

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：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861161

研究課題名(和文) ヒト肝細胞/非実質細胞複合シートによる異所性血管誘導肝組織の構築

研究課題名(英文) Construction of vascularized ectopic liver tissue from engineered human hepatocyte sheet

研究代表者

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：10608904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：皮下における肝組織工学は、低侵襲な肝再生医療として注目されている。本研究では、ヒト初代肝細胞/線維芽細胞複合シートの開発及び皮下性血管誘導肝組織の構築を目的とした。支持細胞として線維芽細胞等を用いることによって、良好なハンドリング性能を有する肝細胞複合シートの迅速な作製に成功し、血管新生因子(VEGF、TGF β 1、HGF)の産生が優れていた。肝細胞複合シートを免疫不全マウスの皮下に移植すると、移植肝細胞組織内に血管が迅速に新生され、厚みのある皮下性血管誘導肝組織を構築した。さらに、肝不全モデルマウスの生存期間が有意に延長し、肝疾患治療の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous liver tissue engineering is an attractive and minimally invasive approach as liver regenerative medicine. In this study, we describe a subcutaneous human liver construction allowing for rapidly vascularized grafts by transplanting engineered hepatocyte/fibroblast sheets (EHFSs).

EHFSs were thicker than hepatocyte-only sheets (HSs), this result could aide in easy manipulation during transplantation. The EHFSs showed superior expression levels of vascularization-associated growth factors (VEGF, TGF β 1, and HGF) in vitro. EHFSs were transplanted subcutaneously into immunodeficient mice. The EHFSs formed vascularized subcutaneous human liver tissues (VSLTs) by rapidly neo-vascularization under mouse skin. Furthermore, subacute hepatic failure model mice with VSLT were alive at least 7 weeks after liver damage. This approach could prove valuable for establishing novel cell therapies for liver diseases.

研究分野：再生医工学

キーワード：肝細胞 細胞シート 再生医療 血管新生

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝移植に代わる肝疾患根治法として、分離した肝細胞の移植が進められてきたが、既存の血管を介する既存の移植方法では移植細胞量が制限されるため、未だ肝再生治療法として確立されていない。

(2) 日本発の細胞シート工学は、心筋や角膜再生等で既に臨床応用されているが、ヒト肝細胞シートの作製や移植に関する報告はない。

(3) 肝細胞を線維芽細胞等と共培養すると、肝特異機能の発現維持が実証されている。

2. 研究の目的

(1) 細胞シート工学と共培養技術を組み合わせ、ヒト肝細胞/非実質細胞複合シートを作製する。

(2) ヒト肝細胞/非実質細胞複合シートを異所に移植し、血管誘導された肝組織を構築する。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞/非実質細胞複合シートの作製

温度応答性培養皿 (35 mm) に非実質細胞 (ヒト肝臓由来非実質細胞: hNPC、ヒト皮膚由来線維芽細胞、ヒト脂肪由来幹細胞: ADSC、ヒト骨髄由来幹細胞: MSC) を 2.2×10^5 cells/dish で播種し、3日間培養した。

ヒト初代肝細胞を 1.0×10^6 cells/dish で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、ヒト肝細胞/非実質細胞複合シートを作製した。

(2) 肝細胞複合シートの基本性能評価

肝細胞/線維芽細胞複合シート (EHFS) における培養培地上清を回収し、ELISA 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- β 1、bFGF、HGF、EGF) を測定した。肝細胞のみの細胞シート (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。

(3) 肝細胞複合シートの皮下移植

肝細胞/非実質細胞複合シート 1 枚を免疫不全マウス (NOD SCID マウス) の皮下に移植した。HS を比較対照とした。

経時的に採血し、ELISA を用いてヒト由来肝特異タンパク (ヒトアルブミン、ヒト α -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) 肝不全モデルマウスの生存評価

EHFS 1 枚を肝不全モデルマウス (TK-NOG マウス) の皮下に移植した。

移植後 7 日、10 日後にガンシクロビルを腹腔内に投与し、肝障害を誘導した。

肝細胞複合シート移植群、非移植群の生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝細胞/非実質細胞複合シートの作製

ヒト初代肝細胞は、播種後 2 時間以内に支持細胞上に接着した。播種後 4 日目に肝細胞複合シートを作製した (図 1)。

また、播種後 24 時間以内に EHFS を回収可能であった。さらに、支持細胞の初期密度を高くすることによって、播種後 2 時間以内での回収も可能であった。

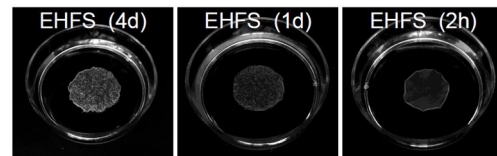


図1. 各培養日数におけるEHFS作製

(2) EHFS の特徴 (*in vitro*)

収縮後の細胞シートの面積は、EHFS と HS 間に有意差はなかった (図 2)。一方、EHFS は、HS と比較して厚く、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 の 1/3 程度であった。また、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- β 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。従って、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。

