

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：97106

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03744

研究課題名(和文) 医工連携によるミニチュアヒト肝臓創成とそのex vivo培養がもたらす革新的医療

研究課題名(英文) Innovative medicine brought about by the creation of miniature human liver using ex vivo culture through medical-engineering collaboration

研究代表者

山下 洋市 (Yamashita, Yoichi)

株式会社麻生(株式会社麻生飯塚病院医学研究推進本部)・外科・部長

研究者番号：00404070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミニチュアヒト肝臓内生着肝組織の分布均一化：HUVECで門脈を内皮化した後に細胞を肝動脈より播種する事で類洞様配列を再現したが分布は極めて不均一だった。そこで細胞播種条件を検討したところ 1×10^7 cells/mLのone shot播種より 1×10^5 cells/mLの低密度多段階播種の方が広範囲・均一に生着肝組織が確認された。Alb, HNF4A, CYP3A4などの発現もラット初代肝細胞なみに向上。

ミニチュア肝臓内での管腔様構造の再現：ヒト初代培養肝細胞+HUVEC+ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を鋳型肝臓に播種して4日間のex vivo還流培養を行い、組織内に径 $15 \mu\text{m}$ 程度の管腔様構造を確認。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミニチュアヒト肝臓の組織構築や肝特異遺伝子発現を評価しながら、医工連携により新たなex-vivo長期培養システム構築した。そのシステムにより、ミニチュアヒト肝臓内に肝特異的組織構築である類洞様構造と血管を模した管腔様構造を構築する事に成功した。

これまで脱細胞鋳型肝臓を再細胞化肝臓の散見されるが、肝血流の維持や酸素供給が問題となり、長期の還流培養に関する報告はない。再細胞化後の組織構築には十分な酸素が供給された状況での長期培養による細胞間クロストークの推進が重要であり、今回我々が実現したex-vivo培養長期培養システムは脱細胞鋳型を用いた再細胞化臓器作製にブレークスルーを起こす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Heterogenous distribution of engrafted liver tissue in miniature human liver: After endothelializing the portal vein using HUVECs, cells were seeded from the hepatic artery. This methods leaded a "sinusoidal arrangement". However, the distribution was extremely uneven. Therefore, we investigated cell seeding conditions specifically, and we found that liver tissue engrafted more widely and uniformly with low-density multi-stage seeding of 1×10^5 cells/mL than with one-shot seeding of 1×10^7 cells/mL. Gene expression of Alb, HNF4A, CYP3A4, etc. was also improved to the level of primary rat hepatocytes.

Reproduction of a vessel-like structure in a miniature liver: When primary human hepatocytes + HUVEC + human adipose-derived mesenchymal stem cells were seeded into a decellularized liver and subjected to the ex vivo perfusion culture for 4 days, vessel-like structures of which diameter was $15 \mu\text{m}$ was observed within the tissue.

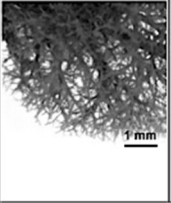
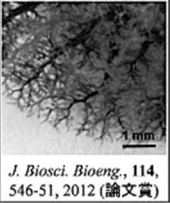
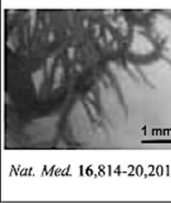
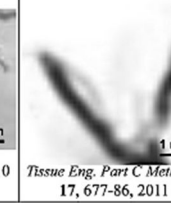
研究分野：再生医療、医工連携研究

