

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659317

研究課題名（和文）

移植に向けた肝像の種を作る試み

研究課題名（英文）

Reconstruction of liver on avian chorioallantoic membrane for the hepatic transplantation.

研究代表者

平野 茂樹 (HIRANO SHIGEKI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10018765

研究成果の概要（和文）：

移植可能な肝臓の種を鳥類漿尿膜上で再生させることを目標に、発生中の胚子肝臓を材料にし、漿尿膜上で組織学的に満足できる大型再生肝臓を得るための肝臓再生の条件を検討した。その結果、心筋細胞と肝臓細胞を混合し、共培養することで、基本的な肝臓の形態を有する大型再生肝臓を効率良く得る事が出来るようになった。また細胞学的な検索から再生肝臓の中で肝細胞が胎生型から成体型へ性質を転換し、移植に都合の良いことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

In order to reconstruct the liver which has an suitable size for the transplant, the developing chick liver cells cultured on the avian chorioallantoic membrane. When liver cells cultured with cardiac cells, large sized reconstructed liver was obtained readily. In this liver, it was indicated that hepatocytes changed their embryonic character to that of adult type. This phenomenon may be advantageous for the transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	0	2,100,000
2010年度	700,000	0	700,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	120,000	3,320,000

研究分野：挑戦的萌芽研究

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：肝臓外科学、心・肝混合細胞、共培養、鳥類漿尿膜、肝臓再生、類洞形成、内皮細胞、造血

1. 研究開始当初の背景

臓器移植が注目される中で、倫理的に問題の無い人工臓器の開発が注目され、再生人工移植肝臓を得るための多くの研究が行われていた。しかしいずれの研究も肝細胞の培養を基礎としていたため、肝細胞の集団はでき

るが、臓器にまで分化した再生肝臓を得ることは無かった。

2. 研究の目的

組織学的にも満足できる肝臓を再構築させることで移植できる肝臓の種を手に入れ

ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ニワトリあるいはダチョウ胚子漿尿膜を再生の場とする。

(2) 免疫系組織の分化が始まる前（ニワトリ胚子では孵卵9日、ダチョウ胚子では孵卵18日）の胚子を漿尿膜提供胚子とする。

(3) 造血前にある孵卵6日目のニワトリ胚子肝臓を移植材料とした。

(4) 移植方法

①移植を前に予めニワトリの場合は孵卵2日、ダチョウの場合は孵卵7日に卵殻に窓を開け、セロテープで塞いで孵卵器に戻し、移植当日まで孵卵した。

②移植当日、移植を前にジエチルエーテルを含ませた濾紙の小片を漿尿膜に押しつけ、漿尿膜を傷害した。その後更に上皮の一部を針で剝離した。

③孵卵6日目の胚子肝臓を取り出し、小片にしたもの、あるいはコラゲナーゼ処理した後、メッシュで濾過し、細胞を単離して作ったペレットを移植材料とし、小片を移植部位に置く、あるいは細胞混濁液をピペットで滴下した。

