

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18390371
 研究課題名 (和文) 慢性肝不全治療のための埋め込み型人工肝臓の開発および腎臓の肝臓化
 研究課題名 (英文) Development of implantable artificial liver and hepatic transformation of the kidney for treatment of chronic liver diseases.
 研究代表者
 矢永 勝彦 (YANAGA KATSUHIKO)
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 70220176

研究成果の概要： 慢性肝不全治療のための埋め込み型人工肝臓の開発および腎臓の肝臓化を目的とした。その中軸は、われわれの施設で開発したラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) システムである。1)細胞源としてのFetal porcine liverの有用性、2) RFB systemによる体外循環バイオ人工肝臓の有効性。3) アパタイトファイバースキャホールド (AFS) とマウス不死化細胞のRFB混合培養により作成した肝オルガノイドの埋め込み型人工肝臓への応用。4) ヒト正常肝細胞の凍結保存法の開発、の4点について成果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学／消化器外科学

キーワード： 肝不全、埋め込み型人工肝臓、RFB、肝オルガノイド、セリシン、胎児肝、脳症

1. 研究開始当初の背景

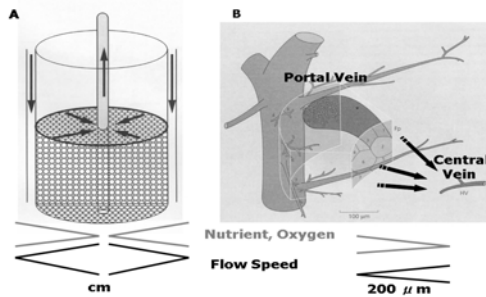
近年の臓器移植および再生医学の発達はめざましいが、臓器移植ではドナー不足が問題となっている。このような状況の中、再生医学はその問題を解決する医療分野として、特に注目されている。一方、現時点では内胚葉系に関し、臨床応用にはかなりの壁があり、さらなる技術的進歩が必要とされる。肝の再生分野では、肝細胞源の候補として、種々の細胞が検討されているが、実践的な臨床効用段階の報告はない。現時点では末期肝疾患の

治療には肝移植が最も実用的であるが、早急に再生医学を活用した有効な治療法を確立する必要がある。これらの研究を遂行するにあたり、それを支える我々の研究基盤にあるものは、ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) およびアパタイトファイバースキャホールド (AFS) である。

(1) RFB について

RFB の特徴は、円筒形のリアクター内に多孔性の細胞培養体ビーズ充填し、培養液を中心部に放射状に灌流することで、酸素・栄養素の偏向が小さい特徴を有し、このため肝細胞

の高密度・大量培養を可能とする。Fig. 1にRFBの基本的構造を示す (A: RFBの基本的構造, B: 解剖学的に肝小葉構造に類似)。
Fig. 1 RFBの基本的構造



(2) AFSについて

アパタイトは生体内でほとんど吸収されないが、これは体液中のカルシウムおよびリン濃度に対して、既に過飽和であることによる。アパタイトファイバースキャホールドは、生体で溶解されやすいa面を多く露出させるように設計されており、気孔率も98%以上でファイバーが絡み合っ骨格が形成されていることにより実質系臓器への適応も充分可能である。

2. 研究の目的

肝硬変に代表される慢性肝不全治療のための埋め込み型人工肝臓の開発および腎臓の肝臓化をメインテーマとし、さらに切除肝のヒト肝細胞(肝組織)を利用した埋め込み型人工肝臓も見据えた研究を行うことを目的とする。一方、我々の施設では、以前より急性肝不全に対しRFBによる体外循環式のバイオ人工肝の前臨床試験を行っており、上記内容に追加して報告する。

3. 研究の方法

(1) Fetal porcine liverを用い作成した肝オルガノイドの形態学および機能評価

妊娠したブタより胎児を取り出し、その肝を摘出し、コラゲナーゼ法にて細胞を分散。肝細胞と非実質細胞を添加因子(特にhepatocyte growth factor: HGFが重要)にてRFB培養にて肝オルガノイドを作成。形態学的検討(一般組織、免疫組織、電顕)およびアンモニア負荷試験を行い評価した。
群: FME35 or 56 group (ASF104+FM), LEF35 or 56 group (ASF104+FM+HGF 20 ng/ml), HFE group 35 or 56 (ASF104+FM+HGF 100 ng/ml)
ASF104: 基本培養液、FM: 基本添加因子、E: embryonic day

