) の作製

温度応答性培養皿 (35 mm) に FBS を 1~3 日間、コーティングした。

ヒト初代肝細胞を $0.4 \sim 3.0 \times 10^6$ cells/dish で播種し、4 日間培養した。

培養温度を 20 に低下させ、ヒト初代肝細胞シートを作製した。

(3) 肝細胞/線維芽細胞複合シート (EHFS) の作製

温度応答性培養皿 (35 mm) にヒト皮膚由来線維芽細胞を 2.2×10^5 cells/dish で播種し、3 日間培養した。

HepaRG 細胞 (1.3×10^6 cells/dish) もしくはヒト初代肝細胞 (1.0×10^6 cells/dish) を支持細胞上に播種し、4 日間培養した。

培養温度を 20 に低下させ、EHFS を作製した。

培養培地上清を回収し、ELISA 法を用いて肝特異機能 (ヒトアルブミン)、血管新生因子 (PDGF-BB、VEGF、TGF-1、bFGF、HGF、EGF) を測定した。HS を比較対照とした。

細胞シートを免疫化学染色、微細構造解析 (TEM) した。

(4) 肝細胞シート移植

HS 及び EHFS 1 枚を免疫不全マウス (NOD SCID マウス) の皮下に移植した。

経時的に採血し、ELISA 法を用いてヒト由来肝特異タンパク (ヒトアルブミン、ヒト 1 アンチトリプシン) を測定した。

構築された皮下肝組織を免疫化学染色、微細構造解析 (TEM) した。

4. 研究成果

(1) ヒト初代肝細胞の単離手技の確立

切除間組織の背景、切除部位、手術時間、個人差により、得られた肝細胞の数、生存率、生着性が大きく異なった。切除までの虚血時間が長い場合、毛細血管に塞栓が起ることで灌流溶媒が十分に流れず、得られる肝細胞数は顕著に減少した。また、同時に肝組織内で壊死が起こることで死細胞が増加し、生存率が著しく減少した。生存率 60% 以上の場合、Percoll 溶液を用いて生細胞/死細胞を分離することで生存率 80-95% の肝細胞を安定して回収することが可能であった。

(2) HS の作製

効率的に肝細胞シートを作製するための細胞密度、培養期間等の組み合わせを検討した。 $8.0 \sim 12.0 \times 10^6$ cells/dish の密度で 4 日間培養すると、HS を作製可能であった (図 1)。細胞密度が低い場合はコンフルエントに達しないために細胞シートの作製が困難であった。一方、 12.0×10^6 cells/dish 以上の高密度の場合、良好な生着が見られないロットが存在した。

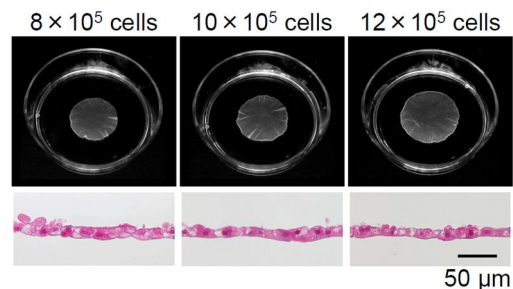


図1. 各播種密度におけるHS作製

(3) EHFS の作製 (HepaRG 細胞)

肝細胞は播種後 2 時間以内に線維芽細胞上に接着し、4 日目に EHFS を作製した。また、EHFS は播種後 24 時間以内に回収可能であった。EHFS の直径は、線維芽細胞の強い収縮によって有意に減少した (図 2)。対照的に、厚さが向上し、良好なハンドリング性能を有した。

EHFS のアルブミン産生速度は、HS と比較して有意に高値であった。PDGF-BB、bFGF、EGF の産生は、EHFS と HS の双方で検出できなかった。一方、EHFS の VEGF、TGF-1、HGF の産生は HS と比較して有意に高値であり、線維芽細胞が増殖因子を産生していること