④孵卵6日目の肝臓からコラゲナーゼで単離した全細胞を培養し、培養皿の中で2日間培養し、増殖させた後に再び細胞を集め、移植した。

⑤研究の途中で肝臓細胞と心臓細胞の混合材料を移植することになり、3) 単離細胞作成手技と同じ方法で心臓・肝臓混合細胞を用意した。

⑥移植後窓をセロテープで塞ぎ、孵卵器の戻し、所定の期間孵卵を続けた。

(5) 固定と観察

移植後10%中性フォルマリンで経時的に固定し、パラフィンに包埋し、一般組織学的観察と各種免疫組織学的観察を併用し、生着状態、増殖・再生経過等を観察した。

4. 研究成果

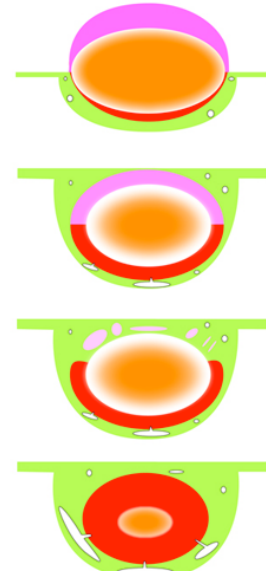
(1) 移植手技について

移植細胞の漿尿膜間葉への生着に障害となる漿尿膜上皮の剝離はジエチルエーテルによる前処理で目的が達せられる事が示されたが、更に漿尿膜間葉への沈下生着を促進する仲介物質として Fibronectin like protein (FLP) 前処理をすることが試され、極めて効率の良い生着となることを確認した。またジエチルエーテル処理の後に何もしなくても FLP を滴下するだけで十分生着することがわかり、漿尿膜を針で傷害する際に薄

い漿尿膜を穿孔し、胚子の発生を止めてしまう事が無くなり、効率良い実験を行える結果に繋がった。

(2) 移植材料の調整について (図1)

移植片の生着から再生に至るまでの経過を詳細に観察し、どんなに大きな移植片を使っても、再生するのは漿尿膜に接した数層の細胞からである事が判明したので、薄く広い面積を持った移植片の準備が検討され、細胞を解離し、ペレット状にしたものを移植材料として使用する方法が試された。その結果 FLP の使用と相まって細胞浮遊液 10ml 滴下しただけでも移植5日目



赤で示した領域のみ再生に寄与する
他は消滅する 緑は漿尿膜
図1 移植片肝臓が再生する過程の模式図

に直径1mmにもなる再生肝臓を得られるようになった。この結果、移植に向けた肝臓の種を作るための基本的手技が定まった。

(3) 肝臓再生について (図2)

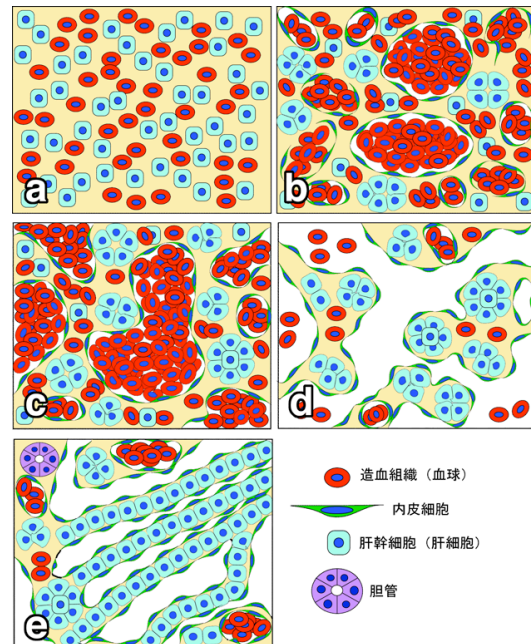


図2 単離肝臓細胞からの肝臓再生過程を示す模式図

造血幹細胞による造血の結果出現した血液細胞で占められた空間が内皮細胞で包まれており、それらの袋が連なって洞様血管になる。この時の内皮細胞の由来が造血幹細胞からか内皮細胞の肝細胞からなのかは不明。

肝臓の再生経過を詳細に観察し、移植片の中で造血の生じなかったものは類洞を持たないことに着目し、造血と類洞との関係をエポソ包埋した準超薄切片の観察と併せ、肝臓が機能を遂行する上で重要な構造となる類洞が造血と共に発生することを明らかにした。

これに関連して、これまで明確に示されていなかった類洞上皮細胞の起源について肝臓の中で分化した内皮細胞によって作られることを示した。この所見は肝細胞だけを培養したのでは類洞を備えた肝臓にならなかったこれまでの研究結果に理由を与えることになった。

これらの結果は、肝細胞だけを移植しても肝臓にならないことを示しており、移植に向けた肝臓の種を得るには、常に造血細胞と混合移植する必要があることを強く示唆するものである。

