

平成 29 年 12 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15065

研究課題名(和文) 生体肝臓由来3次元scaffoldを用いた臓器形成と移植グラフトとしての可能性

研究課題名(英文) The investigation for the establishment of organ processing available for transplantation using 3-dimensional scaffold derived from natural liver

研究代表者

安近 健太郎 (Yasuchika, Kentaro)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：00378895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤によりラット肝臓から細胞を除き、肝臓の臓器骨格を得ることが可能である。これにマウス胎仔肝前駆細胞と成体肝細胞を種々の条件下に注入して至適条件を検証した。解剖学的特徴から肝細胞の注入経路としては門脈よりも胆管が有効であった。さらに、ラット肝臓の類洞内皮細胞を門脈から注入し、有効に生着することを確認した。肝細胞と類洞内皮細胞を共に注入した肝臓に血液を流し、従来よりも血栓形成が抑制されることを確認するとともに、肝細胞障害が軽減されることを確認した。この結果は将来、移植可能な人工肝臓の作製につながる可能性がある。一方、肝硬変肝臓の臓器骨格作製にも成功し、肝硬変肝臓が肝癌細胞へ及ぼす影響も検証した。

研究成果の概要(英文)：We can get 3-dimensional liver scaffold (decellularised liver) from rat normal liver after chemical treatment. The ideal protocol for recellularisation of mouse fetal hepatic progenitor cells and adult hepatocytes to decellularised liver was investigated. Bile duct was revealed to be the ideal route for recellularisation compared to portal vein because of the anatomical features. Furthermore, it was revealed that rat liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) inoculated via portal vein were integrated into the decellularised liver scaffold with hepatocytes inoculated via bile duct, and deteriorated the thrombus formation after blood circulation. In addition, we successfully decellularised the cirrhotic liver and investigated the interaction of cirrhotic liver to hepatocellular carcinoma cells.

研究分野：肝臓外科学

キーワード：再生医療 肝臓移植 組織工学 人工肝臓

1. 研究開始当初の背景

臓器に界面活性剤を還流すると細胞成分のみが除去され Extracellular matrices (ECM) が 3 次元構造を保持したまま残存する (脱細胞化)。その 3 次元 ECM を足場として新たな細胞を注入し定着させることで (再細胞化) 臓器をある程度まで再構築させる事ができる。2010 年、肝臓において脱細胞化および再細胞化した肝臓を *in vitro* で作成することに成功したという報告がなされた (Basak et al, Nature Medicine 2010)。

この技術は Decellularization (脱細胞化) Recellularization (再細胞化) Implantation (移植) の 3 段階に分ける事ができるが、これらのプロトコールにはまだ幾つかの問題点がある。

- ・細胞の viability が低い。

再細胞化に用いた初代培養成熟肝細胞はストレスに弱く、再細胞化後 3 日間で急速に viability が落ち、3 日後には約 40% 程度にまで下がる。

- ・門脈内血栓形成。

成熟肝細胞は細胞径が比較的大きいため、門脈壁の ECM の穴を通り抜けて parenchymal space へ移動することが出来ず門脈内に詰まるものが多い。これらの肝細胞は最終的に栄養を得ることが出来ず、また還流液の圧によるストレスにて壊死していく。

- ・血栓形成による血液灌流障害。

血液のヘパリン化のみでは脱細胞化肝臓の中で血小板凝集による血栓が形成され血流を維持できない。抗血小板抗体を投与すると出血のコントロールが出来ず、出血死を来すことが報告されている

2. 研究の目的

- ・細胞の生存率と機能を高める
- ・肝臓内の sinusoid 構造を再現する
- ・グラフトを移植し、生体内での肝細胞機能を評価する

3. 研究の方法

<細胞の再細胞化>

マウス胎児肝細胞を isolate して

(Yasuchika et.al, Hepatology) 培養する。その後、seeding system を用いて細胞を decellularized liver へ注入する。システムはポンプ、バブルトラップ、脱細胞化肝臓を入れた培養皿から構成され、目的の細胞を注入する。マウス胎児肝細胞は獲得できる細胞数に限りがあるため、ラット肝臓の中葉のみを使用してボリュームを減らす。次に適切な seeding protocol を決定するにあたり主な要素として、培養液の組成、循環させる培養液の速度、細胞混濁液の濃度、細

胞注入の速度、注入回数、など複数の条件を比較検討する。成熟肝細胞の場合、細胞径が大きく (径約 20 μ m) 門脈壁を通過させて parenchymal space へ移動させる際に培養液の流速を上げて物理的な力を加える必要があったが、胎児肝細胞の場合は細胞が小さいため (径約 8 μ m) 容易に parenchymal space に移動させることが出来ると考えられる。実際 hepatoblastoma の細胞株である HepG2 を門脈より注入すると、ほとんどが parenchymal space を通り抜けて IVC から排出されてしまう。そこで胎児肝細胞を用いるに当たり新しいプロトコール作らなければならない、幾つかの方法を比較し、最適なプロトコールを決定する。至適条件決定のための評価項目は後述する。