キーワード：医工連携研究 ミニチュアヒト肝臓 脱細胞鋳型 ヒト由来機能性肝細胞・胆管細胞 オルガノイド
細胞鋳型肝臓 ex vivo培養 機能性ゲル基材

1. 研究開始当初の背景

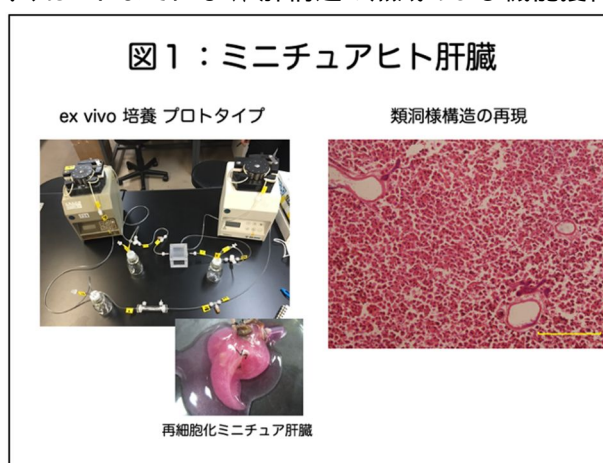
脱細胞鋳型肝臓を scaffold した人工肝臓の既報はあるが、我々が独自に開発した灌流法で得られた鋳型肝臓は、表 1 に示す通り、既報と比較しても明らかに精緻な血管網構造を保持している。

また、肝細胞は他の臓器よりも酸素消費速度が大きいため、ex-vivo 培養の実現のためには酸素供給が深刻な問題となり実現できていないのが現状である。そこで、極小型人工肺モジュールや人工血液を用いた高い酸素供給

正常肝臓	脱細胞化肝臓		
	本研究	B.E. Uygun, <i>et al.</i>	A. Soto-Gutierrez, <i>et al.</i>
			
	<i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 114, 546-51, 2012 (論文賞)	<i>Nat. Med.</i> 16,814-20,2010	<i>Tissue Eng. Part C Methods</i> , 17, 677-86, 2011

能を有する ex-vivo 培養システムを新たに構築する(図 1)。再細胞化肝臓の細胞間ネットワーク構築を促進する ex vivo 長期培養に関する試みはこれまでになく、肝臓の成熟および機能獲得を

実現への工夫として創造性の高い点と考える。また、これまでの脱細胞鋳型肝臓を scaffold とした人工肝臓の組織構築、機能評価に関する詳細な報告は皆無であり、今回医工連携研究として、詳細な病理学的評価・機能解析を行いながら臓器工学システムを構築していく事は大きな意義を持つと考える。また、我々は、精緻なラット同所性肝移植手技を確立しており、また一方でブタを用いた大動物実験も



行っており、ミニチュアヒト肝臓の新規移植肝グラフトとしての評価や、臨床応用を睨んだスケールアップも視野に入れて検討する予定である。

2. 研究の目的

臓器工学的手法を駆使し、新しい ex vivo 培養システムを構築して肝臓の構造を可能な限り模倣したミニチュアヒト肝臓を創成する事を目的とする。

- 1) ヒト初代培養細胞やヒト iPS 細胞から『機能性ヒト細胞(肝細胞・胆管細胞)』を得る。
- 2) 細胞の包埋に用いる『機能性ヘパリン導入ゼラチンゲル基剤』を最適化する。
- 3) 臓器構築の scaffold となる『内皮化されたラット脱細胞鋳型肝臓』を組み合わせる臓器工学システムを構築する。ミニチュアヒト肝臓を灌流培養して、高い肝組織構築(肝小葉・類洞形成)を実現する。
- 4) 新規医療展開を目指し、ミニチュアヒト肝臓の ex-vivo 培養システムにて薬剤代謝スクリーニングを行う。また、ミニチュアヒト肝臓を免疫不全ラットへ移植して肝特異機能を評価する。

3. 研究の方法

- 1) ヒト由来機能性肝細胞・胆管細胞の樹立:ヒト初代培養系とヒト iPS 細胞系の両面から増殖能を持つヒト由来機能性細胞(肝細胞・胆管細胞)を得る。初代培養肝細胞・胆管細胞とも in vitro での増殖能がないため、テロメラーゼ逆転写酵素遺伝子(hTERT)や SV-40 を導入し不死化させて増殖能を獲得させる。また、ヒト iPS 細胞から肝細胞または胆管細胞へ分化誘導して、高機能

