

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18063

研究課題名(和文) 脂肪由来間葉系幹細胞と肝細胞による積層化シートの作製

研究課題名(英文) Construction of tissue-engineered hepatocyte sheets supplemented with adipose-derived stem cells

研究代表者

鈴志野 聖子 (Suzushino, Seiko)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・助手

研究者番号：20816376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回、脂肪由来幹細胞(ADSC)を添加した肝細胞シートを作成し、ADSCが肝細胞の機能と皮下への生着に及ぼす影響を評価しました。

In vitroでは、積層化シートは、肝細胞単独シートに比べ、肝細胞の生存数が有意に高く、肝細胞の死滅数が有意に低くなった。また、積層化シートの上清中のアルブミン濃度や肝細胞の生存に必要なサイトカイン濃度は、肝細胞のみのシートに比べ、有意に高かった。積層化シートと肝細胞単独シートをレシピエントマウスに皮下移植した。移植28日後、積層化シートは皮下でシートを形成しているのが観察されたが、肝細胞のみのシートは観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞移植は、肝臓移植と比較して低侵襲という優位性を認めるが、肝細胞採取による肝細胞障害の問題、門脈内投与による弊害(門脈塞栓や肺塞栓、宿主免疫応答)など、解決すべき命題がある。既報では、組織工学技術を応用した肝細胞シートによる皮下肝細胞移植が報告されているが、多機能な肝臓の一部を補完するのみに留まっている。本研究では、肝臓発生に必須とされる肝細胞と支持細胞との細胞間接着に着目し、比較的低侵襲に採取できるADSCと肝細胞の積層化シートの作製を行い、分離ストレスによる細胞喪失を軽減し、かつ肝細胞を組織として移植することで、効率的な移植技術が確立するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we created hepatocyte sheets supplemented with adipose-derived stem cells (ADSCs) and evaluated the effects of ADSCs on hepatocyte function and engraftment into the subcutaneous space.

In vitro, the numbers of viable hepatocytes and dead hepatocytes were significantly higher and lower, respectively, in the hepatocyte-ADSC composite sheets than in hepatocyte-only sheets. In addition, the levels of albumin and the cytokines required for hepatocyte survival were significantly higher in the supernatants of the hepatocyte-ADSC composite sheets than in those of the hepatocyte-only sheets.

The hepatocyte-ADSC composite sheets and hepatocyte-only sheets were transplanted subcutaneously into the recipient mice. 28 days after transplantation, the hepatocyte-ADSC composite sheets were observed to form sheets subcutaneously, but hepatocyte-only sheet was not observed.

研究分野：肝細胞移植

キーワード：異所性肝細胞移植 間葉系幹細胞 シート工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓移植は肝不全の根本的治療として確立され、近年では免疫抑制療法や移植術式および周術期管理の改良により移植成績の向上が報告されている^[1]。肝細胞移植では、肝細胞を経門脈的に移植するため、肝移植と比較して低侵襲であり、肝臓移植までの橋渡しの治療として位置づけられている。しかし、分離された肝細胞のおよそ 70%以上が喪失され、その要因として、1) 肝細胞分離に伴う細胞障害による細胞活性の低下や、2) 経門脈的に移植された肝細胞による凝固カスケードの亢進と宿主免疫応答が挙げられる^[2, 3]。また、経門脈的投与の問題点として、門脈亢進、門脈塞栓のリスクがあり肝硬変患者には適応されないことや肺塞栓のリスクも報告されている^[4]。既報では、組織工学技術を応用した肝細胞シートによる皮下肝細胞移植が報告されているが、多機能な肝臓の一部を補完するのみに留まっている^[5]。

本研究では、肝臓発生に必須とされる肝細胞と支持細胞との細胞間接着に着目し、比較的低侵襲に採取できる脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose-derived stem cells: ADSC)と肝細胞の積層化シートの作製を行い、分離ストレスによる細胞喪失を軽減し、かつ肝細胞を組織として移植することで、効率的な移植技術の確率を目指すものである。