(2) 急性肝不全モデルに対するRFB systemによる体外循環バイオ人工肝の効果

ミニブタを用いて 1) 脳波用電極装着、2)

0.05 mg/kg α -amanitin、1 μ g/kg LPS を脾静脈より投与、3) 頸動静脈にカテーテル挿入、4) 脳波モニタリング。ヒト肝細胞癌細胞株であるFLC 4を細胞源としてRFB培養し、それを体外循環システムに用いて、生存に与える影響を評価した。

(3) マウス不死化肝細胞および非実質細胞を用いたRFB+アパタイトファイバースキャホールドシステムによる肝オルガノイドの作成および移植

SV40 large T Ag を組み込んだH-2kb-ts-transgenic mouse から樹立した不死化肝細胞(IMH-4)、不死化伊東細胞(A7/E28)および不死化類洞内皮細胞(M1)を特別な添加をせず、基本培養液にてRFB培養して肝オルガノイドを作成。形態学および肝特異的遺伝子の発現(albumin, connexin (Cx)26 and 32, HNF-4 α , TAT, G6Pase)を検討し、それを腎被膜および大網に移植し、4週および8週後に摘出し、大きさおよびその組織学および肝特異的遺伝子の発現を検討した。mono IMH group: IMH-4 単独培養、co-culture RFB group: IMH-4+A7/E28+M1 共培養

(4) ヒト正常肝細胞の新しい凍結保存法の開発

1) 正常ヒト肝細胞を大日本住友製薬株式会社から購入。2) 郵送された肝細胞をControl群とした。3) 2週間TCプロテクターにて2週間凍結保存: FBS+DMSO with or without seiren (0.5, 1, or 2%)、4) 3-4日間でコンフルエント: Real-time PCRにて肝機能遺伝子を解析(10種類: HNF4, C/EBP, Alb, AFP, ApoA1, CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4, G6Pase, TAT)

4. 研究成果

(1) 体外循環バイオ人工肝臓の開発

欧米と日本においてバイオ人工肝臓の有有用性についての報告はあるものの、その実用性は困難を極めている。各研究者がそれぞれのデバイスを用いて検討しているが、我々の施設ではRFBを利用した人工肝臓を開発した。人工肝臓の作成に関しては、細胞源、足場(scaffold)、増殖・分化調節因子(環境)の三要素が重要であるが、これまでの検討からその可能性と問題点を報告する。1) Hepatic reconstruction from fetal porcine liver cells using radial flow bioreactor. World J Gastroenterol 14: 2740-2747. 2008

Fetal porcine liver cells および nonparenchymal cells を細胞源として、RFB培養にて肝オルガノイドを作成、形態学およびアンモニア負荷にて肝オルガノイドとしてのbiological functionを検討した結果を以下に示す。

① 一般組織学および免疫組織学的検討

(Fig. 2)

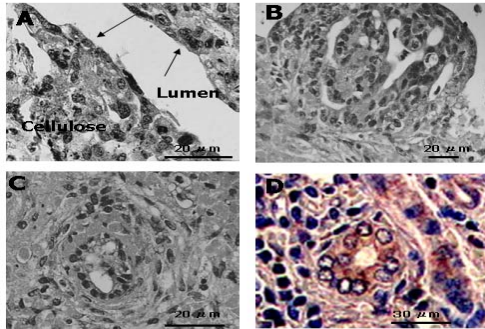
A: RFB内のセルロースには細胞が付着し、肝実質系、非実質系細胞が重なり肝組織として重なり合うように再構築。

B: セルロースから剥がれ、浮遊した状態で培養されたRFBの下層の肝組織は、まさに「ミニ肝臓」であり、一部に柵状の構造を認める。

C: 胆管様構造。

D: 胆管のマーカーとしてのCytokeratin (CK) 19の発現。

Fig. 2 Fetal porcine liverを用いた肝オルガノイドの一般組織および免疫組織所見



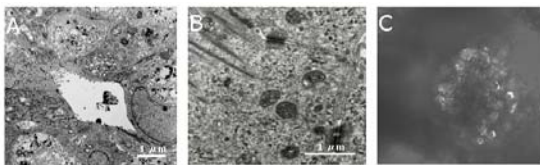
②電顕 (TEM) および免疫組織染色 (Connexin: Cx 32) (Fig. 3)

