

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03733

研究課題名(和文) 中型動物肝硬変モデルへの同種同系肝オルガノイド移植による肝硬変治療効果の検討

研究課題名(英文) Examination of the therapeutic effect of allogeneic liver organoids on a medium-sized animal liver cirrhosis model

研究代表者

村田 聡一郎(MURATA, Soichiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：40436275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変は様々な原因で発症する慢性肝疾患の終末像であり、肝移植以外に根治療法がないが、圧倒的なドナー不足の状態である。本研究の目的はカニクイザル肝硬変モデルにおいて安全な手術手技を確立し、同種肝臓オルガノイドを用いた長期的な肝硬変治療効果を検討することである。我々はサルiPS細胞を用いて内胚葉細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞の分化誘導法を確立した。さらに分化誘導した3種類の細胞からサルiPS細胞由来肝臓オルガノイドの作製法を確立した。さらにサルiPS細胞由来肝臓オルガノイドをカニクイザル肝硬変モデルに移植し、治療効果を検討した。その結果、移植個体では線維化の改善効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変は様々な原因で発症する慢性肝疾患の終末像であり、肝移植以外に根治療法がないが、圧倒的なドナー不足の状態である。したがって、臓器移植に代わる治療法の開発は、多くの患者救済のために必須である。また、臓器不全症に対する待機的治療には莫大なコストを要することから、医療経済学的観点からもその開発ニーズが非常に高まっている。本研究結果により、肝臓オルガノイドを用いて臓器移植を行わずに肝硬変を治療出来ることが示唆され、ドナー不足解消による患者救済及び待機的治療継続によるコストを削減できる可能性が示され、社会的に重要な意義をゆうずると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Liver cirrhosis is a terminal image of chronic liver disease that develops due to various causes, and although there is no radical cure other than liver transplantation, there is an overwhelming shortage of donors. The purpose of this study is to establish a safe surgical technique in a cirrhosis model and to investigate the long-term therapeutic effect of allogeneic liver organoids on cirrhosis. We have established a method for inducing differentiation of endoderm cells, mesenchymal cells, and vascular endothelial cells using monkey iPS cells. Furthermore, we established a method for producing monkey iPS cell-derived hepatic organoids from three types of cells that have been induced to differentiate. Furthermore, monkey iPS cell-derived liver organoids were transplanted into a cynomolgus monkey liver cirrhosis model, and the therapeutic effect was examined. As a result, it was suggested that the transplanted individual had an effect of improving fibrosis.

研究分野：再生医学

キーワード：オルガノイド 肝硬変 同種 iPS細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は様々な原因で発症する慢性肝疾患の終末像であり、肝移植以外に根治療法がないが、圧倒的なドナー不足の状態である。したがって、臓器移植に代わる治療法の開発は、多くの患者救済のために必須である。また、臓器不全症に対する待機的治療には莫大なコストを要することから、医療経済学的観点からもその開発ニーズが非常に高まっている。研究代表者らはヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞の3種類を混合して革新的な三次元培養を行うことにより、正常な肝臓構造に近いiPS肝臓原基（肝臓オルガノイド）の開発に成功した (Takebe T, Taniguchi H, Nature 2013)。ヒトiPS細胞由来肝臓オルガノイドを免疫不全マウスに移植することにより、ヒト血管網を有した機能的なヒト肝臓が構築され、肝不全を改善した。iPS細胞由来肝臓オルガノイドの移植はこれまで異所を中心に行ってきたが、胆汁の排泄経路を考えると移植先は同所がより好ましいと考えられた。肝硬変の肝臓にオルガノイドを移植する場合、経門脈的な移植は門脈圧亢進症状があり困難である。そのためオルガノイドを肝臓表面に移植する手法を開発中である。肝硬変の肝臓表面に移植する場合、安全な剥離法、自己組織化を高める被覆剤、生着効率を高めるために血管化を促進した肝オルガノイドの開発等が必須である。また従来の異種移植では異種免疫応答が見られるため、同種移植による長期的治療効果を確認することが望ましい。

2. 研究の目的

本研究の目的はカニクイザル肝硬変モデルにおいて安全な手術手技を確立し、同種肝オルガノイドを用いた長期的な肝硬変治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 肝被膜剥離法の比較検討