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。

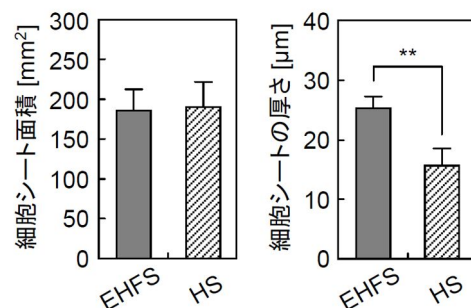
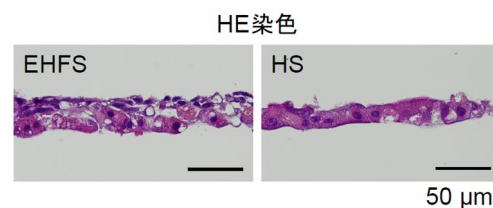


図2. 肝細胞シートの基本的な特徴

(3) 皮下性血管誘導肝組織 (VSLT) の構築
いずれの肝細胞複合シートも、HS より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。また、線維芽細胞や ADSC を含む肝細胞複合シート移植群では、hNPC や MSC を含む肝細胞シート移植群より高い活性を示した。

EHFS は皮下で凝集し、5 日目までに肝組織内に毛細血管が浸潤した。14 日目までに血管ネットワークを構築し、赤血球を含む赤い皮下性血管誘導肝組織 (VSLT) を形成した (図 3)。VSLT は、肝小葉に似た肝細胞の索状構造 (一列に並んだ肝細胞と線維芽細胞、毛細血管によって構成) や毛細胆管が構築され、肝細胞の極性を有していた。また、グリコゲンの貯蔵、アルブミンや第 IX 凝固因子の合成を維持していた。

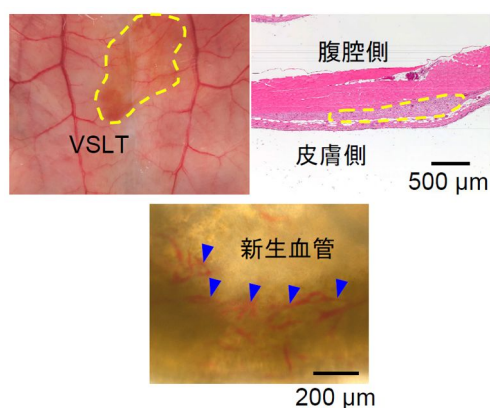


図3. VSLTの基本的な特徴

(4) VSLT による肝不全治療

非移植群は、肝障害開始後7週間以内に3/4が死亡 (生存率 25%) した。対照的に、EHFS移植群では 8/9 が生存 (生存率 89%) しており、生存期間が有意に延長した。EHFS は皮下移植であるにもかかわらず、肝不全治療の可能性を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

Yusuke Sakai, Makiko Koike, Hideko Hasegawa, Koshi Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhi Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Teruo Okano, and Susumu Eguchi. Rapid fabrication of engineered liver tissue using novel fibroblast system. *ALTEX Proceedings*, **3** (1), 44, 2014. (査読有)

Yusuke Sakai, Koji Hattori, Fumiki Yanagawa, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, and Kohji Nakazawa. Detachably assembled microfluidic device for perfusion culture and post-culture analysis of a spheroid array. *Biotechnology Journal*, **9** (7), 971-979, 2014. (査読有)

Hidekazu Yamazaki, Shun Goto, Koju Ito, Souichi Kohashi, Yuki Goto, Yukiko Yoshiura, Yusuke Sakai, Hiroshi Yabu, Masatsugu Shimomura, and Kohji Nakazawa. Micropatterned culture of HepG2 spheroids using microwell chip with honeycomb-patterned polymer film. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **118** (4), 455-460, 2014. (査読有)

Kensuke Miyazaki, Koshi Yamanouchi, Yusuke Sakai, Izumi Yamaguchi, Mitsuhi Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Chandan Guha, and Susumu Eguchi. 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)

Yusuke Sakai, Makiko Koike, Hideko Hasegawa, Koshi Yamanouchi, Akihiko Soyama, Mitsuhi Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Kazuo Ohashi, Teruo Okano, and Susumu Eguchi. 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)

[学会発表] (計6件)

Yusuke Sakai, Makiko Koike, Koshi Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhi 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, Koshi Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhi 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、小池真章子、長谷川英子、山之内孝彰、日高匡章、曾山明彦、高槻光寿、黒木保、岡野光夫、江口晋。ヒト初代肝細胞複合シート移植における支持細胞の種類の効果。第 13 回日本再生医療学会総会、国立京都国際会館（京都）、2014 年 3 月 5 日。

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）

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）

〔図書〕(計 2 件)

堺裕輔、江口晋。肝細胞移植。再生医療用語ハンドブック 7 消化器，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

研究代表者

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：10608904