

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05908

研究課題名(和文)肝細胞-内皮細胞索状組織移植による肝小葉構造を模倣した立体ヒト肝臓の創製

研究課題名(英文) Fabrication of human liver with mimicking hepatic lobule structures by alternately-arranged human hepatocyte/endothelial cell tissue transplantation

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) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞-内皮細胞索状組織(AHET)は、効率的な酸素供給、優れた生着、立体組織化、肝機能発現維持が達成できると着想した。本研究では、マイクロパターンニング技術と細胞シート工学を融合し、AHETを作製することを目的とした。マイクロ流路を用い、孔貫通型シリコンフィルム(MPSF)を作製した。MPSFの孔貫通領域に沈降・接着したヒト初代肝細胞は密に凝集し、パターン化した。HUVECと共培養し、ヒト初代肝細胞-内皮細胞索状パターンニングを作製した。hADSCは、HUVECの管腔様構造の形成を支持した。AHETを回収することができ、移植可能な組織体であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、規則的な血管網を持つ細胞だけで構成された移植用組織体の作製は困難であった。本研究では、肝小葉構造に基づき規則的に内皮細胞を配置すると共に、細胞のみで管腔構造を形成させる技術を確立した。ヒト初代肝細胞-内皮細胞索状組織(AHET)は、移植用の組織体として新しい移植医療に応用し得る可能性を秘めている。さらに、本技術を基盤として、他の機能性細胞(膵島細胞等)への迅速な応用が考え得る。これらのことから、次世代の移植再生医療技術として波及効果は多大である。

研究成果の概要(英文)：Alternately-arranged human hepatocyte/ endothelial cell tissue (AHET) could contribute to oxygen supply, survival, three-dimensional organization, and maintenance of liver-specific functions. In this study, we aimed to fabricate AHET by using micropatterning technology and cell sheet engineering. Multi-pored silicone film (MPSF) were prepared using microchannels. Human primary hepatocytes adhered to the perforated region of MPSF. The hepatocytes densely aggregated and were patterned. The hepatocytes were cocultured with HUVEC, and alternately-arranged human hepatocyte/ endothelial cell was generated. hADSC supported the formation of the luminal-like structure of HUVEC. AHET could be harvested and was an implantable tissue.

研究分野：再生医工学

キーワード：肝細胞 内皮細胞 肝臓 アレイ化 再生医療 管腔

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 重篤な肝疾患に対する根治療法は、現状では肝臓移植のみであるものの、深刻なドナー不足が問題となっている。ゆえに、肝臓移植待機期間あるいは肝不全の急性期の処置として、多種多様な肝機能を一時的にでもサポートし得る治療法の開発が望まれている。実機能を担う“ヒト初代肝細胞”移植は有効な手段と考えられるが、単離した肝細胞の著しい肝機能発現の低下、経門脈移植での頻回の塞栓等、多くの課題を抱えている。一方、培養・組織化した肝細胞を腎被膜下等に異所移植する肝再生治療が試みられている。中でも、局所麻酔での移植治療が可能かつ再移植・グラフト除去が容易な皮下は、低侵襲性と高い安全性を両立した移植部位として注目されている (Ohashi K, *et al.*, *Hepatol Res*, 2008 他)。しかし、代謝活性が高い肝細胞の立体組織化や血管網が乏しい皮下への生着は、酸素・栄養素供給と代謝産物除去がボトルネックとなり困難を極めている (Lee H, *et al.*, *Tissue Eng*, 2003 他)。

(2) 研究代表者は、ヒト初代肝細胞/線維芽細胞複合シートを作製・皮下移植し、血管誘導ヒト肝組織を構築する基盤技術を確立した (Sakai Y, *et al.*, *PLoS One*, 2013, Sakai Y, *et al.*, *Biomaterials*, 2015 他)。尿素合成や薬物代謝に関わる優れた遺伝子発現は明らかになりつつあるが、重篤な肝疾患を治療し得るレベルには到達していない。生体臓器としての肝臓は、肝小葉構造（秩序立った肝細胞と類洞内皮細胞の索状構造、ディッセ腔、内皮細胞の小孔、細胞極性）を構築することで豊富な細胞間相互作用と高い物質交換効率を実現し、複雑多岐にわたる肝機能を維持している (Bhatia SN, *et al.*, *FASEB J*, 1999 他)。すなわち、肝小葉構造に基づいた肝細胞-内皮細胞索状組織 (Alternately-arranged human Hepatocyte/ Endothelial cell Tissue; AHET) を作製することができれば、効率的な酸素供給等が可能になり、優れた生着、肝細胞の立体組織化、高い肝機能発現維持が達成できると着想した。