<循環培養>

再細胞化した肝臓を培養システムに移し、37 度で 3 日間培養する。培養システムは感染防止目的に閉鎖回路であること、それに伴い酸素化装置が付いている。培養液は毎日交換し、培地中のアルブミンを測定することで肝細胞の機能及び viability の指標とする。

<最適プロトコール評価方法>

parenchymal space へ移動できた細胞の割合

注入した細胞が門脈の管腔内を抜けて parenchymal space へ移動する率を算出。肝臓を 10 カ所に分割し、各エリアで無作為に門脈を 50 カ所選び、細胞が血管外へ移動している管腔の割合を計算する。

細胞の viability

parenchymal space に移動している肝細胞の viability を計算する。H&E 染色にて細胞の生死を判断することは容易ではないが、少なくとも細胞膜などの形態が保たれており、核が染まっているものを viable と判断する。上記同様のスクリーニングを行い、割合を算出後、最終的には TUNEL 染色を行い、DAPI 陽性かつ TUNEL 陰性細胞を viable と判断する。

<血管・類洞内皮細胞、間葉系細胞との共培養・再細胞化>

肝細胞の長期培養や sinusoid 構造を構築するためには肝細胞と間葉系細胞、血管・類洞内皮細胞の存在が望ましいが、マウス胎児肝臓に含まれる間葉系細胞、血管・類洞内皮細胞 (もしくはその前駆細胞) の数は少ないと考えられる。もし胎児肝細胞とそれに付随する少数の間葉系細胞、血管・類洞内皮細胞で肝細胞の viability が低い場合、あるいは十分な sinusoid 構造が再構築出来なかった場合、MEF (マウス胎児繊維芽細胞) や血管内皮細胞の初代培

養細胞を混ぜて注入する。注入のタイミングは、□胎児肝前駆細胞より前に注入する、□胎児肝前駆細胞と混ぜて同時に注入、などの方法を試みる。注入方法と併に、注入する細胞数の条件を検討し、sinusoid 様の構造の形成を行う。

< recellularized liver の移植を目指した血液灌流、肝細胞機能評価 >

肝実質細胞だけでなく、血管・類洞内皮細胞も再細胞化した肝臓に対して、まず in vitro の実験系で、内皮細胞の特性解析を特異的表面抗原発現や特異的構造形成により評価する。また、肝実質細胞の機能をアルブミン合成能や尿素合成能測定により評価する。さらに、recellularized liver に血液を灌流させ recellularized liver 内部における血栓形成能を評価する。ラット頸動脈あるいは門脈と recellularized liver を接続して血液還流した後、抗血小板抗体 (CD61 など) を用いて血小板凝集能を評価する。また recellularized liver と内部の血液還流量は IVC からの血液排出量を測定することで評価する。

4 . 研究成果

初代培養したマウス胎仔肝前駆細胞と成体肝細胞を用いて脱細胞化肝臓 (3D scaffold) への再細胞化プロトコルを種々の条件下に検証し、従来主流であった経門脈的再細胞化より経胆管的再細胞化において優位に高い生着効率 (20.1% vs 81.3%) が得られ、かつ生着した細胞の viability も高いことを確認した。その上で再細胞化後の低速循環培養プロトコル (3 時間静置に引き続き細胞培養液を 0.5ml/h の速度で 7 日間還流培養) を確立し、再細胞化された胎仔肝前駆細胞が増殖活性を保ちつつ、脱細胞化肝臓の中で肝細胞へ成熟化することをアルブミンおよび尿素合成能で確認したほか、胆管細胞への分化も組織学的に確認できたことから、再細胞化肝臓作製における細胞源として胎仔肝前駆細胞の有用性を示した。上記結果を踏まえて、肝細胞は経胆管的に再細胞化するとともに、ラット肝臓から採取・初代培養した類洞内皮細胞 (LSEC) を経門脈的に再細胞化することで、より生理的な臓器形成を試みた。再細胞化された LSEC は生着して特異的表面抗原 (SE-1) を発現することが免疫組織学的に確認されるとともに、特異的構造である fenestration 形成が電子顕微鏡的に確認された。さらに、経胆管的に肝細胞のみを再細胞化した肝臓と、肝細胞に加えて経門脈的に LSEC を再細胞化した肝臓に血液還流すると、LSEC を再細胞化させた肝臓において血栓形成が抑制されることを integrin α IIb 発現により定量的に評価しただけでなく、還流培養後の肝細胞障害が軽減されることが TUNEL 染色により確認された。また LSEC

で再内皮化した再細胞化肝臓は少なくとも 8 時間の体外循環が可能であり、移植グラフトとしての可能性を示した。一方、薬剤により誘導したラット硬変肝の脱細胞化に成功し、これに肝癌細胞株を再細胞化することにより肝硬変肝臓の 3D scaffold が肝癌細胞を上皮間葉転換させ、増殖活性を促進させることを示した。

