

機関番号： 14301
研究種目： 基盤研究 (A)
研究期間： 2008 ～ 2010
課題番号： 20249058
研究課題名 (和文) キメラ肝臓を用いた次世代の肝臓移植に関する基礎研究
研究課題名 (英文) Liver transplantation with novel strategy using the engineered chimeric liver as alternative graft
研究代表者
上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号： 40252449

研究成果の概要 (和文)： 深刻な肝移植ドナー不足の解消を目指して、キメラ技術を用いた肝臓グラフトの検討を行った。マウス体内でラット由来肝実質とマウス由来肝非実質組織で構成されたキメラ肝臓をラット・レシピエントに移植し、免疫抑制剤を用いながらその生着や機能を評価したところ、適切な免疫抑制剤使用により有意にグラフト生存が延長し、組織学的にも肝組織が維持された。また、4 ヶ月にわたりアルブミン産生能が保たれ、グラフトとしての可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)： To solve the serious shortage of liver grafts, the feasibility of chimeric liver as an alternative liver graft has been investigated. The chimeric liver formed with rat hepatic parenchyma and mouse non-parenchyma was harvested from scaffold mouse and transplanted into rat recipient, followed by the immunosuppressive protocols. We have found, with appropriate immunosuppression, graft survival was significantly prolonged and graft tissues were maintained better. Moreover, we found its albumin production for 4 months. We have shown the possibility of the strategy using chimeric liver graft.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2009 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

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・肝臓移植・キメラ肝臓

1. 研究開始当初の背景

日本で生体肝移植が開始されて 20 年近くが経過し、法的整備の改善による脳死肝移植症例の増加傾向が認められるものの、その大多数は生体肝移植に依存している。世界的にも特異なこの状況は容易に変わり得る見通しは立っていない。移植医療に関わる者は、多くの末期肝不全患者の救命と社会復帰に貢献できるという社会的意義を自覚すると同時に、健康な一般人にドナー手術を行うというジレンマにも日々直面している。脳死者からの臓器提供を感謝しながら有効に社会還元する脳死肝移植が本来のあるべき移植医療であると考えられるが、わが国ではその状況にはほど遠く、さらに欧米においても脳死者からの臓器提供には限度があり、それに替わるべき肝不全患者の治療の追求として、生体肝移植を含めて様々な取り組みが行われている。その戦略として、心停止ドナーからのグラフト臓器摘出、肝細胞移植、異種移植、人工臓器、多能性幹細胞からの臓器の作成などが挙げられるが、臨床応用には依然高いハードルを越える必要がある。

主任研究者と分担研究者は、それぞれの所属施設で生体肝移植医療を実践しながら種々の共同研究を展開してきたが、新たに足場 (scaffold) を利用した臓器再生の構想を立てた。新たにマウスおよびラットの実験モデルを作成し、その可能性を検討すべく研究を開始した。

2. 研究の目的

ラット肝細胞を有するマウスのキメラ肝臓を作成し、ラットに移植する。肝細胞はラット由来、それ以外の肝支持細胞、胆管細胞、血管内皮などはマウス由来である。キメラ肝臓の移植によって異種抗原であるこれら肝細胞以外のマウス細胞がどのような免疫反応を受けるのか、果たしてラット細胞に徐々に置き換わっていくことが可能であるのか非常に興味のある現象の解明を進めることとした。同時に、現在使用可能な種々の免疫抑制剤の利用を追求し、キメラ肝臓が長期に生着できる免疫抑制療法を開発する方針とした。

3. 研究の方法

本研究は(1)マウス内でのキメラ肝臓の作成、(2)キメラ肝臓のラットへの移植、(3)移植後キメラ肝臓の評価の3段階から進めた。更に、得られた結果を検討し、(4)キメラ

肝臓移植が持つ問題点に対して検証を進めるというアプローチを行った。

(1)マウス内でのキメラ肝臓の作成

ラット由来肝細胞のトレースを容易にする目的で、移植肝細胞は luciferase 遺伝子導入トランスジェニックラットや LacZ 遺伝子導入トランスジェニックラットから分離した。

- ① 生後肝細胞が特異的に脱落する uPA/SCID マウスに対して、ラット分離肝細胞を移植し、マウス肝臓を scaffold としてラット肝細胞およびマウス由来非実質細胞を併せ持ったキメラ肝臓の作成を試みた。
- ② 作成したキメラ肝臓の評価を機能評価・組織学的評価を行った。

(2)キメラ肝臓のラットへの移植

- ① マウス体内で作成したキメラ肝臓を摘出し、ラット・レシピエントに血行再建を伴う方法で移植を試みた。
- ② 移植後の免疫抑制剤使用の有無に伴う、移植後グラフトの生存や移植後レシピエントの生存、組織学的所見を評価した。

(3)移植後キメラ肝臓の評価

- ① 移植後キメラ肝臓の機能を評価する為に、アルブミンの産生能を評価した。この際、レシピエントラットにはアルブミン無産生ラットを使用した。
- ② 移植後キメラ肝臓への血流を評価する為に、ドップラーエコーを用いて評価した。
- ③ 移植後キメラ肝臓がレシピエントからの液性因子に反応しうるかを評価する目的で、レシピエントラットの自己肝を部分切除し、その後のキメラ肝臓肝細胞の増殖を Ki67 免疫組織染色を用いて評価した。

(4)キメラ肝臓移植が持つ問題点への検証

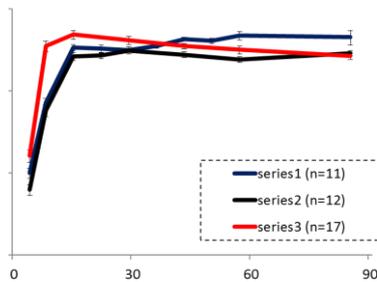
- ① 我々が確立したキメラ肝臓移植モデルではグラフト肝血流は肝動脈と肝静脈に依存しており門脈再建は行っていなかった。しかし、門脈血流も含めての移植モデルの確立を試みた。
- ② キメラ肝臓内の異種成分 (非実質組織に相当) に対する拒絶を軽減するために、肝実質のみならず、血管内皮細胞もキメラ化 (ラット化) するための検討を行った。

4. 研究成果

本研究の期間内に、マウス内でのキメラ肝臓の安定した作出を行い、その移植モデルを安定させ、その上でその評価を行った。複数の免疫抑制剤を同時投与するプロトコルを使用することで、移植後のキメラ肝臓非実質成分に対する拒絶反応をコントロール出来る可能性を示し、また、その間の移植後キメラ肝臓が機能を維持することを示した。それらの結果から、キメラ肝臓を移植グラフトとして利用する戦略の可能性が示されたと考える。

(1)-①

生後 20-30 日目の uPA/SCID マウスに対して、経脾臓的にラット肝細胞移植を行った。肝細胞ドナーに luciferase 遺伝子導入トランスジェニックラットを用い、マウス内での移植肝細胞の分布および発光輝度による viability の評価を行ったところ、移植肝細胞はマウス肝臓に集積・展開し、肝細胞移植後急速に発光輝度を増した。移植後 14 日目でプラトーに達し、その後 3 ヶ月目まで安定した輝度を示した。移植後肝細胞がマウス肝非実質組織 (scaffold) に安定して生着したことを明らかにした。



(uPA/SCID マウス内での移植ラット肝細胞由来 luciferase 発光輝度。縦軸は luminescent flux。横軸は細胞移植後の日数)

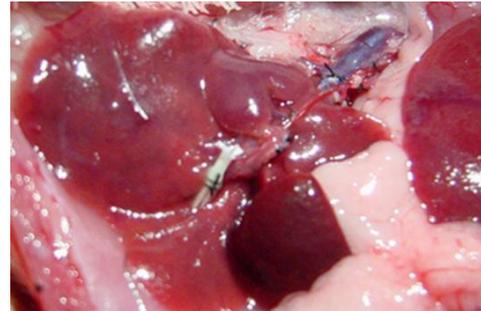
(1)-②

マウスへのラット肝細胞の移植後、マウス血清を経時的に採取し、ラット・アルブミン産生能を評価した。術前および移植後 5 日目のマウス血清からはラット・アルブミンの産生増加は認められなかったが、30 日目以降は有意に増加した産生を認め、また、それが移植後 3 ヶ月安定して産生されていることを明らかにした。マウス内で作出されたキメラ肝臓が安定して機能することを示した。

LacZ 遺伝子導入トランスジェニックラット由来肝細胞を移植して作成したキメラ肝臓では、x-gal 染色で肝実質の大部分が青染され、Glisson 鞘などの非実質組織は染色されず、キメラ化された肝臓を組織学的にも認めた。

(2)-①

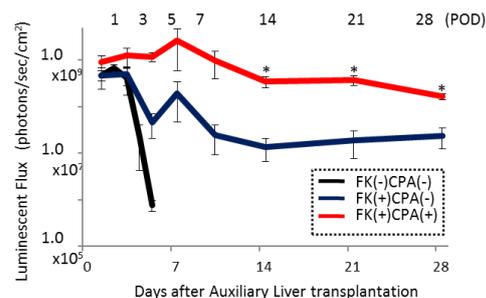
マイクロサージェリー技術を用いて、マウス体内からキメラ肝臓を愛護的に摘出し、レシピエントラットに血行再建を行って移植した。再建はカフ法を用いて行い、グラフトの肝動脈をレシピエントの左腎動脈に、グラフトの下大静脈をレシピエントの左腎静脈へ端々吻合した。胆道再建はステント間置で、グラフト胆嚢とレシピエントの空腸を吻合した。門脈再建は行っていない。以上の手法で、安定した移植モデルを確立し、それ以降の評価に用いた。