2. 研究の目的

(1) 肝細胞パターンニング作製技術 (Nakazawa K, Sakai Y, *et al.*, *J Bioprocess Biotech*, 2011) と細胞シート工学 (Sakai Y, *et al.*, *Biomaterials*, 2015 他) を融合させ、肝細胞と内皮細胞を交互に配列・組織化した AHET を *in vitro* で作製する。

(2) 優れたアンモニア除去活性、血液凝固因子産生等を明らかにするとともに、効率的な物質交換を実現し得る肝小葉構造を再現した皮下性ヒト肝臓を構築する。

3. 研究の方法

(1) ヒト初代肝細胞及びヒト類洞内皮細胞の調製

インフォームドコンセントを得た肝臓等の患者から外科的に切除した肝組織の非腫瘍部 (約 30 g) を用い、ヒト初代肝細胞と類洞内皮細胞を調製した。二段階コラゲナーゼ灌流法で肝組織を消化した後、50×g で 2 分間、遠心分離した。さらに 27% Percoll 溶液を用い 70×g で 7 分間、遠心分離してヒト初代肝細胞を調製した。トリパンブルー染色によって生存率が 80% 以上のものを実験に用いた。

25%及び 35% Percoll の密度勾配を作製し、肝細胞調製時の非実質細胞画分 (50g で 2 分間、遠心分離後の上清) を 900×g で 25 分間、遠心分離した。密度勾配界面の細胞を回収し、ヒト CD31 MACS ビーズ抗体でヒト内皮細胞を分取した。EGM-2 培地 (Lonza) で培養し、継代培養と MACS を複数回行った。VWF 及び F8 で免疫染色を行い、内皮細胞であることを確認した。

(2) 孔貫通型シリコンフィルム (Multi-Pored Silicone Film; MPSF) の設計及び作製

細胞パターンニングのための MPSF を既存の 35 mm ディッシュに用いるため、外径を 33 mm、内径 (培養範囲) を 29 mm に設計した。肝小葉のサイズ (グリソン鞘～中心静脈: 約 1 mm) を踏まえ、PDMS ステンシルの貫通孔は 300 μm × 1000 μm とした。

NC 型微細加工機を利用し、前述の設計条件でアクリル鋳型を切削加工した。10% Pluronic F127 (両親媒性ブロック共重合体) をコーティングしたポリジメチルシロキサン (PDMS; Sylgard 184; Dow Corning) 平板を鋳型に貼り付け、マイクロ流路を作製した。流路に PDMS を導入し、48 時間以上、室温で重合した (図 1)。MPSF を鋳型から取り外し、立体形状を SEM で観察した。

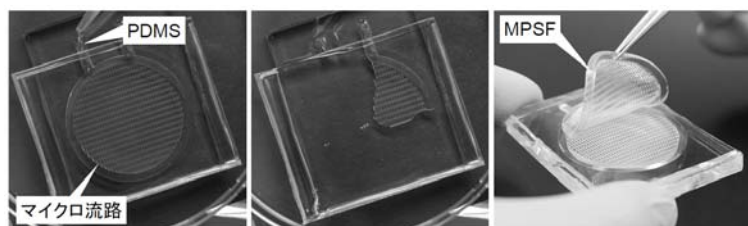


図 1. PDMS ステンシルの作製手順。鋳型と PDMS 平板を貼り合わせたマイクロ流路に PDMS を導入。重合後、鋳型から MPSF を剥離。

(3) ヒト初代肝細胞と内皮細胞のマイクロパターンニング共培養

I型コラーゲンをコーティングした温度応答性培養皿 (UpCell; CellSeed, Tokyo, Japan) にMPSFを貼り付け、培養器材を完成させた。ヒト初代肝細胞を 4.5×10^4 cells/cm² で播種して貫通孔底面に沈降させ、接着させた。培養3日目にPDMSステンシルを除去した後、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) またはヒト肝臓由来類洞内皮細胞 (hLSEC) を 5.2×10^4 cells/cm² で播種してステンシルがあった領域に接着させた。培養6日目にヒト脂肪由来幹細胞 (hADSC) を 3.1×10^4 cells/cm² で播種し、培養8日目に温度を20℃に低下させて細胞組織体を剥離・回収した (図2)。4%パラホルムアルデヒドで固定し、断面をHE染色した。