ヒト由来肝細胞・胆管細胞を得る。

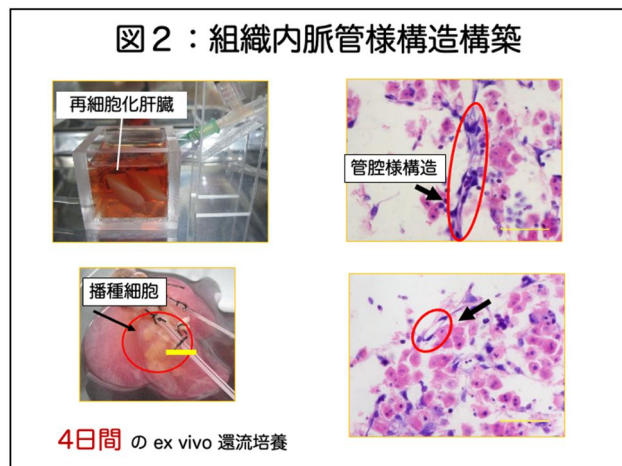
- 2) 機能性ゲル基材の最適化: 操作変数を強度、分解速度、ヘパリン導入密度として、ヘパリン導入ゼラチンゲル基材の最適化を図る。この機能性ゲル基材で包埋したヒト由来機能性細胞をディスク状の脱細胞化肝臓に播種して免疫抑制ラットの腹腔内に移植し、血管新生、肝組織構築、肝特異機能発現を評価する。
- 3) ex-vivo 還流培養による肝特異構造(類洞構造や脈管ネットワーク構築)の再現: 肝細胞・胆管細胞(またはADSC)・HUVECを上記機能性ゲル基材に混ぜてスフェロイド培養して、内部に脈管構造を持つオルガノイドを作製して肝動脈経由で低密度多段階播種し、7日間 ex vivo 還流培養する。肝特有の『類洞構築』と『脈管ネットワークの』が再現できるかが鍵と考えている。
- 4) ミニチュアヒト肝臓を用いた薬剤代謝スクリーニングや移植肝グラフトとしての機能評価: 本 ex-vivo 培養回路にリドカイン等の薬剤を投与して、CYP 発現・薬剤濃度変化・胆汁排泄を評価し、ミニチュアヒト肝臓の ex-vivo 薬剤スクリーニングキットとしての有用性を評価する。更に、免疫不全ラットの全肝を摘出し、ex-vivo 培養して高い肝組織構築を実現したミニチュアヒト肝臓を同所性に移植してその機能を解析する。

4. 研究成果

低密度多段階播種によるミニチュアヒト肝臓内生着肝組織の分布均一化: 前年までの検討 HUVEC で門脈を内皮化した後に細胞の播種経路を肝動脈とする事でミニチュアヒト肝臓内での肝細胞の類洞様配列を再現した。しかし、類洞様構造がみられる生着肝組織はミニチュアヒト肝臓の極く一部に限られ、その分布が極めて不均一だった。そこで、細胞播種密度や播種回数を変えてミニチュアヒト肝臓を作製し、生着肝組織の分布をH & E染色で検討した。

1×10^7 cells/mL の one shot 播種より、 1×10^5 cells/mL の低密度多段階播種の方が、ミニチュアヒト肝臓内の広範囲に均一に生着肝組織が確認された。Alb、HNF4A、CYP3A4 などの発現も向上し、高い肝特異機能の発現が確認された。

ミニチュア肝臓内での管腔様構造の再現: ヒト初代培養肝細胞 + HUVEC + ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) を鋳型肝臓に播種して4日間の ex vivo 還流培養を行った所、肝細胞の類洞様配列に加えて、組織内に径 $15 \mu\text{m}$ 程度の管腔様構造が確認できた(図2)。この管腔様構造と門脈が連結できれば、より高い肝特異構造を実現できると考えている。



オルガノイド播種による高い肝特異機能の発現: ヒト初代培養肝細胞をチップで培養してオルガノイド(粒径 $100 \mu\text{m}$ のスフェロイド)を作製し鋳型肝臓に播種して ex vivo 還流培養を行った所、ヒト初代培養肝細胞の単一細胞播種の場合より高いアルブミン分泌を示した。