(移植再灌流後のキメラ肝臓グラフト)

(2)-②

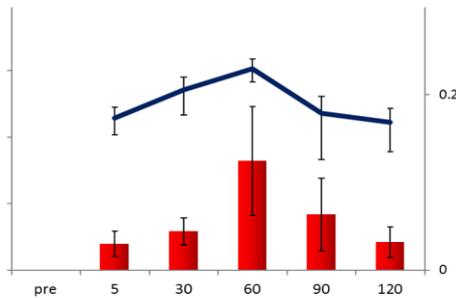
キメラ肝臓の肝実質細胞ドナーを luciferase 遺伝子導入トランスジェニック Lewis ラットとし、レシピエントを wild-Lewis ラットとした。この場合、キメラ肝臓の実質細胞はレシピエントと同種同系となり拒絶の対象とはならないが、非実質成分は異種となり、非常に強い異種拒絶の対象となり得る。そこでキメラ肝臓の移植後に、レシピエントラットに対して、無投薬群 (FK(-)CPA(-))、免疫抑制群 (タクロリムス連日投与:FK(+))CPA(-)、多剤免疫抑制群 (タクロリムス連日投与+シクロホスファミド術前投与:FK(+))CPA(+)) の 3 群に分けて評価を行った。移植後キメラ肝臓の肝実質 luciferase 発光輝度を in vivo にトレースして viability を評価したところ、多剤免疫抑制群で有意なグラフト生存延長を認めた。また、組織学的な評価でも、多剤使用条件下では組織学的により良好な肝組織の維持を認めた。



(免疫抑制剤投与下におけるキメラ肝臓由来の発光輝度)

(3)-①

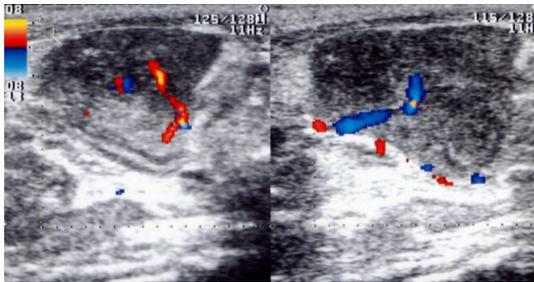
キメラ肝臓移植前には認められなかったラット・アルブミン産生が、移植後には有意な増加と共に認められ、その産生は4ヶ月間にわたり維持される事を明らかにし、移植後のキメラ肝臓がレシピエント内で機能し続けることを示した。



(キメラ肝臓移植後のアルブミン産生。縦軸は血清ラット・アルブミン量)

(3)-②

ドップラーエコーを用いて、レシピエントラット内での移植キメラ肝臓への血流を評価した。肝門部に動脈性流入と静脈性流出血流を認め、再建血行路が長期に開存していることを示した。



(術後 14 日 / 左：流入動脈、右：流出静脈)

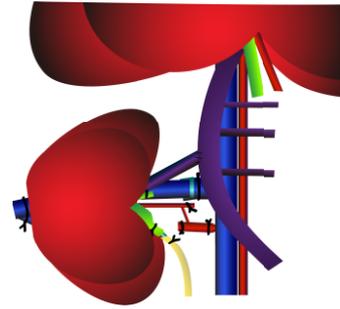
(3)-③

レシピエント・ラットの自己肝臓を 30%肝切し、その前後で Ki67 免疫染色を自己肝臓・移植後キメラ肝臓の両方で行った。レシピエント肝切 2 日目で、キメラ肝臓の肝実質細胞も分裂が有意に増加し、レシピエントからの液性シグナルに反応していることを明らかにした。このことから適切な増殖促進因子の投与により、キメラ肝臓がより保護的に生着し、その維持が可能であることが示された。

(4)-①

従来のモデルでは、肝動脈からの流入血流と肝静脈からの流出血流のみで再建した。しかし、肝臓への血流の大部分である門脈血流の再建が必要と考えられた。

新たにグラフト門脈をレシピエント門脈本幹に対して端側吻合を行い、門脈からの流入血流再建を試みた。



(門脈再建モデルのシエーマ)

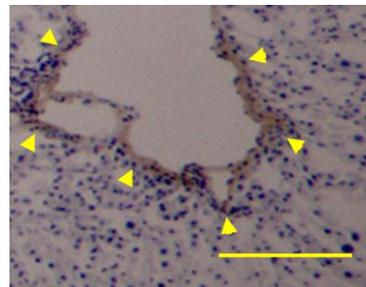
(4)-②

移植後キメラ肝臓への異種拒絶を軽減するために、肝細胞のみならず他の肝臓組織コンポーネントをキメラ化することに着目した。ターゲットとして、最初の拒絶対象である血管内皮細胞の置換を目指した。