ヒト初代肝細胞と内皮細胞の挙動を観察するため、細胞をトレースすることができるCellTracker (Molecular Probes) を用いた。培養3日目にパターン化肝細胞を $10 \mu\text{M}$ CellTracker Orange CMRA で20分染色した後、 $5 \mu\text{M}$ CellTracker Green CMFDA で染色したHUVECまたはhLSECを播種した。蛍光顕微鏡及び共焦点走査型レーザー顕微鏡を用い、肝細胞 (赤) とHUVEC (緑) を検出した。同様に、 $5 \mu\text{M}$ CellTracker Green CMFDA で染色したHUVECと $10 \mu\text{M}$ CellTracker Orange CMRA で染色したhADSCを培養し、それぞれの細胞の分布を評価した。

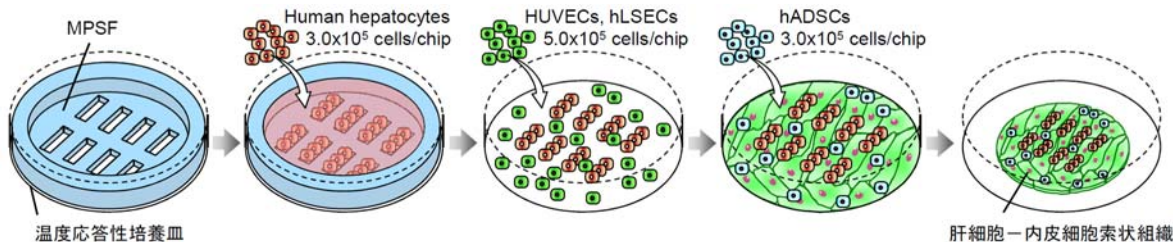


図2. AHET作製手順。温度応答性培養皿にMPSFを貼り付けた後、ヒト初代肝細胞を播種。MPSFを除去した後、HUVECまたはhLSECとhADSCを播種してAHETを作製。

(4) 肝障害モデルマウスの作製およびAHETの皮下移植

長崎大学の「遺伝子組み換えマウス作製支援」により、Fah遺伝子ノックアウトマウス (高チロシン血症I型) の作出を試みた。CRISPR-Cas9システムを利用して、Fah遺伝子のExon 9に対する2種類のgRNAを重度免疫不全マウス (NSGマウス) の受精卵にインジェクションし、産仔のジェノタイプピングを行った。

Fah(-/-)/NSGマウスの皮下にAHET及び従来の肝細胞/線維芽細胞複合シートを移植した。経時的に採血を行い、ヒト肝細胞の生着を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝組織由来内皮細胞の樹立

継代を7回、行ったhLSECのVWF及びF8に対する免疫染色結果を示す (図3)。3つの樹立したhLSECに関して評価を行い、いずれもVWF及びF8陽性であった。一方、8例中4例は、線維芽細胞が優位に増殖して内皮細胞の樹立には至らなかった。

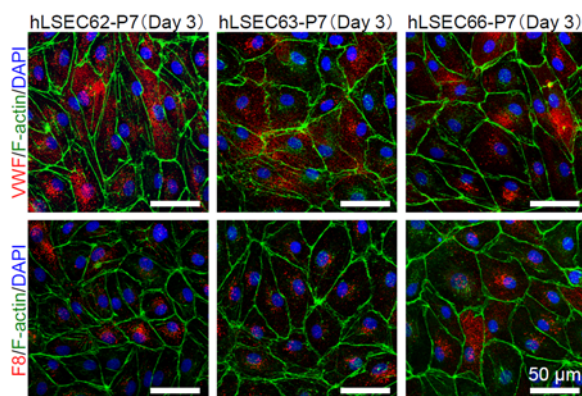


図3. ヒト肝組織より樹立した内皮細胞の免疫化学蛍光染色。いずれの内皮細胞も、VWF及びF8発現を確認。

(2) 完全な貫通孔を有するPDMSステンシル

SEM像及び貫通孔率と孔面積測定結果から、精度よく貫通孔が形成していた (図4)。あらかじめ作製した閉鎖的なマイクロ流路構造は、効率的な貫通孔形成に大いに寄与したと考えられる。さらに切削ドリルの種類によって、格子部分の立体形状をアーチ形や山形に設計することが可能であった。格子形状をアーチ形等にするにより、播種した肝細胞を効率よく貫通孔底面に沈降することが期待できる。