オルガノイドへの酸素供給を増加させるための工夫: ヒト初代培養肝細胞 + HUVEC + ヒトADSC をチップで培養してオルガノイドを作製した。このオルガノイドを蛍光顕微鏡で観察すると、オルガノイドの中央部に HUVEC が集簇していた。酸素供給の最も悪いオルガノイドの中央部に脈管を創る事ができる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Kozue, Nakamura Shunsuke, Sakamoto Hiroki, Kondo Mika, Chouno Takehiro, Ikegami Yasuhiro, Shirakigawa Nana, Mizumoto Hiroshi, Yamashita Yo-ichi, Baba Hideo, Ijima Hiroyuki	4. 巻 131
2. 論文標題 Normothermic machine perfusion system satisfying oxygen demand of liver could maintain liver function more than subnormothermic machine perfusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.08.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下洋市, 中尾陽佑, 山尾宣暢, 宮田辰徳, 福田有嘉子, 坂本裕希, 中田捷太, 白木川奈菜, 井嶋博之, 馬場秀夫
2. 発表標題 我々の人工肝臓創出に関する医工連携研究の現状と展開 体外循環ハイブリッド型から埋め込み型移植肝グラフトへ
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下洋市, 井嶋博之, 馬場秀夫
2. 発表標題 臨床応用を目指した肝胆膵領域にける医工連携研究の現状と展望
3. 学会等名 JDDW 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呉帆崎, 福田有嘉子, 中田捷太, 中尾陽佑, 宮田辰徳, 山下洋市, 馬場秀夫, 井嶋博之
2. 発表標題 肝再生技術の開発とその有効性評価
3. 学会等名 第27回日本生物工学会九州支部大分大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井嶋博之, 呉帆琦, 福田有嘉子, 小柳和也, 趙宰庸, 堺裕輔, 宮田辰徳, 中尾陽佑, 山尾宣暢, 相島慎一, 山下 洋市, 馬場 秀夫
2. 発表標題 脱細胞化組織の応用展開
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Uehara Uyeda Mario Kokichi, Wu Fanqi, Fukuda Yukako, Sakai Yusuke, Shirakigawa Nana, Miyata Tatsunori, Nakao Yosuke, Yamao Takano, Aishima Shinichi, Yamashita Yo-ichi, Baba Hideo, Ijima Hiroyuki
2. 発表標題 Development and Functional Evaluation of a Miniature Liver Model (ミニチュア肝臓モデルの開発と機能評価)
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下洋市, 山尾宣暢, 中尾陽佑, 宮田辰徳, 福田有嘉子, 山根颯一郎, 坂本裕希, 白木川奈菜, 井嶋博之, 馬場秀夫
2. 発表標題 我々の肝胆膵外科領域における医工連携再生医療研究の現状と展望
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下洋市, 山尾宣暢, 中尾陽佑, 宮田辰徳, 福田有嘉子, 山根颯一郎, 坂本裕希, 白木川奈菜, 井嶋博之, 馬場秀夫
2. 発表標題 臨床に則した我々の肝胆膵外科領域における医工連携研究の現状と展望
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下洋市、井嶋博之、馬場秀夫
2. 発表標題 我々の肝胆外科領域における医工連携研究の現状と展望
3. 学会等名 JDDW 2020 KOBE
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wu Fanqi, 中田捷太, 福田有嘉子, 堺祐輔, 山下洋市, 宮田辰徳, 中尾陽佑, 山尾宣暢, 馬場秀夫, 井嶋博之
2. 発表標題 マウス肝臓の脱細胞化によるミニチュアヒト肝臓構築に向けた試み
3. 学会等名 2021年 日本生体医工学会九州支部学術講演会
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
研究分担者	井嶋 博之 (Ijima Hiroyuki) (10274515)	九州大学・工学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	馬場 秀夫 (Baba Hideo) (20240905)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	米満 吉和 (Yonemitsu Yoshikazu) (40315065)	九州大学・薬学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	相島 慎一 (Aishima shinichi) (70346774)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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