A: 胆管様構造 (Microvilli)。

B: Junctional complexes と tight junction の発現。

C: 肝細胞の gap junction の主要構成蛋白である connexin 32 の免疫組織染色では、それが渦巻くように発現。

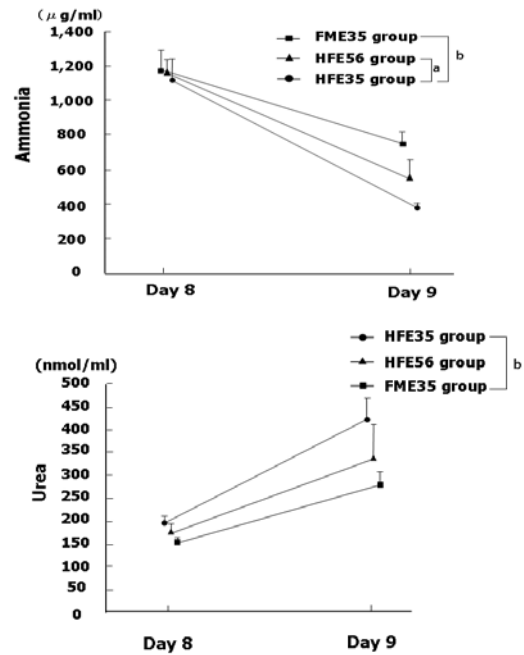
Fig. 3 肝オルガノイドの電顕および免疫組織 (Cx 32) 所見



③アンモニア負荷試験 (Fig. 4)

酸素消費量が良好で、形態学的にもミニ肝臓として良く再構築されていた group HE35、AFのみを添加した group E35 および group HE56 間で比較検討した結果、group HE35 でアンモニアの減少と尿素の増加の変化率が高く、アンモニア濃度の上昇により尿素サイクルが回転し、尿素合成を開始したと考えられた。

Fig. 4 肝オルガノイドのアンモニア代謝



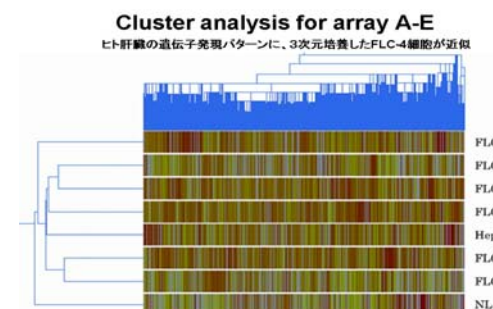
まとめ: プタ胎児肝は解剖学的、生理学的な特性がヒトに似ており、妊娠期間はおよそ112-116日で多胎性であるため繁殖が容易、Specific Pathogen Free条件の飼育が可能で外来病原体を保有しない臓器が得られるなどの利点がある。しかし、ブタは人に対してdiscordantであり、レシピエント血中にドナーに対する自然抗体、 α -galactose抗原に対する抗Gal抗体が存在し、超急性拒絶反応が発生する。また内在性Porcine endogenous virus (PERV)の感染も問題となる。この問題を解決するため、GalTノックアウトブタが作成され、さらにはin vitroでヒトへの感染性がない系を選択し、飼育している施設もあり、重要な細胞源として期待できる。また、fetal hepatic cellsをRFB培養systemで培養するときには、高濃度HGFのパルスの添加の条件下でE35が有力な細胞源となり得ると思われた。また、これらを体外循環型バイオ人肝臓として応用可能と考えた。

2) Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fetal experimental hepatic encephalopathy. *Artificial Organs* 31: 148-170, 2007.