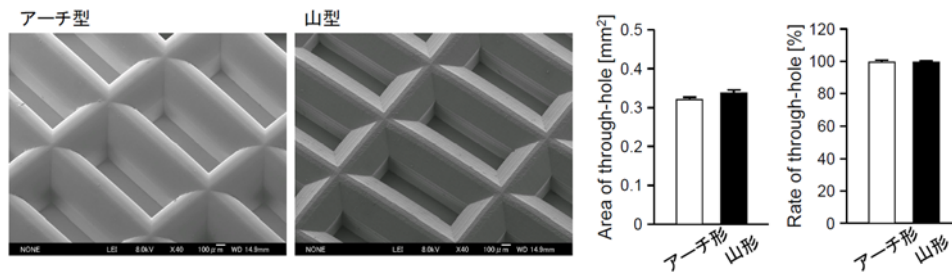


図4. MPSFの貫通孔のSEM像と形状解析。2種類のドリルで鋳型を切削加工し、作製したMPSFのSEM像(左)と孔貫通率及び面積(右)。いずれも精度よくかつ高効率に貫通孔を作製。

(3) ヒト肝細胞-内皮細胞索状組織の形成及び特徴

培養3日目までに、やや立体的な厚い肝細胞パターンを形成した(図5、上段)。MPSF部分を除く実際の単位培養面積あたりで換算すると、ヒト初代肝細胞の播種密度は 1.8×10^5 cells/cm²であり、以前報告した最適密度よりも約2倍高い。これにより立体的な肝細胞形態を示したのに加えて、パターン化して間隔を設けたことで良好な生存を維持できたと考えられる。さらに、HUVECやhLSECとの共培養によって肝細胞の伸展は抑制され、立体構造を維持した。間隙を埋めていたHUVECは、hADSC播種後1日目には管腔様構造を形成した(図5、下段)。hADSCに支持されたことによって、劇的な立体的形態変化をもたらしたと考えられる。

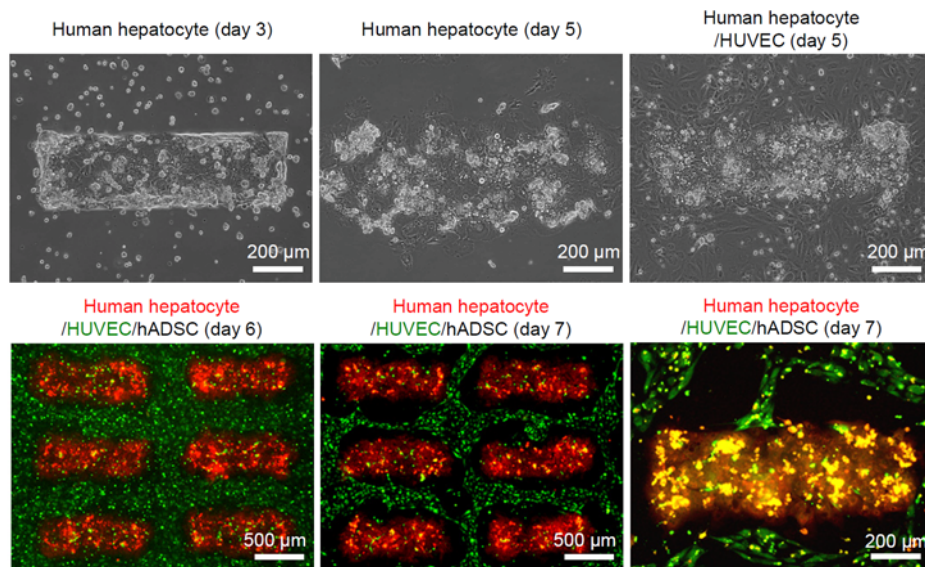


図5. ヒト肝細胞-内皮細胞索状パターンニング。位相差顕微鏡像(上段)と蛍光顕微鏡像(下段)。hADSCを播種するとHUVECが管腔様構造を形成。

肝細胞-内皮細胞索状組織断面のHE染色も同様に、立体的な肝細胞とHUVEC(hADSCを含む)が交互に配列され、一部で管腔様構造を形成した(図6)。培養組織体に血管網を構築するために、ランダムに内皮細胞と間葉系幹細胞を混合する他の研究と同様の結果であるが、細胞のみで規則的な血管網有する肝細胞組織体を作製した研究は他にない。現在、SEM及びTEMによる詳細な形態解析を進めている。