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 2件)

1. Efficient recellularisation of decellularised whole-liver grafts using biliary tree and foetal hepatocytes. Satoshi Ogiso, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Hidenobu Kojima, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Junji Komori, Hokahiro Katayama, Takayuki Kawai, Elena Yukie Yoshitoshi, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda and Shinji Uemoto
Sci Rep. 2016 Oct 21;6:35887

2. A novel three-dimensional culture system maintaining the physiological extracellular matrix of fibrotic model livers accelerates progression of hepatocellular carcinoma cells
Yuya Miyauchi, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Satoshi Ogiso, Takahito Minami, Hidenobu Kojima, Ryoya Yamaoka, Hokahiro Katayama, Takayuki Kawai, Elena Yukie Yoshitoshi-Uebayashi, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Naoya Sasaki and Shinji Uemoto
Sci Rep. 2017 Aug 29;7(1):9827

[学会発表](計 9件)

平成 27 年度

1. 小木曾 聡、福光 剣、安近健太郎、小森 淳二、片山外大、河合隆之、喜多貞彦、安田勝太郎、吉利エレナ、小島秀信、山岡 竜也、上本伸二
脱細胞化組織を鋳型とし胎仔肝細胞を細胞源として用いた三次元人工肝臓の構築
第 51 回日本肝臓学会総会. 2015.5.21 熊本
2. 小木曾 聡、福光 剣、安近健太郎、小森 淳二、片山外大、河合隆之、喜多貞彦、安田勝太郎、吉利エレナ、小島秀信、山岡 竜也、上本伸二
脱細胞化骨格を鋳型とし肝前駆細胞を細胞源とした人工肝臓の構築.
第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会.
2015.6.11 東京

3. 小木曾 聡、福光 剣、安近健太郎、小森 淳二、片山外大、河合隆之、喜多貞彦、安田勝太郎、吉利エレナ、上本伸二
脱細胞化組織を鋳型としマウス胎仔肝細胞を細胞源とした三次元肝臓の構築
第 70 回日本消化器外科学会総会.
2015.7.15 浜松
4. Satoshi Ogiso, Ken Fukumitsu, Kentaro Yasuchika, Junji Komori, Takamichi Ishii, Hokahiro Katayama, Takayuki Kawai, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Elena Y. Yoshitoshi, Masaki Mizumoto, Shinji Uemoto
Fetal hepatocyte as a cell source of liver tissue engineering using a decellularized matrix.
The 50th international liver congress 2015.
European Association for the Study of the Liver 2015.4.24 Austria Wien
5. 小木曾 聡、安近健太郎、福光 剣、小島秀信、宮内雄也、山岡竜也、片山外大、河合隆之、吉利エレナ、喜多貞彦、安田勝太郎、上本伸二
胆管経路の選択による脱細胞化肝臓の効率的な再細胞化
第 15 回日本再生医療学会総会.
2016.3.19 大阪

平成 28 年度

6. Satoshi Ogiso, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Hidenobu Kojima, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Hokahiro Katayama, Takayuki Kawai, Sadahiko Kita, Shinji Uemoto
Optimizing recellularization of decellularized whole-liver graft: from which route and with which cell? the American College of Surgeons 102nd Clinical Congress, 2016.10.19 Washington DC, USA
7. Satoshi Ogiso, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Hidenobu Kojima, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Hokahiro Katayama, Takayuki Kawai, Elena Yukie Yoshitoshi, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Shinji Uemoto
Biliary tree as a window for repopulation of the decellularized liver scaffold.
26th International congress of the transplantation society, 2016.8.20 Hong Kong
8. 小木曾 聡、安近健太郎、福光 剣、小島秀信、宮内雄也、山岡竜也、片山外大、河合隆之、吉利エレナ、喜多貞彦、安田勝太郎、上本伸二
高機能立体肝臓の構築を目指した脱細胞化肝臓に対する再細胞化アプローチの検討 第 116 回日本外科学会定期学術集会
2016.4.16 大阪

9. Hidenobu Kojima, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Satoshi Ogiso, Yuya Miyauchi, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Hokahiro Katayama, Elena Y Yoshitoshi, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Naoya Sasaki, Takamichi Ishii, Junji Komori, Shinji Uemoto
Liver sinusoidal endothelial cell as a cell source to fabricate vasculature and maintain performance of hepatocyte in engineered liver graft
The Liver Meeting 2016. American Association for the Study of Liver Disease
2016.11.11-15, Boston, MA, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安近健太郎 (Yasuchika Kentaro)
京都大学 医学研究科 研究員
研究者番号：00378895

(2)研究分担者

上本伸二 (Uemoto Shinji)
京都大学 医学研究科 教授

研究者番号：40252449

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()