①細胞源の選択

Cluster analysisにより、当施設で樹立した高機能ヒト肝癌細胞株FLC4が正常肝細胞に近く細胞源として用いた。

Fig. 5 Cluster analysis for array A-E



②急性肝不全モデル

α-アマニチンによって誘発した肝不全の典型的な血液生化学値の推移の特徴としてASTが著明に上昇すると共に、総蛋白と総コレステロール値の低下を認めた。脳波はアマニチン投与後、早期より徐波化した。

③RFB体外循環による前臨床試験

カラム内にFLC-4を充填しない状態で体外循環を施行した3例はいずれも、肝不全を回避できずに死亡した。一方、FLC-4を用いて体外循環を施行した3例では、アマニチン投与後に肝不全を呈したが体外循環施行後に生化学dataが改善し、3例とも生存した。特に重要と思われたのは、肝不全における脳浮腫の悪化を抑制できたことが、生存に大きく寄与したと考えられた。体外循環を施行し救命し得た例の脳波の経時変化では、速波は投与後10時間後には消失し、徐波化が認められたが、体外循環施行後7時間では再び速波が認められた。

まとめ：肝不全に対するバイオ人工肝による体外循環治療は、現段階では、その容量、治療継続時間への制約などから、臨床的実用性にはさらに工夫が必要である。しかし、今回の検討から、脳浮腫などを抑制することが示唆された。このことは脳浮腫の起因物質の同定により（現在、S-100βなどに注目）、臨床実用化に近づくものと思われる。

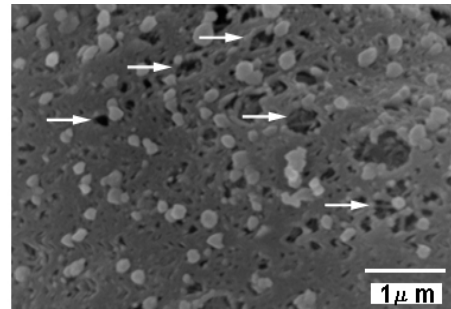
3) Transplantation of the liver organoid reconstructed using an apatite-fiber scaffold column in the radial-flow bioreactor.

以上の体外式のバイオ人工肝の問題点から、埋め込み型の人工肝臓は臨床応用により近いデバイスとして考えた。その一歩として、正常ヒト肝細胞を細胞源とすることが理想ではあるが、その前段階として小動物を使用した実験系にてその可能性を探求した。

①Structure of cells co-cultured in RFB system

一般組織像では、類円形のIMH-4が積み重なり、高密度に培養された。その表面を扁平な形をしたM1が覆うように位置し、高密度の培養が可能であった。島状の肝細胞の間に、迷路状の流路を所々に認めた。SEMによる強拡大の観察では、細胞が、格子状に組み合わさったapatite fiberのchannelに侵入し、立体的に増生していた。channel中で培養されたマウス不死化肝細胞は半球形を呈し、細胞表面に肝細胞に特異的な微絨毛を認めた。IMH-4を覆うように配列する、扁平なM1を認めた。また、下記のように直径500-800nm程の小孔を、M1の表面に認めた (Fig. 6)。

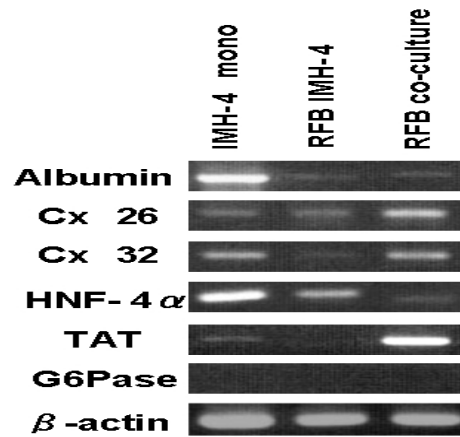
Fig.6 肝オルガノイドのM1の電顕像



②Gene expression of organoid cultured in RFB system

mono IMH-4 group では、albumin および HNF-4α の強い発現を認めた。co-culture RFB group では mono IMH-4 group と比較し、Cx 26&32 および TAT の発現が強かった (Fig. 7)。