肝硬変モデルの肝被膜を針等による鋭的剥離、生体接着剤塗布後の剥離、エネルギーデバイス(電気メス)、超音波外科吸引装置 (CUSA) 等、臨床で使用可能なデバイスを用いて剥離し、組織損傷、出血時間等の安全性検討を行った。さらに剥離した肝臓表面に胎仔肝組織を移植し、生着効率を比較検討した。

(2) 被覆剤の検討

肝表面に移植した組織の生着効率および増殖効率を引き出せる被覆剤の開発を行う。現在臨床で使用可能な製剤としてはアルギン酸が組織生着効果が高い事が明らかになった。肝表面に移植した組織の生着効率および増殖効率を引き出せる被覆剤の開発を行った。具体的にはアルギン酸ナトリウムにカルシウム溶液を添加して被覆する方法を検討した。比較対象としてマトリゲル、フィブリン、セルロース膜等を用いた。

(3) サルiPS細胞由来肝臓オルガノイドのカニクイザル肝硬変モデルへの移植

サルiPS細胞由来肝臓オルガノイドをカニクイザル肝硬変モデルに移植し、治療効果を検討した。これまでの研究で肝硬変の肝臓表面に肝臓オルガノイドを移植するための安全な剥離法、自己組織化を高める被覆剤を開発した。カニクイザル肝硬変モデルは薬剤を段階的に増量して急性肝不全を抑制する新規のプロトコルを用いた。剥離はCUSAを模した超音波破碎装置を用いて出血量を抑えて実施した。アルギン酸ナトリウムを用いて移植組織を被覆した。免疫抑制剤はFK506単独およびFK506にステロイドを併用して実施した。

4. 研究成果

(1) 肝被膜剥離法の比較検討

肝硬変モデルの肝被膜を針等による鋭的剥離、生体接着剤塗布後の剥離、エネルギーデバイス(電気メス)、超音波外科吸引装置 (CUSA) 等、臨床で使用可能なデバイスを用いて剥離したところ、CUSAで肝表面を剥離すると出血が有意に少なかった。組織損傷、出血時間、出血量等の安全性検討を行った。その結果、CUSAによる組織損傷が軽度で出血量が少ない事が明らかになった。さらに剥離した肝臓表面に胎仔肝組織を移植し、生着効率を比較検討したところ、CUSAが鋭的剥離と同等の生着効率であることを確認した(図1, 2)。

図1 肝被膜剥離法の開発 (組織生着)

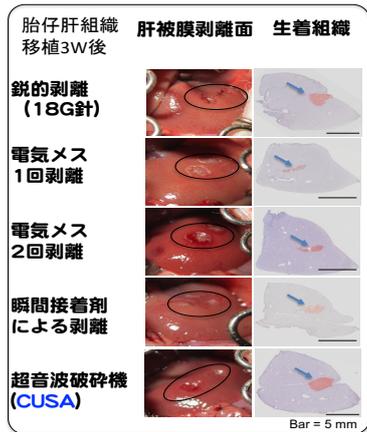
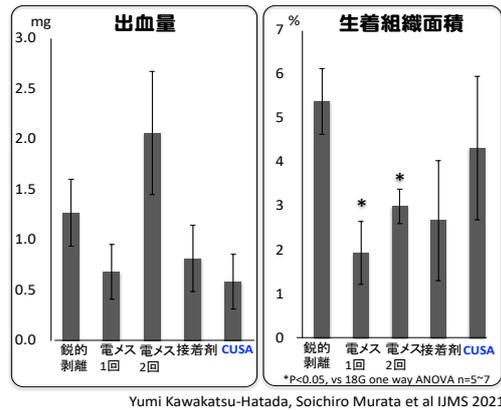


図2 肝被膜剥離法の開発 (出血、生着組織面積)



(2) 被覆剤の検討

肝表面に移植した組織の生着効率および増殖効率を引き出せる被覆剤の開発を行う。現在臨床で使用可能な製剤としてはアルギン酸が組織生着効果が高い事が明らかになった。肝表面に移植した組織の生着効率および増殖効率を引き出せる被覆剤の開発を行った。具体的にはアルギン酸ナトリウムにカルシウム溶液を添加して被覆する方法を検討した。比較対象としてマトリゲル、フィブリン、セルロース膜等を用いた。その結果、アルギン酸ナトリウムがマトリゲルと同等の組織生着効果を有することを明らかにした(図3, 4)。これらの剥離方法の改良と被覆剤の開発により、カニクイザル肝線維化モデルへのサルiPS細胞由来肝オルガノイドの生着を確認した。

