

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06903

研究課題名(和文) 創薬・薬剤試験への応用を目指した、脱細胞化細胞外基質を足場とする培養法の確立

研究課題名(英文) Establishment of cell culture system for drug development using organ derived decellularized tissue

研究代表者

福光 剣 (Fukumitsu, Ken)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：70700516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脱細胞化肝臓スキャフォールドに肝細胞癌の細胞株を生着させて癌細胞としての特性解析を行ったところ、正常肝由来の脱細胞化スキャフォールドでの培養に比べて、上皮間葉転換に関するシグナルが活性化されていることが示され、さらにそのメカニズムとしてFAKシグナルが活性化されていることが示された。つまり、硬変肝における細胞外基質には、癌細胞に対して上皮間葉転換を起こしやすい環境を提供している可能性が示された。以上より、癌細胞が存在する組織において、細胞外基質の硬さや構成要素が細胞の悪性度や転移能に影響を与えることを示した。

研究成果の概要(英文)：hepatocellular carcinoma cell line was engrafted in decellularized liver scaffold and characterized as cancer cell. As a result, it was found that the signal of epithelial-mesenchymal-transition was activated in decellularized scaffold derived from fibrous liver compared with that derived from normal liver. Adding to this, the FAK signal was activated as a mechanism. In other words, it was shown that the extracellular matrix in fibrotic liver may provide an environment susceptible to epithelial mesenchymal transition to cancer cells. From the above, it was shown that the hardness and constituent elements of the extracellular matrix affect the malignancy and metastatic potential of the cancer cells.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 人工臓器 創薬

1. 研究開始当初の背景

肝臓の機能解析は、疾病の治療目的だけでなく、創薬におけるスクリーニング検査においても重要である。しかし、肝細胞は通常の平面培養はもとより、コラーゲン培養といった特殊な三次元培養においても形質の維持や増殖は困難である。昨今iPS細胞などの多能性幹細胞を肝細胞に分化誘導する研究は盛んに行われているが、肝細胞の機能を効率よく維持する培養法は未だ確立されていない。また、創薬において、肝細胞に対する毒性を評価するにあたって適切な培養法が確立されていないため、効率の良い創薬スクリーニングの方法が求められている。

2008年にラット肝臓の細胞成分のみを取り除き細胞外基質のみを得る脱細胞化技術が報告されて以来、様々な施設で脱細胞化技術について研究が行われてきた。得られた脱細胞化肝臓組織には、臓器特異的な微細三次元構造が維持されているだけでなく、各種の成長因子も保持されているなど、生体内の細胞外環境がよく維持されていると考えられる。

この技術は、in vitroにおいて人工的な臓器を作製できる可能性がある一方、生体由来の細胞外マトリックスを、細胞成分を除去した状態で与えることができるため、より生体に近い細胞培養条件の構築に応用できる可能性を持っていると考えられ、肝臓がもともと持っている細胞外基質の構成要素が肝臓方向への細胞分化・表現型維持に有用である可能性を有していると考えられる。しかしながら、肝実質腔へ効率よく細胞を注入する技術は未だ試行錯誤が続いており、脱細胞化肝臓を用いた三次元での長期培養の報告はまだない。脱細胞化肝臓内に生着した細胞への栄養・ガス交換には、血管から培地を環流させる方法が理想的ではあるものの、手技的な難しさや感染の可能性などを常に意識せざるを得ず、実験の再現性にはやや不利であった。

我々が行った初代肝細胞の培養実験では、細胞が生着した後の再細胞化肝臓組織を分割して切り出すことで、培地を環流することなく維持が可能であった。さらに、こうして体内の細胞環境に近似した脱細胞化肝臓組織内において三次元培養されることで、通常の平面培養に比べて、成熟肝細胞の形質はより長く維持され、また肝前駆細胞の肝細胞と胆管上皮細胞の両系統への分化が促進されることを確認した。

本培養法を用いて肝細胞を培養することで、肝細胞の機能を高く維持しながら、かつ創薬スクリーニングに応用できる可能性を持つと考えられた。

2. 研究の目的

生体の肝臓から細胞成分のみを除去した「脱細胞化肝臓組織」を足場とすること

で、新たな肝細胞の三次元培養法を提案する。生体の肝臓から細胞成分のみを除去し、細胞骨格のみを温存させた3次元のスキヤフォールドは、細胞にとって、より生体に近い環境で培養する事ができると考えられ、本方法を用いることで肝臓の疾患解析だけでなく再生医療の細胞源確保や創薬スクリーニングへの応用が期待できる。