Fig. 7 肝オルガノイドの遺伝子発現



③ Morphology of transplanted liver organoid

移植後8週では、co-culture RFB group を移植した群では、オルガノイドは黄白色を呈し、周囲組織との間に、毛細血管化 (Capillarization) を伴って生着していた (Fig 8a: 腎皮膜移植群、Fig. 8b: 大網移植群)。一方、IMH-4 RFB group を移植した群は、生着を認めず、組織学的にも、壊死像を呈していた。co-culture RFB group の移植後の大きさの変化について、その長径を計測すると肝臓オルガノイドの長径は、kidney、omentum group とともに移植後4週、8週で明らかに増大していた (各 P<0.05) (Table 1)。

Fig. 8 肝オルガノイド移植後 (8 週) の肉眼的所見

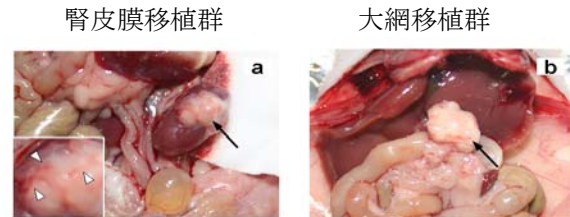


Table1: Change in the diameter of transplanted organoids

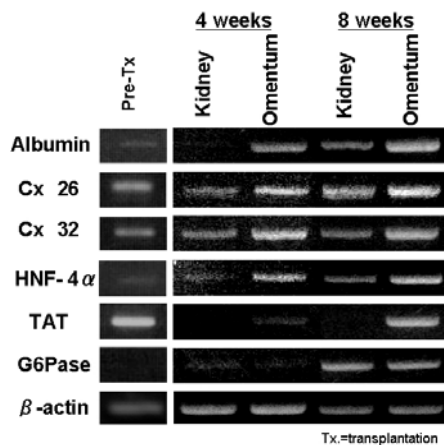
	Maximum size (mm)		
	Before Tx.	After Tx.	
		4 weeks	8 weeks
Kidney group	2.50±0.32 ^{a,b}	4.60±0.65 ^{b,c}	7.50±2.12 ^{a,c}
Omentum group	2.80±0.22 ^{d,e}	5.50±0.50 ^{d,f}	8.50±1.37 ^{e,f}

^{a, b} $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, ^{d, e, f} $P < 0.01$

Tx.=transplantation

④ Gene expression of transplanted liver organoids

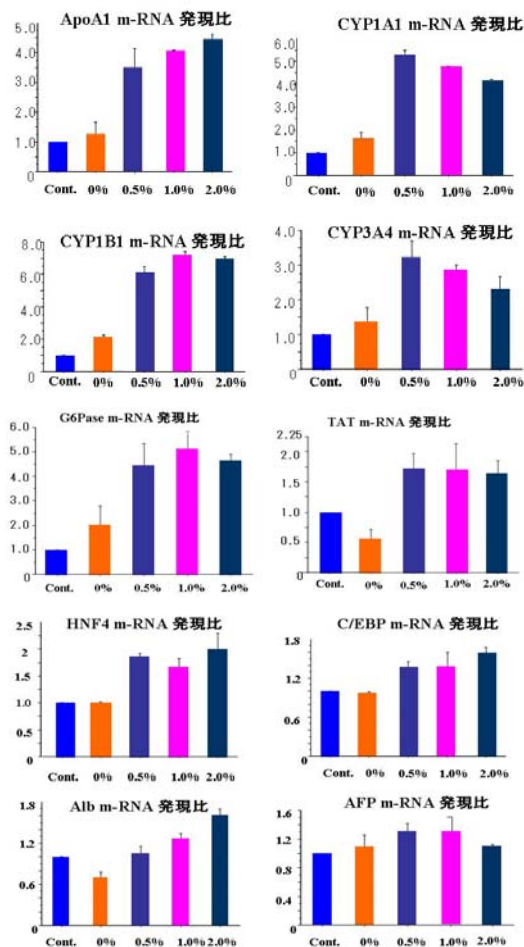
co-culture RFB group の移植後 4、8 週での肝特異的遺伝子の mRNA 発現を比較した (Fig. 9)。両移植部位とも Cx26 & 32 の良好な発現を認めた。albumin、HNF4 α 、および G6Pase は移植前と比較し、移植後 8 週で発現が増強し、ほぼすべての肝特異的遺伝子の発現が増強していた。しかし TAT については、omentum group のみで発現が増強していた (Fig. 9)。Fig. 9 移植後の肝オルガノイドの遺伝子発現