(4) 高チロシン血症I型重度免疫不全マウスの作出と応用

肝細胞-内皮細胞索状組織をより立体組織化するため、生体内培養に利用し得る高チロシン血症Iマウスを作出した。ジェノタイピングの結果、6種類の欠損パターンが確認された。いずれの遺伝子パターンにおいても、ホモ欠損マウス(Fah^{-/-}/NSGマウス)を樹立し得た。ニチシノン(phenylalanine)を断続的に与えると、肝障害を発症した。

Fah(+)/NSGマウス及びFah(-)/NSGマウスの皮下にAHET及び従来の肝細胞/線維芽細胞複合シートを移植したところ、血清中アルブミン濃度ピークは1週目及び2週目にそれぞれ示した。しかしながら、Fah(-)/NSGマウスに移植した場合にも2週以降は機能発現が低下した。皮下移植の限界であると考えられ、今後はスクラッチした肝表への移植に展開したい。

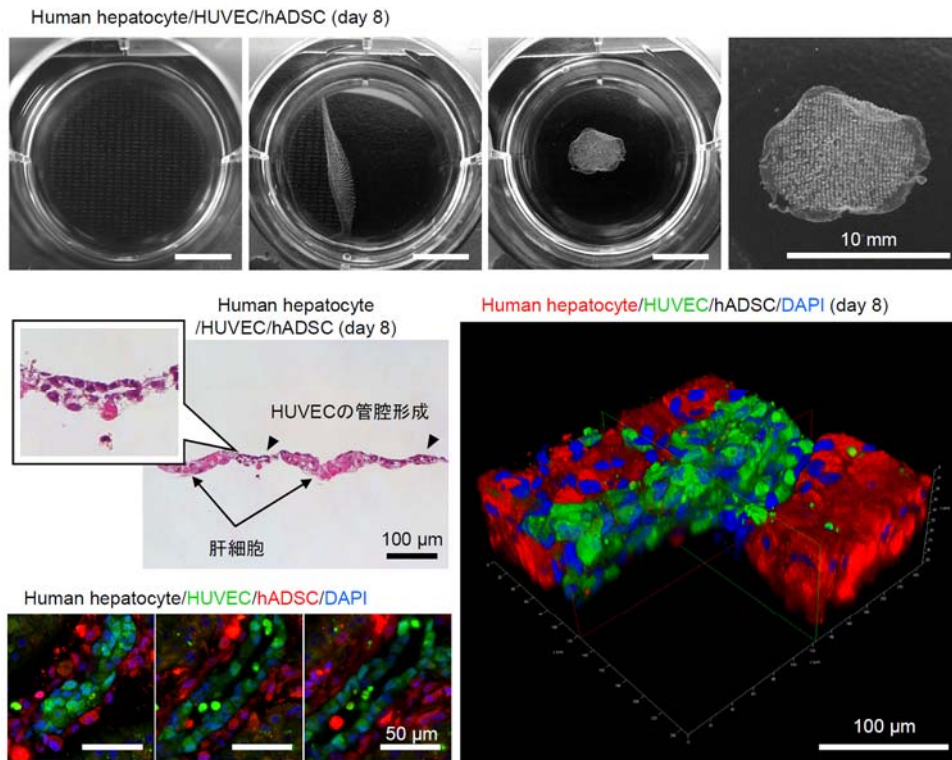


図6. ヒト肝細胞-内皮細胞索状組織。ヒト肝細胞-内皮細胞索状組織の形成過程(上段)。hADSCを播種して形成させたHUVECの管腔構造のHE染色像(断面)と共焦点レーザー走査型顕微鏡像(下段)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- ① Yusuke Sakai*, Makiko Koike, Tomomi Murai, Masaaki Hidaka, Akihiko Soyama, Mitsuhiisa Takatsuki, Susumu Eguchi. *In vitro* and *in vivo* fabrication of stable human hepatocyte tissue in combination with normal fibroblasts derived from donors of various ages. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, *accepted*. (査読有、*Corresponding author)
- ② Yusuke Sakai*, Makiko Koike, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Time-dependent structural and functional characterization of subcutaneous human liver tissue. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **12 (12)**, 2287-2298, 2018. (査読有、*Corresponding author) doi: 10.1002/term.2761.
- ③ Yusuke Sakai*, Makiko Koike, Daisuke Kawahara, Hideko Hasegawa, Tomomi Murai, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhiisa Takatsuki, Fumihiko Fujita, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Controlled cell morphology and liver-specific function of engineered primary hepatocytes by fibroblast layer cell densities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **126 (2)**, 246-257, 2018. (査読有、*Corresponding author) doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.006.
- ④ Zhassulan Baimakhanov, Yusuke Sakai, Kosho Yamanouchi, Masaaki Hidaka, Akihiko Soyama, Mitsuhiisa Takatsuki, Susumu Eguchi. Spontaneous hepatocyte migration towards an endothelial cell tube network. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **12 (3)**, e1767-e1771, 2018. (査読有) doi: 10.1002/term.2577.