2. 研究の目的

肝細胞を経門脈的移植するという問題点を、Ohashi ら^[6]は、温度応答性培養皿を用いて肝細胞シートを作製し皮下に移植することで回避し、移植した肝細胞の長期生着に成功したことを報告した。近年では、このような特徴の温度応答性培養皿を用いて、心筋シートや食道再生シートなど、シート工学による様々な細胞シートが開発されている^[7]。

既報の肝細胞の研究でも、肝細胞単独での移植と比較して、間葉系細胞や血管内皮細胞といった支持細胞と肝細胞の細胞接着を保った状態での移植の方が、移植された肝細胞の生着に有利であることが示されている^[8]。その理由として、間葉系細胞が分泌するサイトカインが、肝細胞の再生・維持に必要なシグナルを伝達していることがあげられる^[9]。このことから、肝細胞移植においては、肝細胞単独移植よりも間葉系細胞と肝細胞の積層化シートの移植が有利であり、温度応答性培養皿を用いて ADSC と肝細胞の積層化シートを作製する事で、乏血管性の皮下組織においても、長期間生着し得る、Viability の高い移植片を作製できると考えた。

3. 研究の方法

ADSC の分離および培養方法

ドナーマウスの鼠径部の脂肪組織を摘出し、0.1%コラゲナーゼ type I で消化した。不消化の脂肪組織を 100 μ m のセルストレイナーを用いて除去し、3 回遠心したのち細胞を採取した。採取した細胞を DMEM で培養し、trypsin/EDTA を使って継代した。継代した細胞は、35mm の温度応答性培養皿(UpCell®)に 0.15×10^6 個播種させた。

肝細胞の分離方法

ドナーとなるマウスの下大静脈にカニューレションし、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS(-))で還流し、続いて 0.01%コラゲナーゼで 10 分間還流した。還流後に肝臓を摘出し細分化後に、40 μ m のフィルターで濾過し採取された細胞懸濁液を、70%と 50%の Percoll による不

連続密度勾配遠心分離法を用いて肝細胞を分離した。分離された肝細胞の Viability は、トリパンブルーで 90%以上とし、肝細胞単独シートおよび肝細胞-ADSC 積層化シートの作製に使用した。

肝細胞単独シートおよび ADSC-肝細胞積層化シートの作成方法

分離肝細胞を温度応答性培養皿上で培養し肝細胞単独シートと肝細胞-ADSC 積層化シートを作製した。肝細胞のみを培養する 35mm の温度応答性培養皿は 型コラーゲンを用いてコーティングした。肝細胞単独シートは、 1.0×10^6 個の肝細胞を温度応答性培養皿に播種して作製した。積層化シートは、35mm の温度応答性培養皿にあらかじめ播種させた ADSC シートの上に 1.0×10^6 個の肝細胞を播種して作製した。

細胞シートの標本作成および細胞の Viability の確認方法

培養 2 日目と 5 日目に、Propidium Iodide (PI)/Calcein-AM 染色にてそれぞれの生細胞と死細胞の比率を検討した。また、培養 2 日目の肝細胞単独シートおよび積層化シートの固定標本作製し、Hematoxylin-eosin(HE)染色、Periodic acid-Schiff (PAS)染色を行なった。また、培養上清を収集し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて、アルブミン(albumin ELISA kit)、hepatocyte growth factor (HGF, Quantikine ELISA mouse/rat HGF immunoassay kit)、vascular endothelial growth factor(VEGF, Quantikine ELISA mouse VEGF immunoassay kit)、interleukin 6(IL-6, Quantikine ELISA mouse VEGF immunoassay kit)の濃度を測定した。

細胞シートの皮下移植方法

上記の方法で 2 日間培養した肝細胞および肝細胞-ADSC 積層化シートを、20 に冷却し培養皿から細胞シートを浮遊させた。免疫不全マウスの左側腹部の皮下に、肝細胞シートまたは積層化シートを貼付した。移植グラフトは、移植後 1 週間、4 週間で摘出した。