図3 被膜固定剤の違いによる組織生着

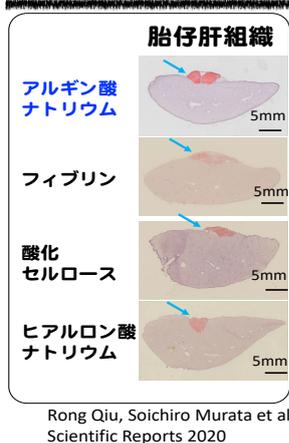
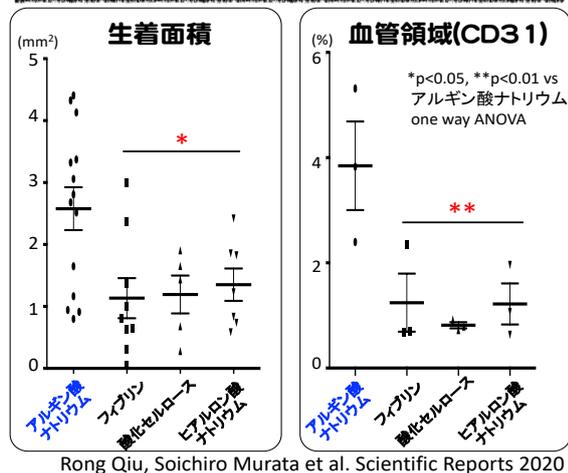


図4 被膜固定剤の違いによる組織生着比較



(3)サルiPS細胞由来肝臓オルガノイドのカニクイザル肝硬変モデルへの移植

カニクイザルにTAAを8週投与して肝硬変モデルを安定的に作製する手法を開発した(図5)。これは従来より短期間にChild-Pugh grade B相当の肝硬変を再現出来る方法である。一方でTAAの休薬により線維化が改善してしまう問題があり、TAAを漸増して12週投与する手法に改良した。サルiPS細胞由来肝臓オルガノイドをカニクイザル肝硬変モデルに移植し、治療効果を検討した。これまでの研究で肝硬変の肝臓表面に肝臓オルガノイドを移植するための安全な剥離法、自己組織化を高める被覆剤を開発した。カニクイザル肝硬変モデルはTAAを段階的に増量して12週間投与する新規のプロトコルを用いた。剥離はCUSAを用いて出血量を抑えて実施した。アルギン酸ナトリウムを用いて移植組織を被覆した。免疫抑制剤はFK506単独およびFK506にステロイドを併用して実施した(図6)。移植は安全に実施され、カニクイザルiPS細胞由来肝臓オルガノイドの肝硬変の肝表面への生着を認め、移植個体では線維化の改善効果が示唆された(図7)。

