

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390351

研究課題名（和文）肝細胞移植および肝組織作製治療の実現化にむけた前臨床研究

研究課題名（英文）Preclinical study in hepatocyte transplantation and regeneration of liver tissue

研究代表者

中島祥介 (NAKAJIMA YOSHIYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142381

研究成果の概要：

肝不全治療としての肝臓移植に代わる治療として、肝細胞移植に関する研究を行い、肝臓外への肝組織構築の実現化に向けた研究を行った。特に新たな組織工学的手法を用いて、culture dish の上で 2次元、3次元肝細胞シートを作成し、マウス皮下に「場」を確保し、移植した。その結果、皮下からの血管新生が促進され、細胞が安定して肝細胞としての機能を保持したままで、マウスの皮下に長期間生着させることに世界で初めて成功した。組織学的あるいは血清中のアルブミンや血液凝固因子の解析から肝機能が維持される事を明らかとした。同時に再生能力を有する事も明らかとなった。この効果は 200 日以上にわたり、維持される事が判明し、これまでに報告のない研究成果となった。肝臓が作るタンパク質等の物質のうち、比較的少量でも人体に十分である血友病などにおいては、その臨床効果は十分にあると予想される。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・外科学一般

キーワード:移植外科学

1. 研究開始当初の背景

末期の肝不全治療としての肝臓移植は、国内外において定着しているが、一方で慢性的なドナー不足や日本特有の様々な事情による脳死移植医療の停滞は深刻な問題である。これらの

諸問題を克服するために、根本的な解決策としての人工臓器の開発は古くから試みられているが、未だ臨床応用、効果は限られているのが現状である。肝細胞移植は、以前より注目されてい

るものの、成熟ヒト肝細胞培養の困難さから、未だ確実な臨床応用は達成されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞移植および肝臓外への肝組織構築の実現に向けての基礎的および臨床応用を目指した発展的研究を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 肝不全病態発症機構の解明および治療法の確立に向けた基礎的研究

マウス 70%肝切除あるいは虚血モデルを用いて、さらに種々のシグナル伝達経路の解析あるいはサイトカイン、ケモカイン、接着因子等の機能発現の解析、さらに apoptosis の関与等について詳細な分子生物学的解析を行う。これらの解析により、肝不全治療に向けての標的分子あるいはシグナル経路が判明するものと考えられる。

(2) 遺伝子導入肝細胞の長期間培養下での機能解析

これまでに確立したアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を行った肝細胞をさらに長期培養し、導入遺伝子の発現の変化、肝細胞の機能評価を行う。本実験から臨床応用に向けて、より現実的な移植肝細胞の機能維持、機能発現についての評価ができるものと考えられる。

(3) ヒト肝細胞長期間培養下での機能解析

ヒト肝細胞の長期培養を行い、遺伝子導入効率あるいは移植後の長期の生着率等について検討する。上記実験の結果とあわせて、臨床肝細胞移植への課題を明らかとできるものと考えられる。

4. 研究成果

肝細胞を利用した様々な治療法の確立にむけて、ヒト肝組織からの成熟肝細胞の分離手技の確立および小動物を用いた肝不全治療実験を行った。

(1) 肝不全病態に対する肝細胞を用いた治療法の確立 マウスの 70%肝切除し、さらに残葉の 2/3 の流入血行を遮断することにより、劇症肝不全を誘導した。無処置マウスに本劇症肝不全を誘導した際は、全てのマウスが 24 時間以内に死亡することを確認。この劇症肝不全病態における成熟肝細胞を用いた肝組織作製の治療効果を検討した。劇症肝不全を誘導する 3 日前に、肝細胞を用いて腎被膜下に小肝組織を作製したところ、マウスの生存期間の延長を認め、10% のマウスにおいて救命に成功した。

(2) 遺伝子導入肝細胞を用いた治療法の確立 肝組織作製に用いる分離肝細胞の高機能化を図ることにより劇症肝不全の治療効果を高めることを目的に、肝細胞に HGP 遺伝子を導入した。我々の開発した遺伝子導入法に従い、アデノウイルスベクターを用いて HGF 遺伝子を導入し、腎被膜下に小肝組織を作製したところ、遺伝子非導入の通常肝細胞にて肝組織を作製した群と比較し、有意なマウスの生存期間の延長を認めた。

(3) ヒト肝細胞分離技術の確立と培養下機能評価 奈良県立医科大学附属病院において、転移性肝癌等の疾患のため肝部分切除にて摘出された肝臓標本の癌部以外の正常肝組織を用いて、肝細胞分離を行った。分離は、2 段階コラゲナーゼ還流法を基本に一部修正して行った。コラゲナーゼの選定、コラゲナーゼ濃度、および還流速度と温度の観点から、ヒト肝細胞分離法の至適化を行った。その結果、viability80%以上

(トリパンブルー染色法)の肝細胞を得ることが可能となった。また、ヒト肝細胞を初代培養したところ、良好な接着を示すとともに、アルブミン等の蛋白発現や、リドカインの代謝能力の機能評価においても良好な肝機能を発揮することを確認した。

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4件)

1. Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Nakajima Y, Okano T, Yoshioka A. Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. *Transplantation*. 2008; 86(1):167-70.
2. Kasuda S, Kubo A, Sakurai Y, Irion S, Ohashi K, Tatsumi K, Nakajima Y, Saito Y, Hatake K, Pipe SW, Shima M, Yoshioka A. Establishment of embryonic stem cells secreting human factor VIII for cell-based treatment of hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2008;6(8):1352-9.
3. Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Shibata M, Naka H, Shima M, Hisanaga M, Kanehiro H, Okano T, Yoshizato K, Nakajima Y, Yoshioka A. Successful in vivo propagation of factor IX-producing hepatocytes in mice: potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb Haemost*. 2008;99(5):883-91.
4. Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Kanehiro H, Tsutsumi M, Amanuma T, Iwata H, Yang J, Okano T, Nakajima Y. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med*. 2007;13(7):880-5.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島祥介 (NAKAJIMA YOSHIYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00142381

(2)研究分担者

大橋一夫 (OHASHI KAZUO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50405388

柴田 優 (SHIBATA MASARU)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40364062

(3)連携研究者

なし