摘出したグラフトの標本は、HE 染色、PAS 染色、抗 CK18 抗体、抗 CK7 抗体、抗アルブミン抗体、抗 CD31 抗体の免疫染色を行ない、肝細胞の有無やアルブミン産生の有無、血管新生の有無、周囲との細胞接着の状態を比較した。

4. 研究成果

ADSC の特異的表現型の確認

図 1 に示す通り、マウスの脂肪から分離した細胞は CD29、CD90.2 が陽性、CD31、CD34 が陰性であり(図 1)、既報による ADSC の定義と一致した結果であることを確認した^[10]。

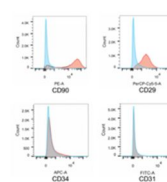


図 1.

*In vitro*における肝細胞単独シートと ADSC-肝細胞積層化シートの比較

PI/Calcein-AM 蛍光染色で比較すると、培養 2 日目では生細胞と死細胞の比率に差はないが、培養 5 日目になると、ADSC に積層して培養した肝細胞の方が、死細胞が少ないことがわかる(図 2)。このことから、積層化シートの方がより長く Viable な細胞が生存できることがわかった。

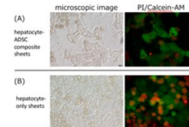


図 2.

さらに、温度応答性培養皿で培養した 2 つのシートを、PAS 染色で比較すると(図 3)、PAS 反応陽性の細胞がより多く生存していた。

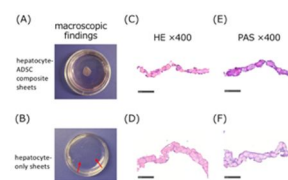


図 3.

ADSC-肝細胞積層化シートのアルブミン産生能

2つのシートの肝細胞のアルブミン産生能を比較した。アルブミン濃度は、両群とも1日目から5日目まで増加し続けた。5日目のADSC-肝細胞積層化シートの上清中のアルブミン濃度は、肝細胞単独シート（24.0 μg/mL、 $p=0.015$ ）より有意に高かった（図4）。

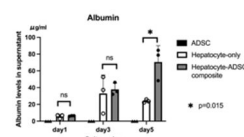


図4.

皮下移植結果およびグラフトの組織学的評価

ADSC-肝細胞積層化シートの肝細胞は、移植7日後、移植4週間後も生存しており、移植片をHE、PAS染色を行うと、グリコーゲン貯蔵能を有していることがわかった（図5B, C）。この結果は、積層化シートの肝細胞が、皮下で肝機能を有しながら生存していることを示唆するものであった。

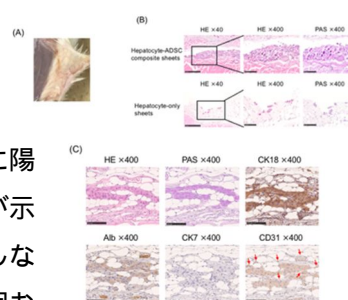


図5.

免疫染色では、肝細胞に特徴的な抗CK18抗体と抗アルブミン抗体に陽性であり、アルブミン産生能を有した肝細胞が生存していることが示唆された。また、CK7は陰性であり、移植片に胆管上皮細胞が存在しないことが示された。抗CD31抗体を用いた免疫染色で、グラフト周囲およびグラフト内に新生血管が構築されていることを確認した（図5C）。

肝細胞単独シートでは、移植後7日目に移植片が数個まとまって観察されたものの（図5B）、移植4週間後には肝細胞の組織は観察されなかった。

ADSC-肝細胞積層化シートのサイトカイン産生能

移植部位の血管再生促進（VEGF）^{[10] [11] [12]}または肝細胞の維持（HGFとIL-6）^{[11] [9]}のいずれかに極めて重要と報告されているサイトカインを、ELISA法にて測定した。まずVEGF濃度は、5日目になると積層化シートの培養上清中のVEGF濃度が、肝細胞単独シートよりも有意に高かった（肝細胞単独シート 2914 ng/mL vs. 積層化シート 7117 ng/mL、 $p = 0.002$ ；図6A）。HGFとIL-6濃度の測定結果では、肝細胞単独シートの培養上清にはHGFとIL-6が検出されなかったが、積層化シートの培養上清にはそれぞれ1264 ng/mLと458.8 ng/mLと検出された（図6A）。

