

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21359

研究課題名(和文) 生体内臓器骨格を利用した新しいin situ肝再生法の確立

研究課題名(英文) Establishment of in situ liver regeneration using organ bio-scaffold

研究代表者

田島 一樹(Tajima, Kazuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：50770393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞成分を洗い流し、細胞成分以外のタンパク質を主体とする臓器の骨格のみを残す「脱細胞化」という手技を外科的手技と組み合わせ、生体内での「脱細胞化」が可能であるか検討を行った。その結果、豚において特殊な手術手技と組み合わせることで生体内において「脱細胞化」を肝臓の一部分に実施することが可能であった。これにより再生力の高い足場環境を体内に作成することが可能となる。以上のことは肝臓再生の研究や、より複雑な手術系モデルの確立など、本研究以上の知見を得ることができると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の腫瘍や肝硬変など肝臓移植が必要な患者数は多いものの、ドナー数の不足が問題となっていることから、肝臓の臓器再生が期待されている。そうした中、慶應義塾大学の我々のグループでは脱細胞化という臓器の骨格を応用した臓器再生を試みている。その一環として、生体内において自己の臓器を用いた臓器再生についての検討を行い、その可能性を見出した。その第一歩として、ヒトにおいて実際に行われているALPPSという手術手技を用いて臓器再生が可能か検討し、その可能性を見出した。本研究により、脱細胞化による臓器再生の早期の臨床応用に向け一歩踏み出すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried "decellularization", which is a technique for removal of cellular component from an organ, in the alive porcine body. As a result, to combine with special surgical technique, we achieved the partial liver decellularization in the alive porcine body. This result could reconstitute three-dimensional bio-scaffold, which is suitable for regeneration of the liver, in the body. Above all, our result facilitates to induce regeneration of the liver.

研究分野：再生医学

キーワード：脱細胞化 豚 ALPPS

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は本来高い再生能力を持つ臓器であることはよく知られているが、実際には肝硬変など線維化を伴うような不可逆的な変性を生じた際には、本来持つ再生能力に制限がかかり、完全に再生することができない。また、再生できないばかりか、障害された肝臓が生体維持に必要な最低限の肝機能を保持できなければ肝不全となり死に至ってしまう。再生する能力を失った、肝機能の低下した肝臓に対しては肝移植のみが根本的な治療方法であるが、日本のみならず全世界的に圧倒的なドナー不足のため移植ができずに死亡する症例も多い。そのため、肝臓の臓器再生が期待されているが、まだ臨床上有効性のある立体臓器の再生は、その構成細胞の多さ、構造の複雑さ、血流の維持等の観点から実現できていないのが現実である。

## 2. 研究の目的

肝移植以外の治療法がない肝不全等の症例に対し、肝臓の臓器再生の期待は高い。本研究では臓器から細胞成分を除去して細胞外骨格のみを残す「脱細胞化」という技術を応用して、自らの肝臓の一部を生体内で脱細胞化すること、またその生体内での脱細胞化技術を応用し、生体内で完結する臓器再生を目指した。今回はその第一歩として前臨床試験にも用いられる大型動物である豚を用いて、実際にヒト臨床も見据え応用の可能性について検証を行った。

## 3. 研究の方法

(1)本研究ではまず生体内における肝臓の部分的な脱細胞化を目的に、ヒトの大量肝切除時に行われる Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (以下 ALPPS) という手術手技を応用することを考えた。そのため、本術式が当科において実施することが可能か豚を用いて手術手技の確認を行った。本手術手技において重要なことは肝離断に加え、部分的な血流のイン・アウトを完全にコントロールすることである。コントロールされたイン・アウトの血管にカニューレーションを行い、生体内において肝臓の部分的な溶液の還流が可能かどうかについて検討を行った。

(2)更に、本手術手技の習得と並行し、生体内での脱細胞化において必要である短時間での脱細胞化についても検討を行った。脱細胞化については過去の報告から通常数日かかるものであるが、この時間の短縮がなければ術中に生体内で脱細胞化を行うことは困難である。少なくとも数時間程度の時間で脱細胞化を行うためのプロトコルの確立のため、摘出した豚肝臓を用いて脱細胞化の条件検討を行った。その検討項目としては、物理的な脱細胞化の一手技としてスタンダードな臓器の凍結・融解サイクルの手技が必要であるかどうか、また、化学的、酵素的な脱細胞化においてキーポイントとなる還流する溶液の種類、順序、濃度、還流速度等について検討を行った。

(3)更に、これらの検討項目を組み合わせ、実際に ALPPS を行った豚の生体内における脱細胞化が可能であるか、試薬の還流を行った。また、還流後に脱細胞化が完成した後は、再度血管を吻合し、血流を再開させ、脱細胞化肝臓に対し外部より細胞浸潤があるかどうかの病理学的な検討を行った。

## 4. 研究成果

本研究課題において重要なことは、完全に隔離できる生体内の循環系を構築し、そこにアクセス可能とすることである。それにより生体内での部分的な還流をコントロールし、局所での脱細胞化溶液の還流を可能とする。そのため、まずは本研究課題において ALPPS の術式を確認・実行することが重要であった。局所の循環をコントロールできなければ、脱細胞化のための試薬が大循環に流れ込んでしまい、全身の他の臓器等へ影響を与えてしまうこととなり、生体を生かした状態で脱細胞化することが不可能となるためである。