3. 研究の方法

250-300gのLewisラットの肝臓を採取し、門脈からまず37度でトリプシン、EDTAを循環させたのち、界面活性剤(0.1% Triton X)を還流することにより、肝臓を脱細胞化する。脱細胞化した肝臓は、その後の感染を予防するために、十分に滅菌を行い、PBSにて洗浄する。脱細胞化肝臓の門脈あるいは胆管より細胞を注入し生着させ、engineered liverを作製する。培養細胞としては、マウス初代培養肝細胞、マウス肝前駆細胞、血管内皮細胞や間葉系幹細胞を用いる。肝細胞は肝実質に、血管内皮細胞は血管腔に、それぞれの細胞を本来の位置へ生着させるため、例えば肝細胞は胆管から、血管内皮細胞は門脈や中心静脈から、というように、細胞腫によって注入経路を変更する。細胞を注入した脱細胞化肝臓は「再細胞化肝臓」と呼び、この人工臓器において細胞が適切に再生組織を形成しているかを組織学的に確認する。また、肝細胞機能や血管内皮細胞の機能を適切に輸しているかどうかを確認する。次に、この再生された再細胞化肝臓の被膜を切開・除去し、細胞が肝実質腔内に高密度に生着した領域を切り出し、培地内に静置する。本方法により、本来人工臓器としてあるべき血液循環を模した門脈からの培養液の還流においてはストレスにより肝細胞などが死滅することが多く観察されたが、この「静置培養」においては肝細胞をはじめとした再細胞化された細胞のviabilityが高く維持されることを観察した。

また、脱細胞化組織については、正常肝のみではなく、肝硬変の肝臓より作製した脱細胞化組織を用いることで、肝硬変における細胞外気質が細胞へ与える影響についての解析を行うこととした。細胞が細胞外気質に与える影響についての研究報告は多いが、細胞外気質が細胞に与える影響、特に肝硬変における細胞外気質の変化やそれが細胞に与える影響についての報告は少なく、その着眼点は有意義なものと考えられた。

細胞は、まず肝細胞癌の細胞株を用いて、その特性がどのように変化するかを確認する。また、その肝細胞株における機能の変化、特に薬剤代謝活性などを中心に解析を進める。

4. 研究成果

脱細胞化肝臓スキヤフォールドに肝細胞

胞癌の細胞株を生着させて癌細胞としての特性解析を行ったところ、正常肝由来の脱細胞化スキャフォールドでの培養に比べて、上皮間葉転換に関するシグナルが活性化されていることが示され、さらにそのメカニズムとしてFAKシグナルが活性化されていることが示された。つまり、硬変肝における細胞外基質には、癌細胞に対して上皮間葉転換を起こしやすい環境を提供している可能性が示された。以上より、癌細胞が存在する組織において、細胞外基質の硬さや構成要素が細胞の悪性度や転移能に影響を与えることを示した。

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 8件)

1. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Komori J, Hatano E, Kawaguchi Y, Uemoto S. SOX9 is a novel cancer stem cell marker surrogated by osteopontin in human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2016 Jul 26; 6:30489. doi: 10.1038/srep30489.
2. Kawai T, Yasuchika K, Seo S, Higashi T, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Nakamoto Y, Hatano E, Uemoto S. Identification of Keratin 19-Positive Cancer Stem Cells Associating Human Hepatocellular Carcinoma Using 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *Clin Cancer Res.* 2017 Mar 15;23(6):1450-1460. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0871. Epub 2016 Sep 23.
3. Ogiso S, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Kojima H, Miyauchi Y, Yamaoka R, Komori J, Katayama H, Kawai T, Yoshitoshi EY, Kita S, Yasuda K, Uemoto S. Efficient recellularisation of decellularised whole-liver grafts using biliary tree and foetal hepatocytes. *Sci Rep.* 2016 Oct 21; 6:35887. doi: 10.1038/srep35887.
4. Soltys KA, Setoyama K, Tafaleng EN, Soto Gutiérrez A, Fong J, Fukumitsu K, Nishikawa T, Nagaya M, Sada R, Haberman K, Gramignoli R, Dorko K, Tahan V, Dreyzin A, Baskin K, Crowley JJ, Quader MA, Deutsch M, Ashokkumar C, Shneider BL, Squires RH, Ranganathan S, Reyes-Mugica M, Dobrowolski SF, Mazariegos G, Elango R, Stolz DB, Strom SC, Vockley G, Roy-Chowdhury J, Cascalho M, Guha C, Sindhi R, Platt JL, Fox IJ. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *J Hepatol.* 2016 Dec 24. pii: S0168-8278(16)30750-4. doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.017. [Epub ahead of print]
5. Katayama H, Yasuchika K, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Kawai T, Yukie Yoshitoshi E, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Fukumitsu K, Komori J, Ishii T, Uemoto S. Generation of non-viral, transgene-free hepatocyte like cells with piggyBac transposon. *Sci Rep.* 2017 Mar 15; 7:44498. doi: 10.1038/srep44498.
6. Miyauchi Y, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Ogiso S, Minami T, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Kawai T, Yoshitoshi-Uebayashi EY, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Uemoto S. A novel three-dimensional culture system maintaining the physiological extracellular matrix of fibrotic model livers accelerates progression of hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep.* 2017 Aug 29;7(1):9827. doi: 10.1038/s41598-017-09391-y.
7. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Minami T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Fukumitsu K, Hatano E, Uemoto S. Identification of keratin 19-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma using CYFRA 21-1. *Cancer Med.* 2017 Nov;6(11):2531-2540. doi: 10.1002/cam4.1211. Epub 2017 Sep 30.
8. Kojima H, Yasuchika K, Fukumitsu K, Ishii T, Ogiso S, Miyauchi Y, Yamaoka R, Kawai T, Katayama H, Yoshitoshi-Uebayashi EY, Kita S, Yasuda K, Sasaki N, Komori J, Uemoto S. Establishment of practical recellularized liver graft for blood perfusion using primary rat hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells. *Am J Transplant.* 2018 Jan 16. doi: 10.1111/ajt.14666. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 8件)