が示された。これらの結果から、移植部位において迅速な血管誘導が期待でき、本研究の目的である血管誘導肝組織の構築を遂行し得るデバイスとなることが示唆された。

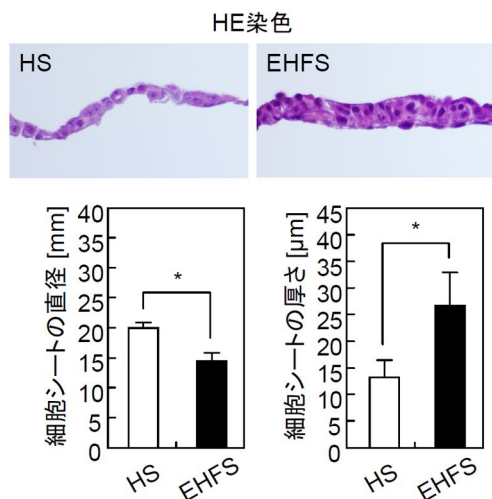


図2. EHFSの基本的な特徴

(4) EHFSの作製(ヒト初代肝細胞)

HepaRG細胞と同様に、ヒト初代肝細胞も迅速に線維芽細胞上に接着し、播種後24時間以内にEHFSを回収可能であった。細胞シートの面積は、EHFSとHS間に有意差はなかった。一方、厚さに関しては、EHFSが有意に高値であった。

EHFSのアルブミン産生速度はHSと比較して1/3程度に抑制された。HepaRG細胞と同様に、PDGF-BB、bFGF、EGFは検出されなかったものの、VEGF、TGF-1、HGFの産生はEHFSで有意に高値であった。

EHFSは、毛細胆管(タイトジャンクション、デスモゾーム、微絨毛)等の肝特異的な微細構造を再構築した。

(5) 皮下性血管誘導肝組織(VSLT)の構築

EHFS及びHSを免疫不全マウスの皮下に移植したところ、EHFS移植群で高いヒトタンパク質(ヒトアルブミン、ヒト1アンチトリプシン)濃度を検出した。

EHFSは皮下で凝集し、1週間目までに移植組織内への血管新生が見られた(VSLTの構築)。VSLTには毛細胆管が構築され、グリコーゲンの貯蔵、肝特異機能発現、毛細胆管構築、肝細胞の極性が存在した(図3)。

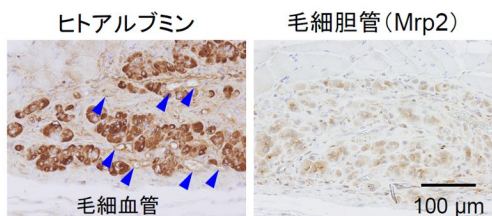


図3. VSLTにおける肝特異機能・構造

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Sakai Y, Koike M, Hasegawa H, Yamanouchi K, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Kuroki T, Okano T, and Eguchi S. Rapid fabrication of engineered liver tissue using novel fibroblast system. *ALTEX Proceedings*, **3 (1)**, 44, 2014. (査読有)

小林慎一郎, 岡野光夫, 江口晋. 細胞シート工学. *消化器外科*, 37巻8号, 1321-1332, 2014. (査読無)

Miyazaki K, Yamanouchi K, Sakai Y, Yamaguchi I, Takatsuki M, Kuroki T, Guha C, and Eguchi S. Construction of Liver Tissue in vivo with Preparative Partial Hepatic Irradiation and Growth Stimulus: Investigations of Less Invasive Techniques and Progenitor Cells. *Journal of Surgical Research*, **185 (2)**, 889-895, 2013. (査読有)

Sakai Y, Koike M, Hasegawa H, Yamanouchi K, Soyama A, Takatsuki M, Kuroki T, Ohashi K, Okano T, and Eguchi S. Rapid fabricating technique for multi-layered human hepatic cell sheets by forceful contraction of the fibroblast monolayer. *PLoS One*, **8 (7)**, e70970, 2013. (査読有)

Muraoka I, Takatsuki M, Sakai Y, Tomonaga T, Soyama A, Hidaka M, Hishikawa Y, Koji T, Utoh R, Ohashi K, Okano T, Kanematsu T, and Eguchi S. Transplanted Fibroblast Cell Sheets Promote Migration of Hepatic Progenitor Cells in the Incised Host Liver in Allogeneic Rat Model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2013. (in press) (査読有)

Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Muraoka I, Kanematsu T. Use of a stepwise versus straightforward clamping biliary drainage tube after living donor liver transplantation: A prospective, randomized trial. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.*, **19 (4)**, 379-381, 2012. (査読有)

Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Tomonaga T, Muraoka I, Kanematsu T. Elective living donor liver transplantation by hybrid hand-assisted laparoscopic surgery and short upper midline laparotomy. *Surgery*, **150 (5)**,

1002-1005, 2011. (査読有)

Eguchi S, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Muraoka I, Tomonaga T, Kanematsu T. Liver Transplantation for Patients with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Co-infection with Special Reference to Hemophiliac Recipients in Japan. *Surg Today*, **41** (10), 1325-1331, 2011. (査読有)

Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Muraoka I, Tomonaga T, Shimokawa I, Kanematsu T. Lack of Grafted Liver Rejuvenation in Adult-to-Pediatric Liver Transplantation. *Dig Dis Sci.*, **56** (5), 1542-1547, 2011. (査読有)

Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Ichikawa T, Kanematsu T. Perioperative synbiotic treatment to prevent infectious complications in patients after elective living donor liver transplantation. prospective randomized study. *Am J Surg.*, **201** (4), 498-502, 2011. (査読有)

Eguchi S, Soyama A, Mergental H, van den Berg AP, Scheenstra R, Porte RJ, Slooff MJH. Honoring the contract with our patients: outcome after repeated re-transplantation of the liver. *Clin Transplant.*, **25** (2), E211-218, 2011. (査読有)

Takatsuki M, Eguchi S, Yamanouchi K, Hidaka M, Soyama A, Kanematsu T. Technical refinements of bile duct division in living donor liver surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.*, **18** (2), 170-175, 2011. (査読有)

Eguchi S, Kanematsu T, Aarii S, Omata M, Kudo M, Sakamoto M, Takayasu K, Makuuchi M, Matsuyama Y, Monden M, for the Liver Cancer Study Group of Japan: Recurrence-free survival more than 10 years after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.*, **98** (4), 552-557, 2011. (査読有)

[学会発表](計15件)

Yusuke Sakai, Makiko Koike, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, and Susumu Eguchi. Reconstruction of vascularized subcutaneous liver tissue for minimally invasive cell therapy. ASGCT 18th Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, 13-16 May 2015.

堺裕輔、小池真章子、長谷川英子、山之

内孝彰、曾山明彦、日高匡章、高槻光寿、黒木保、江口晋。細胞シート工学を利用した血管誘導ヒト肝組織の迅速な自己構築。第115回日本外科学会定期学術集会、名古屋国際会議場(愛知・名古屋)2015年4月18日。(パネルディスカッション、指定演者)

Yusuke Sakai, Makiko Koike, Hideko Hasegawa, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Teruo Okano, and Susumu Eguchi. Rapid fabrication of engineered liver tissue using novel fibroblast system. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9), Prague, Czech Republic, 25 Aug. 2014.

堺裕輔、高槻光寿、江口晋。ヒト初代肝細胞/線維芽細胞複合シートが創造する第二の肝臓。JDDW2013、グランドプリンスホテル新高輪(東京)2013年10月10日。(シンポジウム)

高槻光寿、堺裕輔、江口晋。肝移植の代替または再生補助療法としてのヒト肝細胞シートを用いた再生医療デバイスの開発。第40回日本肝臓学会西部会、長良川国際会議場(岐阜・岐阜)2013年12月6日。(パネルディスカッション)

堺裕輔、小池真章子、山之内孝彰、曾山明彦、高槻光寿、黒木保、鶴頭理恵、大橋一夫、岡野光夫、江口晋。異所性肝組織構築のための再生医療デバイスの創製。第68回日本消化器外科学会総会、シーガイアコンベンションセンター(宮崎・宮崎)2013年7月17日。(ワークショップ)