(4) 培養細胞からの肝臓再生について

肝臓を酵素処理し、得られた全細胞を混合したまま UpCell 上で培養して得られた増殖細胞はクローン細胞集団であることから、肝臓細胞、造血細胞はそれぞれ独立した集団を作っている。そのためシートのまま移植すると混在することなく、互いに独立して生着増殖した。その結果、肝臓細胞だけの集団と、血液細胞だけの集団が再生し、洞様血管を備えた肝臓にはならなかった。そこでシートを畳み、強制的に混合した状態を作り出して生着させたところ、血液細胞が洞様血管の中に閉じ込められることなく肝細胞や組織間隙に散在しているだけであった。すなわち、僅か2日の培養だけで内皮細胞を発生させる要素が消えてしまったことを示している。この結果は、肝臓の種を得るには、造血肝細胞と共に、内皮細胞の肝細胞も一緒に移植する必要のある事を示している。

(5) 肝臓・心臓混合細胞の移植について (図3)

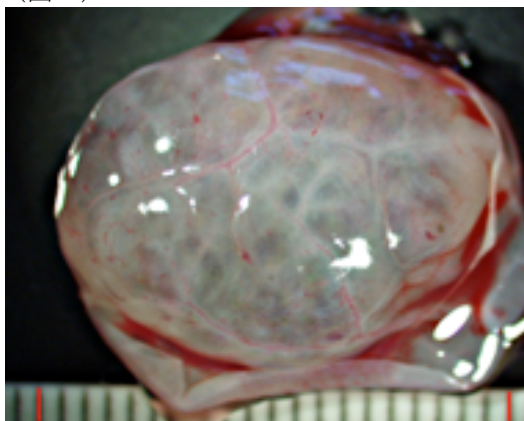


図3 ダチョウ漿尿膜上で得られた大型再生肝臓

文献的に心筋細胞と肝臓細胞を混合し、共培養することで、洞様血管が培養皿の中に出現することを知り、混合細胞を漿尿膜上に移植した場合を検証した。その結果、混合移植により大型再生肝臓を容易に得ることが出来るようになった。これまでニワトリ肝臓からの再生肝臓は最大で直径2mm程度であったが、肝臓・心臓混合細胞を移植した場合、直径5mmにもなる再生肝臓が容易に得られた。そこでダチョウ漿尿膜上で長期培養を試みたところ、直径3cm以上の再生肝臓が得られた。この結果は移植に向けた肝臓の種として十分な移植可能なサイズの再生肝臓が得られたことを示している。

(6) 心臓・肝臓細胞混合移植により得られた大型再生肝臓について (図4)

組織学的な検索を行ったところ、再生した大型肝臓に複数の小葉構造が確認され、組織学的にも正常肝臓に近いものになっていることが示唆された。また各小葉の中心に見られる中心静脈と思われる血管腔を連続的に再構築したところ、漿尿膜の静脈に繋がっていることを確認し、肝臓の中心静脈としての機能を果たしていることが示唆された。更にこれまでの肝臓細胞だけからの肝臓の再生過程と比較したところ、経時的に全く同じ再生経過をたどることが示され、心筋細胞が肝細胞の分化を妨げることは無いことが明らかになった。

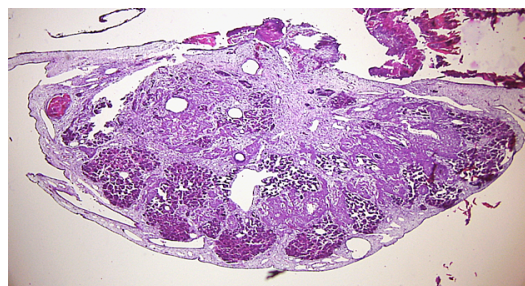


図4 ニワトリ胚子漿尿膜上で得られた肝臓・心臓細胞混合移植による再生肝臓のH-E染色像

小葉の中心に中心静脈を備えた多数の小葉が観察される。小葉の間には心筋細胞が介在し、小葉を分離している。

(7) 再生肝細胞の成熟過程について (図5)