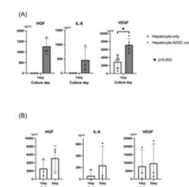


図6.

さらに、ADSCのみのシートは、これら3つのサイトカインを分泌する能力を有していた（図6B）。したがって、上記の結果から、ADSC-肝細胞積層化シートの培養上清中に分泌されたHGFとIL-6は、肝細胞ではなくADSCに由来することが予想された。

肝細胞におけるHGFおよびIL-6を介したシグナル伝達経路の検証

ADSCが分泌するHGFとIL-6の肝細胞への影響を評価するために、培養2日後の細胞シートを、抗p-STAT3抗体と抗c-MET抗体を用いて免疫染色し、陽性細胞の数で検討した。ADSC-肝細胞積層化シートのp-STAT3およびc-MET陽性細胞の割合は、培養2日後で肝細胞単独シートに比べてどちらも有意に高かった（p-STAT3: 43.2% vs. 27.7%、 $p = 0.033$ ；c-MET: 12.4% vs. 1.9%、 $p = 0.033$ ；図7。）

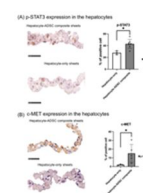


図7.

<引用文献>

- Meirelles Junior, R.F., et al., *Liver transplantation: history, outcomes and perspectives*. Einstein (Sao Paulo), 2015. **13**(1): p. 149-52.
- Sanjeev, G., R. Pankaj, and M.N. Phyllis, *Entry and Integration of Transplanted Hepatocytes in Rat Liver Plates Occur by Disruption of Hepatic Sinusoidal Endothelium*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 509-519.
- Joseph, B., et al., *Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1677-85.
- Lee, C.A., et al., *Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in Hepatocyte Transplantation: Current Status and Future Perspectives*. Cell Transplant, 2016. **25**(7): p. 1227-36.
- Enosawa, S., et al., *Hepatocyte transplantation using a living donor reduced graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source of hepatocytes*. Liver Transpl, 2014. **20**(3): p. 391-3.
- Ohashi, K., et al., *Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 880-5.
- Yang, J., et al., *Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(34): p. 5033-43.
- Sakai, Y., et al., *Rapid fabricating technique for multi-layered human hepatic cell sheets by forceful contraction of the fibroblast monolayer*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70970.
- Michalopoulos, G.K. and B. Bhushan, *Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021. **18**(1): p. 40-55.
- Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 818-27.
- Molly, K.S.P.D., W.R.P.D. Kathryn, and J.M.P.D. David, *Delivery of Hepatotrophic Factors Fails to Enhance Longer-Term Survival of Subcutaneously Transplanted Hepatocytes*. Tissue Engineering, 2006. **12**(2): p. 235-245.
- Nakagami, H., R. Morishita, and Y. Kaneda, *Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as a Novel Option for Regenerative Cell Therapy*. J Atherosclero Thromb, 2006. **13**(2): p. 77-81.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴志野聖子
2. 発表標題 In vitro assessment of two layer cell sheet of hepatocyte combined with adipose-derived stem cell
3. 学会等名 第75回消化器外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴志野聖子
2. 発表標題 肝細胞と脂肪由来間葉系幹細胞の二層化シートと肝細胞シートとの比較
3. 学会等名 第121回日本外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴志野聖子
2. 発表標題 Subcutaneous transplantation with cell sheet of hepatocyte combined with adipose-derived stem cell
3. 学会等名 第76回消化器外科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------