1. Yuya Miyauchi, Kentaro Yasuchika, Ken Fukumitsu, Satoshi Ogiso, Hidenobu Kojima, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Hokahiro Katayama, Elena Y Yoshitoshi, Sadahiko Kita, Katsutaro Yasuda, Naoya Sasaki, Takamichi Ishii, Junji Komori,

- Shinji Uemoto A novel three-dimensional culture system, decellularized-tissue obtained from cirrhotic livers, enhances an epithelial-mesenchymal transition phenotype in HCC cells American college of Surgeons clinical congress 2017
2. Yuya Miyauchi, Kentaro Yasuchika Yu Oshima, Hiroshi Kawamoto, Takahito Minami, Hidenobu Kojima, Ryoya Yamaoka, Takayuki Kawai, Satoshi Ogiso, Ken Fukumitsu, Takamichi Ishii, Shinji Uemoto A novel culture system preserving natural scaffolds of fibrotic livers accelerates progression of hepatocellular carcinoma cells The Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single topic Conference on HCC 2018
 3. 宮内雄也 石井隆道 河合隆之 川本浩 大島侑 南貴人 小島秀信 山岡竜也 小木曾聡 福光剣 岡島英明 海道利実 上本伸二 細胞外基質による微小環境は肝細胞癌の不均一性に寄与する 肝癌研究会 2018
 4. Kojima H, Fukumitsu K., et al., Approaches to fabricate practical recellularized liver graft using primary liver cells-our seeding method for optimal distribution of parenchymal and endothelial cells-52nd annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) 2017
 5. Kojima H, Fukumitsu K., et al., Alternative usage of recellularized liver graft as clinical application 15th Transplantation Science Symposium (TSS)2017
 6. Kojima H, Fukumitsu K., et al., Promising application for drug screening with recellularized whole-liver scaffold 103rd Annual American College of Surgeons (ACS) Clinical Congress 2017
 7. 小島秀信、福光剣、他、生体への応用を目指した再細胞化肝臓の構築-実質細胞と内皮細胞の再細胞化法- 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017
 8. 南 貴人、宮内 雄也、小島 秀信、大島 侑、川本 浩史、山岡 竜也、河合隆之、上林エレナ幸江、安田 勝太郎、福光 剣、石井 隆道、上本 伸二 ヒト iPS 由来肝細胞様細胞とラット脱細胞化肝臓骨格を用いた臓器作製 第 20 回日本異種移植研究会 2018 年 3 月 10 日

〔図書〕(計 2 件)

1. 3 次元スキャフォールドを用いた in vitro における肝臓組織の再構築 Medical Science Digest Vol.42(2), 2016, P.4-7(P.54-57)
2. 3 次元スキャフォールドを用いた in vitro における消化器組織の再構築 Bio Clinica, Vol.6(3), 2017, P.150-153

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

<http://hbptsurgery.kuhp.kyoto-u.ac.jp/%e8%82%9d%e5%86%8d%e7%94%9f/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福光剣 (Fukumitsu Ken)

京都大学 大学院医学研究科 助教

研究者番号：70700516