図5 カニクイザル肝線維化モデルの確立

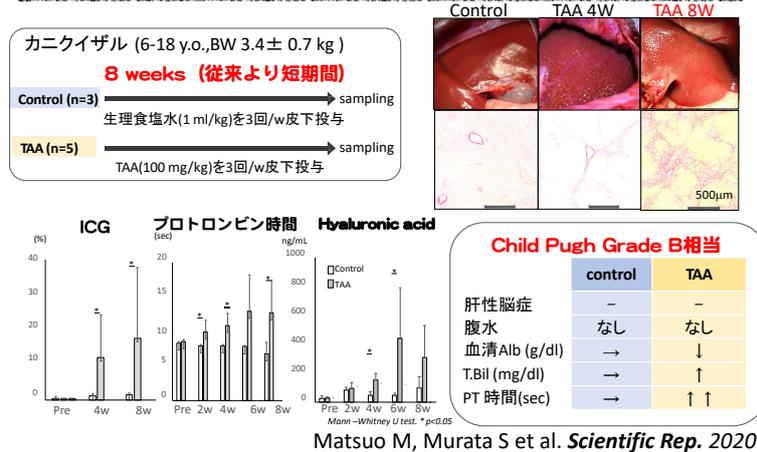


図6 サルiPS細胞由来肝臓オルガノイド移植

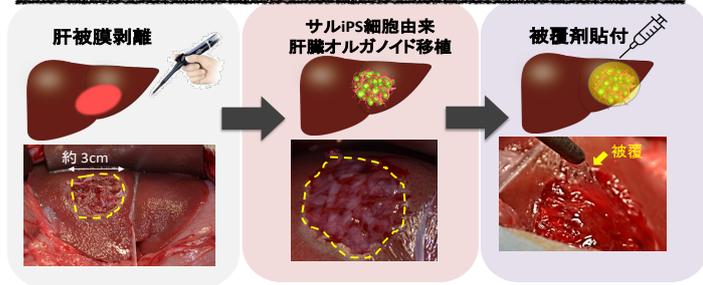
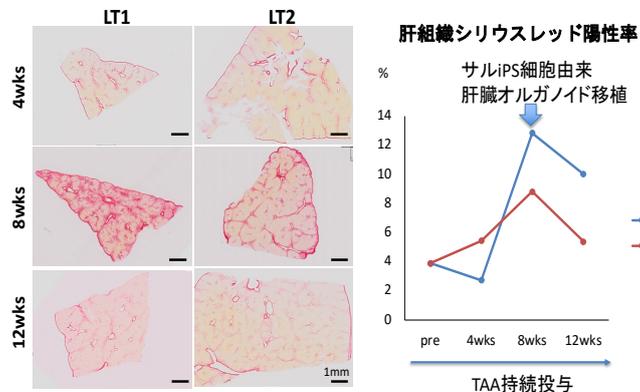


図7 移植個体の肝線維化の経時的変化



本研究の当初の目的であった肝硬変の肝臓表面に安全に組織を移植する技術をマウスやラットなどの小動物モデルで確立した。その手法をカニクイザルにおいても応用が可能であることを本研究で初めて実証した。移植評価可能なカニクイザル肝硬変モデルを安定的に作製することができ、同種肝臓オルガノイドを用いた長期的な肝硬変治療効果を検討することにも成功した。本研究成果をもとにより高性能の肝臓オルガノイドの開発及び移植後の治療効果検討をさらに進め、画期的な肝硬変治療法開発に結びつけていく。

※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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Megumi Matsuo, Soichiro Murata, Shunsuke Hasegawa, Yumi Hatada, Masayuki Ohtsuka, Hideki Taniguchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel liver fibrosis model in Macaca fascicularis induced by thioacetamide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58739-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rong Qiu, Soichiro Murata, Katsutomo Oshiro, Yumi Hatada, Hideki Taniguchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Transplantation of fetal liver tissue coated by ultra-purified alginate gel over liver improves hepatic function in the cirrhosis rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65069-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yumi Kawakatsu-Hatada, Soichiro Murata, Akihiro Mori, Kodai Kimura, Hideki Taniguchi.	4. 巻 22
2. 論文標題 Serous Membrane Detachment with Ultrasonic Homogenizer Improves Engraftment of Fetal Liver to Liver Surface in a Rat Model of Cirrhosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences.	6. 最初と最後の頁 11589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111589	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rong Qiu, Soichiro Murata, Chao Cheng, Hideki Taniguchi	4. 巻 13
2. 論文標題 A Novel Orthotopic Liver Cancer Model for Creating a Human-like Tumor Microenvironment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13163997.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Murata S, Okamoto S, Sekine K, Ueno Y, Tadokoro T, Taniguchi H
2. 発表標題 Effect of human induced pluripotent stem cell derived liver buds in a immunodeficient liver fibrotic rodents.
3. 学会等名 Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association(A-PHPBA), Seoul, Korea (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩砂克紀、森淳祐、皆田皓平、木村公大、村田聡一郎、谷口英樹
2. 発表標題 肝硬変の肝表面へのオルガノイド移植を目指した被膜剥離法と被覆剤の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 被覆固定剤	発明者 谷口 英樹、村田 聡一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 11144	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田所 友美 (Tadokoro Tomomi) (20507644)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	
研究分担者	谷口 英樹 (Taniguchi Hideki) (70292555)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------