- ⑤ 堺裕輔*, 江口晋. 細胞シートによる消化器の創傷治癒と機能性臓器の作製, *MEMBRANE*, **43 (2)**, 34-39, 2018. (査読無、*Corresponding author) doi.org/10.5360/membrane.43.34

他6件

〔学会発表〕(計17件)

- ① 堺裕輔、高槻光寿、江口晋、血管誘導を伴う皮下性ヒト肝組織構築での遺伝子発現解析、第119回日本外科学会定期学術集会、2019 (ワークショップ、査読有)

- ② 堺裕輔、中澤浩二、日高匡章、高槻光寿、江口晋、管腔構造を有するヒト肝細胞／内皮細胞索状組織作製技術の確立、第 18 回日本再生医療学会総会、2019（ポスター、査読有、Poster Teasers 選出）
- ③ 堺裕輔、日高匡章、高槻光寿、江口晋、血管誘導を伴う皮下性ヒト肝組織構築、第 38 回長崎障害者支援再生医療研究会、2019（口頭、査読無）
- ④ 堺裕輔、独自の培養技術に基づく皮下肝臓の創製、セミナー（フェニックスバイオ）、2018（招待講演）
- ⑤ Yusuke Sakai, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhiisa Takatsuki, Susumu Eguchi, Time-dependent liver-specific gene expressions of vascularized subcutaneous human liver tissue、5th TERMIS World Congress in Kyoto、2018（ポスター、査読有）
- ⑥ 堺裕輔、高槻光寿、江口晋、細胞シート工学を利用した血管網を有する皮下培養型ヒト肝組織作製、第 103 回日本消化器病学会総会、2017（ワークショップ、査読有）
- ⑦ 堺裕輔、第二の肝臓を皮下に創る、ものづくりライフイノベーション 最先端科学技術融合セミナー（第 1 回）、2017（招待講演）

他 10 件

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

名称：培養組織及びその製造方法
 発明者：堺裕輔、江口晋、足立智彦、黄宇
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2019-066417
 出願年：平成 31 年
 国内外の別：国内

名称：肝前駆細胞を含む細胞集団を製造する方法
 発明者：堺裕輔、江口晋
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2019-068911
 出願年：平成 31 年
 国内外の別：国内

名称：シート状物貼付デバイス
 発明者：堺裕輔、江口晋、丸屋安広、大橋文哉、鮫島正
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2018-242375
 出願年：平成 30 年
 国内外の別：国内

〔その他〕

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 移植・消化器外科
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/surgery2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
 該当なし

(2) 研究協力者
 研究協力者氏名：江口 晋、中澤 浩二、小池 真章子、山之内 孝彰、曾山 明彦、日高 匡章、高槻 光寿
 ローマ字氏名：EGUCHI, Susumu, NAKAZAWA, Kohji, KOIKE, Makiko, YAMANOUCI, Kosho, SOYAMA, Akihiko, HIDAKA, Masaaki, TAKATSUKI, Mitsuhiisa

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。