まとめ: 生体適合性を有する AFS を担体とし、細胞源として不死化肝細胞および不死化非実質細胞を用いた RFB system での共培養により、肝実質臓器を模した三次元培養組織、すなわち肝オルガノイドの構築を確認した後、正常ヌードマウスの腎皮膜および体網に移植し、biological stimulus の介在しない状態においても、長期生着、機能発現の増強が確認できた。これは、これまでの biological stimulus が無い状態では、長期生着や機能発現を維持することが困難という報告を考慮すると、我々の作成した肝オルガノイドが、生体埋め込み型人工肝臓の臨床応用への糸口を見出したと考えられる。

4) 正常ヒト肝細胞の新しい凍結保存法
10 種類の肝特異的遺伝子の発現を Real-time PCR にて肝機能遺伝子の解析した結果を示す (Fig. 10)。

Fig. 10 凍結保存後ヒト肝細胞の遺伝子発現



まとめ: 正常肝細胞の SEIREN 添加 (1.0% が適当と思われる) 凍結保存は、肝機能関連遺伝子の高い発現を認めた。特に代謝酵素遺伝子において有用であった。

1)-3) から細胞源として正常ヒト肝細胞が理想的ではあるが、異種である Fetal porcine liver もひとつの候補となり得る。また、不死化細胞もその候補となるが、ヒト細胞は悪性細胞から樹立した細胞である。体外循環の実験系では、悪性細胞の逸脱した還流は認めなかったが、確固たる安全性の確保とは言いがたい。ヒト正常肝細胞の不死化細胞がマウスと同様に得られれば、臨床的に意義ある研究となる。また、進化した凍結保存法の開発も重要である。これら多方面からのアプローチと RFB system の組み合わせは、肝としての biological function を供えた実用的な埋め込み型人工肝臓の開発を加速するものと思われた。また、腎の肝臓化も尿管が胆管としての機能を代替する可能性もあり、将来性の高い治療系として期待できる。

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 3件)

①Ishii Y, Yanaga K et al.

Hepatic reconstruction from fetal porcine liver cells using a radial flow bioreactor. World J Gastroenterol 14(17):2740-7, 2008 査読/有

②Kanai H, Ishii Y, Yanaga K, Matsuura T

et al. Extracorporeal bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic encephalopathy. Artificial Organs. 31(2): 148-151, 2007 査読/有

③松浦知和、岩城隆昌、木村直史、石井雄二

、矢永勝彦: 体外循環型バイオ人工肝臓の開発と臨床応用への問題点. 再生医療 5(3); 395-400, 2006 査読/有

[学会発表] (計 4件)

①ラジアルフロー型バイオリアクターで構築した肝臓オルガノイドの移植に関する検討.

齊藤良太、矢永勝彦、石井雄二、坂本太郎、伊藤隆介、松浦知和、他 第108回日本外科学会総会 平成20年5月16日 長崎(サージカルフォーラム)

②ラジアルフロー型バイオリアクターで構築した肝臓オルガノイドの移植に関する検討

齊藤良太、石井雄二、永妻啓介、波多野昌代、松浦知和、矢永勝彦、他 第107回日本外科学会総会 平成19年4月11日 大阪国際会議場(サージカルフォーラム)

③Ishii Y, Yanaga K et al.

Transplantation of the liver organoid reconstructed using an apatite-fiber scaffold column in the radial-flow bioreactor. CTS 2007 Joint Conference September15, 2007 Minneapolis, USA

④Ishii Y, Yanaga K et al. Extracorporeal

bioartificial liver using the radial-flow bioreactor in treatment of fatal experimental hepatic failure. AASLD (米国肝臓病学会) May15, 2007 Washington DC, USA

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢永 勝彦 (Yanaga Katsuhiko)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70220176

(2)研究分担者

石井 雄二 (Ishii Yuji)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40212831

坂本 太郎 (Sakamoto Taro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60366234

齊藤 良太 (Saito Ryota)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90338898

松浦 知和 (Matsuura Tomokazu)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30199749

柴 浩明 (Shiba Hiroaki)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40366240

(3)連携研究者

なし