血管内皮の置換に際しては、肝実質の置換と同様の戦略を適用し、
・置換に有利な条件を誘導する
・置換に適切な細胞ソースを移植する
の 2 点を中心に検討を行った。

置換の為の条件として、内皮細胞障害による移植細胞の survival benefit を目指し、monocrotalin 投与による薬剤性肝血管内皮障害と放射線照射による内皮障害を検討し、どちらの方法でも肝血管内皮障害を誘導することを示した。

また、細胞移植の細胞ソースとして、ラット由来の肝分離類洞内皮細胞や骨髄由来細胞分画を用いた。それらの結果、monocrotalin 照射後のラット骨髄由来細胞移植により、マウス肝血管内皮細胞の一部にラット特異的 CD31 抗体で染色されうることを示した。



(ラット骨髄内皮細胞を投与したマウス肝臓組織。門脈の一部にラット特異的 CD31 抗体で染色される血管内皮を認める。)

本研究の今回の結果は、現在再生医療の中心となっている iPS 細胞からの再生とは視点が異なり、今後の臓器再生研究に対して相加・相乗的な手法を提供するものである。

scaffold の作用により、三次元構造と複雑な生理的機能を併せ持った「臓器」の再生を展望することは、本研究の採用期間に於いても世界的に注目を集め始めている。iPS/ES 細胞研究の進展に伴う「細胞ソース」の供給確立と共に、本研究の成果が発展することで、早期の再生臓器実現に対する道筋が示されると考える。

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 1 件)

- ① T. Hata, S. Uemoto, E. Kobayashi et al. Development of a portocaval shunt using a small intestinal segment in rats. *Microsurgery*. 査読有. Vol 30(4). 2010. 302-306.

[学会発表] (計 10 件)

- ① T. Hata, E. Kobayashi, S. Uemoto, et al. Auxiliary Transplantation of the chimeric liver graft in mouse and rat combination and evaluation of the long-term survival and proliferative capacity of the transplanted graft in the recipient rat. 23rd International Congress of The transplantation Society. 2010 年 8 月 18 日. Vancouver, Canada.
- ② K. Endo, T. Hata, S. Uemoto, et al. Repopulation of hepatocytes simultaneously transplanted into the liver graft in the rat liver transplantation. 23rd International Congress of The transplantation Society. 2010 年 8 月 17 日. Vancouver, Canada.
- ③ K. Jobara, T. Hata, S. Uemoto, et al. Replacement of the vascular endothelium in the mouse liver by the xenogeneic bone-marrow cells derived from the rat. 23rd International Congress of The transplantation Society. 2010 年 8 月 17 日. Vancouver, Canada.
- ④ T. Hata, E. Kobayashi, S. Uemoto, et al.

Development of regerated chimeric liver grafts in mouse and rat combination and long-term evaluation of their potential after auxiliary transplantation. 14th Congress of the European Society for Organ Transplantation. 2009 年 8 月 30 日. Paris, France.

- ⑤ T. Hata, E. Kobayashi, S. Uemoto, et al. Long-term function of transplanted chimeric liver with autologous hepatocyte and xenobiotic scaffold in mouse and rat combination. American Transplant Congress 2009. 2009 年 6 月 3 日. Boston, USA.
- ⑥ 畑俊行、小林英司、上本伸二、他. キメラ技術を用いた再生肝臓移植の検討. 第 12 回日本異種移植研究会. 2009 年 3 月 9 日. 鹿児島.
- ⑦ T. Hata, S. Uemoto, E. Kobayashi, et al. Surgical Technique in two models of auxiliary liver transplantation from mice to rats. The 9th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery. 2008 年 10 月 31 日. 上海, 中国.
- ⑧ 畑俊行、上本伸二、小林英司、他. 小腸を scaffold に利用した臓器再生とキメラ技術の応用. 第 44 回日本移植学会総会. 2008 年 9 月 21 日. 大阪.
- ⑨ T. Hata, S. Uemoto, E. Kobayashi, et al. Transplantation of chimeric liver with autologous hepatocyte and xenobiotic scaffold in mouse and rat combination. American Transplant Congress 2008. 2008 年 6 月 2 日. Toronto, Canada.
- ⑩ 畑俊行、上本伸二、小林英司、他. 自己肝細胞によるキメラ肝臓移植. 第 108 回日本外科学会総会. 2008 年 5 月 15 日. 大阪.

[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]

ホームページ等

<http://hbptsurgery.kuhp.kyoto-u.ac.jp/kantansui/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号： 40252449

(2) 研究分担者

小林 英司 (KOBAYASHI EIJI)

自治医科大学・医学部・客員教授

研究者番号： 00245044