堺裕輔、小池真章子、長谷川英子、山之内孝彰、曾山明彦、高槻光寿、黒木保、鶴頭理恵、大橋一夫、岡野光夫、江口晋。ヒト初代肝細胞/線維芽細胞複合シートによる異所性肝組織構築。第12回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)2013年3月21日。

Kosho Yamanouchi, Izumi Yamaguchi, Yusuke Sakai, Akihiko Soyama, Fumihiko Fujita, Mitsuhsa Takatsuki, Kengo Kanetaka, Tamotsu Kuroki, C. Guha, and Susumu Eguchi. Construction of liver tissue in vivo with preparative hepatic irradiation and growth stimuli. lower invasive techniques and progenitor cells; 3rd TERMIS World Congress in Vienna, 6 Sep. 2012.

Yusuke Sakai, Mitsuhsa Takatsuki, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Izumi

Muraoka, Rie Utoh, Kazuo Ohashi, Teruo Okano, Tamotsu Kuroki, and Susumu Eguchi. Development of a multilayered fibroblast/hepatocyte sheet for regenerative medicine. 3rd TERMIS World Congress in Vienna, 6 Sep. 2012.

Izumi Muraoka, Akihiko Soyama, Mitsuhisa Takatsuki, Tetsuo Tomonaga, Masaaki Hidaka, Takashi Kanematsu, Yoshitaka Hishikawa, Takehiko Koji, Rie Utoh, Kazuo Ohashi, and Susumu Eguchi. Induction of hepatic progenitor cells by transplanted rat dermal fibroblast allograft sheet on an incised rat liver. 62nd AASLD, SF, USA, 4-8 Nov. 2011.

江口晋、高槻光寿、日高匡章、曾山明彦、村岡いづみ、足立智彦、黒木保、兼松隆之。ハイブリッド手技を用いた生体ドナー、レシピエント肝移植手術。第 47 回日本移植学会総会、仙台国際センター（福島・仙台）2011 年 10 月 4～6 日。

Susumu Eguchi, Mitsuhisa Takatsuki, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Izumi Muraoka, and Takashi Kanematsu. Elective living donor liver transplantation with splenectomy by hybrid hand-assisted laparoscopic surgery and small upper midline laparotomy. 97th Annual College of Surgeons Clinical Congress, SF, USA, 23-27 Oct. 2011.

Susumu Eguchi, Mitsuhisa Takatsuki, Akihiko Soyama, Takanobu Hara, Izumi Muraoka. Elective living donor liver transplantation by hybrid hand-assisted laparoscopic surgery and short upper midline laparotomy. 12th CAST, Seoul, Korea, 25-28 Sep. 2011.

Mitsuhisa Takatsuki, Susumu Eguchi, Masaaki Hidaka, Akihiko Soyama, Tetsuo Tomonaga, Izumi Muraoka, and Takashi Kanematsu. Impact of peripheral bleed CD4+ adenosine triphosphate activity in long-term living donor liver transplantation under weaning of immunosuppression. 17th ILTS, Valencia, Spain, 22-25 June 2011.

江口晋、高槻光寿、日高匡章、曾山明彦、村岡いづみ、足立智彦、黒木保、兼松隆之。腹腔鏡補助での新しい取り組み：上腹部正中切開でのハイブリッド生体肝移植ドナー＆レシピエント手術。第 23 回日本肝胆膵外科学会学術集会、京王プラザホテル（東京）2011 年 6 月 8～10 日。

〔図書〕(計 2 件)

江口晋 共著. 再生医療用語ハンドブック 7 消化器, 128-129, 137, 139-140, 2015. 株式会社メディカルトリビューン.

江口晋、堺裕輔. 肝胆膵外科医からみた再生医療. 再生医療における臨床研究と製品開発, 第 1 章 第 1 節 [2], 8-12, 2013. 技術情報協会.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江口 晋 (EGUCHI, Susumu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・教授

研究者番号 : 8 0 4 0 4 2 1 8

(2) 研究分担者

兼松 隆之 (KANEMATSU, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・名誉教授

研究者番号 : 4 0 1 2 8 0 0 4

(3) 研究協力者

堺 裕輔 (SAKAI, Yusuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・助教

研究者番号 : 1 0 6 0 8 9 0 4