ALPPS の術式においては主要な門脈・肝静脈系を残存させつつ肝実質の離断を行うという高度な外科技術が必要であったが、研究代表者の所属する慶應義塾大学外科学教室にはヒトの肝移植等高度な外科的手技の経験・実績のある外科医が多数在籍している状況であったことから、彼らの手術手技を学ぶことで、実際に豚で実施することが可能であった。ヒトと異なり豚の肝臓の葉間裂は明瞭で、肝実質の離断においては葉間裂を基準に進めることで離断の距離をヒトと比較し短縮することが可能であったが、肝実質や内部の血管はヒトと比較し非常に脆いため、結紮や肝離断にはより高度な技術が必要であった。ただし、バイポーラなどのエネルギーデバイスを活用することで出血のリスクを低減することは可能であった。超音波破碎装置などがあればより安全に手術が可能であると思われた。この術式の確立により、生体内臓器において局所のイン・アウトを完全にコントロール可能な脈管を確保することができ、生体内臓器において部分的に循環系を完全に確保することが可能となった。このことは、脱細胞化溶液をターゲットとする部位のみに還流させることができることを意味する。加えて、ALPPS モデル動物の確立を可能とし、ヒトの ALPPS の術式における生存率上昇を検討する際の研究等においても役立つ可能性がある。

また、生体内における部分的な脱細胞化を行う際の注意点として、開腹下の手術中に脱細胞化を行う必要がある。今までに報告のあるような数日間をかけた脱細胞化の手法では、何日も開腹の状況のまま脱細胞化を行うということとなり、実際の臨床における実用化は難しい。そこで今後のヒトへの応用を考えた際に、ALPPSモデル豚の作出後、より短時間(少なくとも数時間)での脱細胞化が実現可能か、その脱細胞化の手法について検討を行った。脱細胞化には物理的な手法、化学物質を使用する手法、酵素を使用する手法などが報告されている。これらの組み合わせで脱細胞化する方法が最も効果的であると考えられているが、本研究においては実際にこれらの最適な組み合わせにより短時間での有効な脱細胞化の手法について検討を行った。その結果、これら3つを適切に組み合わせることで今まで報告のあった数日かけて行う脱細胞化の手法を圧倒的に時間的に短縮することに成功し、数時間での脱細胞化の手法について見出すことができた。これは過去に報告のない超短時間での脱細胞化である(図1)。

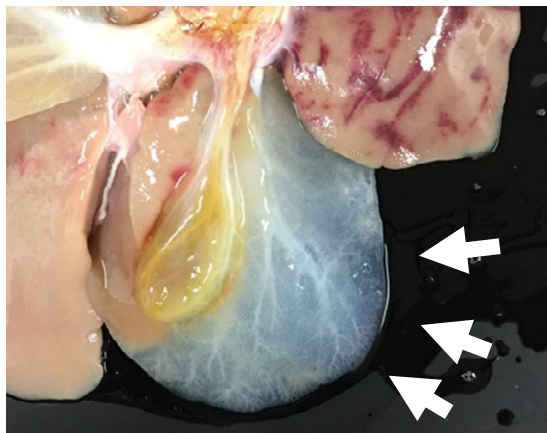


図1 超短時間での肝臓の部分的な脱細胞化  
細胞成分が除去され肝臓が透明化している  
(矢印)

この超短時間での脱細胞化骨格について病理学的手法(H.E.染色、DAPI染色)によって脱細胞化の完全性について確認したところ、細胞成分の完全な除去および核成分が除去されていることが証明された。加えてこの超短時間の脱細胞化骨格は免疫染色によってCollagen type IV、Laminin、Fibronectinといった細胞接着に非常に重要な基底膜タンパク質の残存が確認された。このことは脱細胞化骨格に細胞が再度生着することが可能であることを示唆している。

以上の結果を踏まえ、実際に豚を用いてALPPSを実施し、更にそのコントロールされたイン・アウト血管にカニューレーションを行い、そのカニューレーションを用いて確立された超短時間型の脱細胞化手法を生きた豚の体内で実施した。その結果、生きた豚の体内において部分的な脱細胞化が実施可能であることがわかった。更にその豚からカニューレーションを除去し、血管の再吻合を行うことで脱細胞化骨格に血流を再開させることが可能であった。この結果は、実際の臨床においても生体内における部分的な臓器の脱細胞化は可能で、これを臓器再生等に应用可能であることを示した。

更に、この血流を再開させた豚は少なくとも1週間は全く問題なく生存可能であることが本研究結果よりわかった。このことから実際にヒトで応用可能な手法である可能性が再確認された。今後は更に生存期間を延長させ長期での生体内における脱細胞化臓器の病理結果を得ること、細胞を注入しその細胞の生着、増殖等の挙動を確認することで早期の臓器再生に向けた研究を進めていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kazuki Tajima, Hiroshi Yagi, Yuko Kitagawa. Human-Scale Liver Harvest and Decellularization for Preclinical Research. *Methods in Molecular Biology*, 査読有り, 2018. 1577 (327-335). DOI; 10.1007/7651\_2018\_195

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 黒田晃平、八木洋、東尚伸、田島一樹、篠田昌宏、北川雄光.  
脱細胞化臓器骨格を用いた肝臓再生の試み.  
第25回肝細胞研究会. 2018.
2. 東尚伸、八木洋、田島一樹、日比泰造、阿部雄太、北郷実、篠田昌宏、板野理、登美齊俊、水口裕之、北川雄光.  
生体由来脱細胞化臓器骨格に肝細胞ないしヒト iPS 細胞由来肝細胞を充填した再生補助肝の再生医療応用への技術創出.  
第118回日本外科学会定期学術集会. 2018.
3. 田島一樹、八木洋、東尚伸、木下梨恵、村川奈帆、伊藤早葵子、北川雄光.  
生体内における自己肝臓脱細胞化のための最適な条件の検討.  
第160回日本獣医学会学術集会. 2017.

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。