細胞増殖の指標となるPCNA免疫組織化学染色を正常発生させた胚子肝臓に行ったところ、孵卵14日を過ぎると増殖を止め、成体型に性質を転換する事が示唆された。漿尿膜上で再生中の肝臓に対して同じ検索を行ったところ、移植7日目(孵卵13日)になるとPCNAの反応が弱くなり、10日(孵卵16日)では増殖を止めている事が判った。この所見は、移植された場合でも、再生肝臓は肝臓分化の経時的経過を乱すことなく発生を進め、漿尿膜上にあっても成体型へと変化する

る事を示している。この結果は、肝臓の種を移植する場合、移植が出生後の個体に行われる事を考慮すると都合の良い現象といえる。

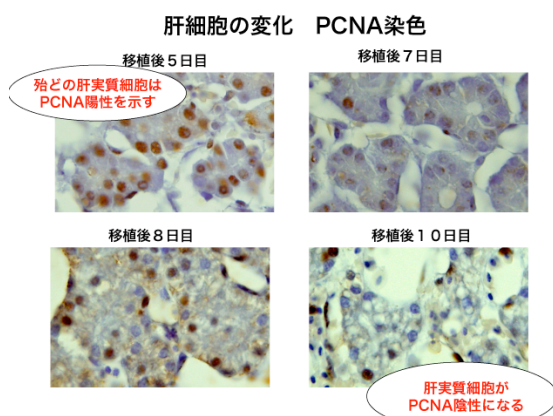


図5 PCNA染色で見た肝細胞の成熟

移植7日目(孵卵13日)から反応が鈍り、8日目には染色されない細胞が現れ、10日目(孵卵16日)になると殆どの細胞が無反応になり、細胞質内に空泡が現れていることがわかる。

(8) まとめ

移植に向けた肝臓の種を鳥類漿尿膜上で作る試みとして、鳥類肝臓を用いて再生を検討した結果、ほぼ移植可能なサイズで、肝臓としての基本構造を備えた再生肝臓を得られるまでになった。しかし最終目的はヒト肝臓の再生であるので、哺乳動物の肝臓を使った実験を行わなくてはならない。既にマウス肝臓を使った実験を試みており、生着までは確認した。今後は本研究を基にマウスを使って大型再生肝臓をつくる技術開発を行うことになる。

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)

Chiba, C. Yui and S. Hirano,
Liver Reconstruction on the
Chorioallantoic Membrane of the Chick
Embryo.
Arch. Histol. Cytol. 査読有
73(1):45-53(2011)

[学会発表] (計6件)

(1) 栗田絵里加、関根智美、平野茂樹、心・肝混合細胞移植による鳥類漿尿膜上での肝臓の再生実験。第117回日本解剖学会総会 2012年3月27日(甲府 山梨大学)

(2) 千葉映奈、平野茂樹、ダチョウ胚漿尿膜上におけるニワトリ胚肝臓の再生。第98回

日本解剖学会関東地方会 2010年10月16日

(東京 日本獣医生命科学大学)

(3) 千葉映奈、平野茂樹、ダチョウ胚漿尿膜上に移植されたダチョウ胚肝臓の動態 第9回 コ・メディカル形態機能学会 平成2010年9月11日(新潟 新潟大学保健学研究科)

(4) 栗田絵里加、青柳真佳、千葉映奈、平野茂樹、ニワトリ漿尿膜上に移植された培養細胞からの肝臓再生。第9回 コ・メディカル形態機能学会 2010年9月11日(新潟 新潟大学保健学研究科)

(5) 千葉映奈、油井千里、平野茂樹、ニワトリ漿尿膜上へのニワトリ胚肝臓の移植。第9回日本再生医療学会 2010年3月19日(広島 広島大学)

(6) 油井千里、千葉映奈、速水亮一、平野茂樹、マウス胎仔肝臓における洞様血管の発生について。第8回 コ・メディカル形態機能学会 2009年9月12日(京都 佛教大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 茂樹 (HIRANO SHIGEKI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：10018765

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし