

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461916

研究課題名(和文) 迅速な肝細胞複合シート作製技術を基盤とした急性肝不全治療

研究課題名(英文) Acute liver failure treatment using rapid fabricated engineered hepatocyte sheets

研究代表者

江口 晋 (EGUCHI, Susumu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80404218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性肝不全に対する性急な治療を可能にする、複雑多岐な肝臓機能をサポートし得る新しい技術の確立が望まれている。本研究では、急性肝不全の治療を可能にする、迅速な肝細胞複合シート作製技術の確立を目的とした。

肝癌等で外科的に切除した肝組織非腫瘍部からヒト初代肝細胞を分離した。35mm径の温度応答性培養皿にFBSをコーティングし、1500000 cells/dish以上の密度でヒト線維芽細胞(TIG-118細胞)を培養することで安定的にコンフルエント化することを実証した。支持細胞上にヒト初代肝細胞を播種すると迅速に接着し、計4時間以内に細胞シートとして回収可能であった。

研究成果の概要(英文)：It is desired to establish a new technology that can support complicated and diverse liver specific-functions that enables hasty treatment for acute liver failure. In this study, we aimed to establish rapid production technology of engineered hepatocyte sheet which makes it possible to treat acute liver failure.

Primary human hepatocytes were isolated from non-tumor area of surgically excised liver tissue. The human fibroblasts (TIG-118 cells) at a density of 1500000 cells/dish or more formed stably confluent onto FBS-coated 35-mm diameter temperature responsive culture dish. Primary human hepatocytes were quickly adhered onto TIG-118 cell layer. The engineered hepatocyte sheets could be harvested as a cell sheet within a total of 4 hours.

研究分野：消化器外科学

キーワード：急性肝不全 肝細胞 細胞シート 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性肝不全は昏睡期間と救命率に強い相関があり、迅速な治療を必要とする。現状では、血漿交換療法や持続的血液ろ過透析等による治療が行われているが、アンモニア除去等の一部の肝機能しかサポートできず治療効果には限界がある。肝臓が有する機能をサポートするためには肝移植が必要であるが、性急な肝移植の条件に適合するのは少数である。

(2) 肝移植の代替医療として肝細胞移植が試みられているものの、塞栓を考慮した移植肝細胞の量的制限と生着率の低さから、依然として確立されていない。研究代表者らは、この課題を開拓するアプローチとして細胞シート工学に着目し、血管増殖因子を産生する線維芽細胞シート上にヒト肝細胞を接着させた肝細胞/線維芽細胞複合シート(以下、肝細胞複合シート)の作製に成功した(Sakai Y, et al., *PLoS One*, 2013)。優れた皮下生着が可能であることから、低侵襲かつ有効な肝再生医療となり得る可能性を秘めている。

(3) これらの背景から、肝細胞複合シートをより迅速かつ高効率に作製・移植することができれば急性肝不全患者を救命できると着想した。既存の肝細胞複合シート作製手法では、4~7日間の培養期間を必要とする。そこで、支持細胞として採取・培養・増殖・凍結保存が容易な線維芽細胞や間葉系幹細胞等を高密度播種して迅速にコンフルエントにすることにより、培養数時間で肝細胞複合シートを安定的に作製できると発想した。

2. 研究の目的

(1) 肝細胞複合シートを数時間で安定的に迅速作製し得る技術を確立する。

(2) 肝細胞複合シートによる急性肝不全治療を実証する。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞複合シートの迅速作製及び性能評価

35mm 径の温度応答性培養皿(UpCell; セルシード社)にFBSをコーティングした。ヒト皮膚由来線維芽細胞(TIG-118細胞)もしくはヒト脂肪由来幹細胞(hADSC)を $0.5\sim 2.0\times 10^6$ cells/dishで播種した。培養2時間後、位相差顕微鏡で観察し、コンフルエント率を解析した。

コラゲナーゼ灌流法を用いて、肝癌等で外科的に切除した肝組織非腫瘍部からヒト初代肝細胞を調製した。支持細胞上にヒト初代肝細胞を 1.0×10^6 cells/dishで播種した。播種2時間後に温度を 20°C に低下させ、UpCellから肝細胞複合シートを回収した。重度免疫不全マウス(NOGマウス)の皮下に移植し、経時的にマウスの尾から血清を採取し

た。血清中のヒトアルブミン濃度をELISAで測定した。

(2) ヒト初代肝細胞の凍結

迅速な肝細胞複合シート作製のためには、常時使用できる初代肝細胞ストックが必要である。従って、市販及び調製した14種類の凍結保存培地を利用し、ヒト初代肝細胞の凍結を行った。BICELL(日本フリーザー)、プログラムフリーザー1(KRYO 560; PLANER)、プログラムフリーザー2(PDF-2000; ストレックス)を用い、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -80°C まで緩慢凍結した後、24時間後に液体窒素に浸漬した。 37°C で解凍後、トリパンブルー染色により生存率をカウントした。

(3) 術後急性肝不全モデルマウスに対する肝細胞複合シートの移植

ICRマウス(7~9週齢)の正中を小切開して中葉と左葉を、拡大切開して右葉を結紮・切除し、術後急性肝不全モデル(90%部分肝切除)の作製を試みた。

ヒト線維芽細胞をUpCell上に 2.2×10^5 cells/dishで播種し、3日間培養・コンフルエント化した。ヒト初代肝細胞を 1.0×10^6 cells/dishで播種して4日間培養し、肝細胞複合シートを作製した。重度免疫不全マウス(NSGマウス)の皮下に移植し、皮下性肝組織を作製した。移植1週間後に90%部分肝切除を実施し、生存を評価した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞複合シートの迅速作製

TIG-118細胞は 1.5×10^6 cells/dish、hADSCは 0.75×10^6 cells/dish以上で播種することにより、2時間以内にコンフルエントに達した。さらに、FBSをコーティングすることによって、TIG-118細胞を安定的にコンフルエント化できることを実証した(図1)。

ヒト初代肝細胞を播種すると迅速に接着し、計4時間以内に肝細胞複合シートを回収可能であった。一方、あらかじめ線維芽細胞と初代肝細胞を混合して播種すると、播種後2時間以内にコンフルエント化した。安定的な回収可能は困難であった(図2)。

迅速作製肝細胞複合シートを免疫不全マウスの皮下に移植すると、肝細胞のみと比較して高い機能発現が見られた。一方、4日間肝細胞培養した従来手法で作製した肝細胞複合シートと比較したところ、やや低値であった。

(2) ヒト初代肝細胞の凍結

市販の凍結培地や臓器保存に用いられるビアスパン等を用いて凍結を試みたが、融解後の生存率は極めて低下した。プログラムフリーザーを利用して凍結の際の潜熱を極力抑制するよう試みたが、ヒト初代肝細胞の凍結保存に対する効果はほとんどなかった。一方、凍結保存培地としてInVitroFREEZE

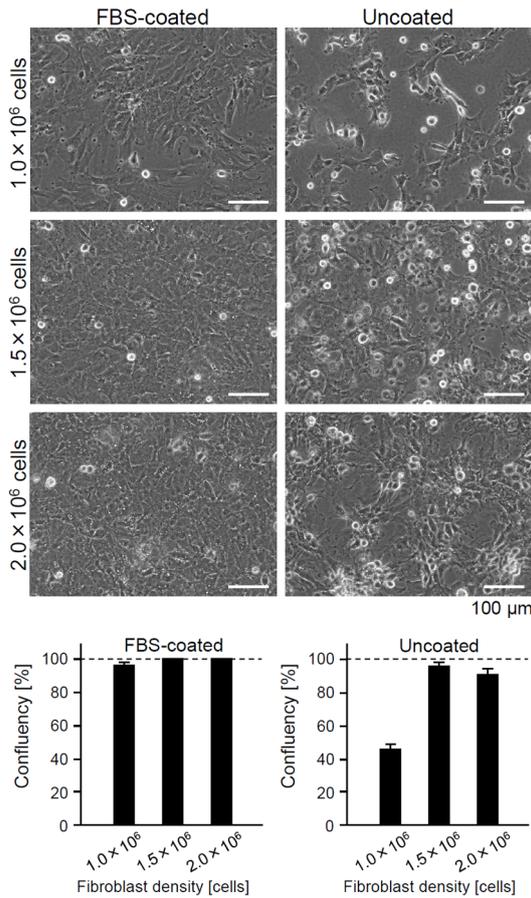


図1. TIG-118細胞の播種密度とコンフルエント化

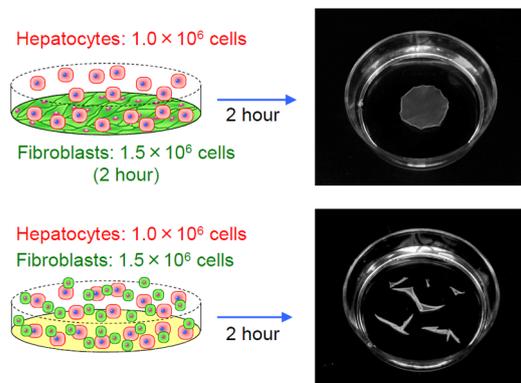


図2. 迅速作製肝細胞複合シート

cryopreservation Medium (Bioreclamation IVT、現在生産終了)を用いた場合のみ、比較的優れた生存率を維持した。加えて、DMSOを徐々に添加する手法を採用することで、初代肝細胞に対する傷害が更に抑制されたと考え得る。しかしながら、ヒト初代肝細胞シートを効率的に作製するに足る生存状態を維持するには至らなかった。

(3) 急性肝不全モデルマウスに対する肝細胞複合シートの移植治療効果

ICR マウス (6 週齢) を 90% 部分肝切除すると 72 時間後生存率は 33% であり、術後急性肝不全モデルとして有望であることを明

らかにした (図 3)。

ヒト初代肝細胞と線維芽細胞で構成した肝細胞複合シートを用い、急性肝不全モデルの救命が可能であるかを評価した。90% 部分肝切除した重度免疫不全マウス (術後急性肝不全モデル) の皮下に移植したが、残念なことに非移植群と比較して生存延長効果は見られなかった。

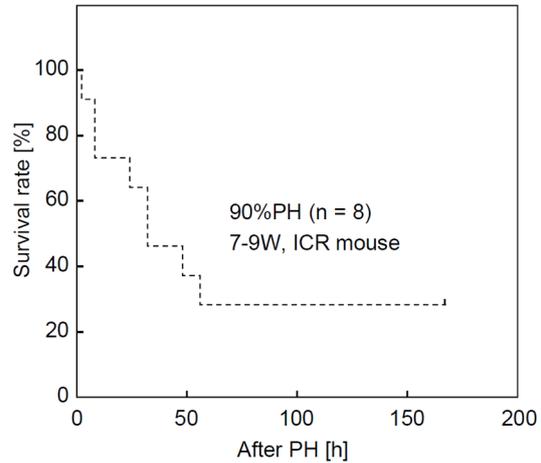


図3. 90%部分肝切除後の生存率

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Zhassulan Baimakhanov, Yusuke Sakai, Kosho Yamanouchi, Masaaki Hidaka, Akihiko Soyama, Mitsuhsa Takatsuki, Susumu Eguchi. Spontaneous hepatocyte migration towards an endothelial cell tube network. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (3), e1767-e1771, 2018. (査読有) doi: 10.1002/term.2577.
- ② Mio Fujii, Kosho Yamanouchi, Yusuke Sakai, Zhassulan Baimakhanov, Izumi Yamaguchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. In vivo construction of liver tissue by implantation of a hepatic non-parenchymal/adipose-derived stem cell sheet. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (1), e287-e295, 2018. (査読有) doi: 10.1002/term.2424.
- ③ Yusuke Sakai, Makiko Koike, Daisuke Kawahara, Hideko Hasegawa, Tomomi Murai, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Fumihiko Fujita, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Controlled cell morphology and liver-specific function of engineered primary

- hepatocytes by fibroblast layer cell densities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125 (7), 1525-1537, 2018. (査読有)
doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.006.
- ④ 堺裕輔、江口晋. 細胞シートによる消化器の創傷治癒と機能性臓器の作製, *MEMBRANE*, 43 (2), 34-39, 2018. (査読無)
doi.org/10.5360/membrane.43.34
- ⑤ 岡田尚子、堺裕輔、江口晋. 細胞を用いた肝再生医療の最前線, *PHARMSTAGE*, 17 (9), 10-16, 2017. (査読無)
- ⑥ Ikuko Takahara, Yuko Akazawa, Maiko Tabuchi, Katsuya Matsuda, Hisamitsu Miyaaki, Youko Kido, Yasuko Kanda, Naota Taura, Ken Ohnita, Fuminao Takeshima, Yusuke Sakai, Susumu Eguchi, Masahiro Nakashima, Kazuhiko Nakao. Toyocamycin attenuates free fatty acid-induced hepatic steatosis and apoptosis in cultured hepatocytes and ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*, 12 (3), e0170591, 2017. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0170591.
- ⑦ Shuai Zhang, Tao-Sheng Li, Akihiko Soyama, Takayuki Tanaka, Chen Yan, Yusuke Sakai, Masaaki Hidaka, Ayaka Kinoshita, Koji Natsuda, Mio Fujii, Tota Kugiyama, Zhassulan Baimakhanov, Tamotsu Kuroki, Weili Gu, Susumu Eguchi. Up-regulated extracellular matrix components and inflammatory chemokines may impair the regeneration of cholestatic liver. *Scientific Reports*, 6, 26540, 2016. (査読有)
doi: 10.1038/srep26540.
- ⑧ Askhat Isbambetov, Zhassulan Baimakhanov, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Yusuke Sakai, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Equal distribution of MSCs after hepatic ischemia reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 203 (2), 360-367, 2016. (査読有)
doi: 10.1016/j.jss.2016.03.057.
- ⑨ Zhassulan Baimakhanov, Kosho Yamanouchi, Yusuke Sakai, Makiko Koike, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Fumihiko Fujita, Kengo Kanetaka, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Efficacy of
- multi-layered hepatocyte sheet transplantation for radiation-induced liver damage and partial hepatectomy in a rat model. *Cell Transplantation*, 25 (3), 549-558, 2016. (査読有)
doi: 10.3727/096368915X688669.
- ⑩ Yusuke Sakai, Kosho Yamanouchi, Kazuo Ohashi, Makiko Koike, Rie Utoh, Hideko Hasegawa, Izumi Muraoka, Takashi Suematsu, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered hepatocyte/fibroblast sheets in mice. *Biomaterials*, 65, 66-75, 2015. (査読有)
doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.046.
- ⑪ Yusuke Sakai, Makiko Koike, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Rapid production of engineered human primary hepatocyte/fibroblast sheets. *Data in Brief*, 5, 498-501, 2015. (査読有)
doi: 10.1016/j.dib.2015.09.044.
- ⑫ Izumi Muraoka, Mitsuhsa Takatsuki, Yusuke Sakai, Tetsuo Tomonaga, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Yoshitaka Hishikawa, Takehiko Koji, Rie Utoh, Kazuo Ohashi, Teruo Okano, Takashi Kanematsu, Susumu Eguchi. Transplanted fibroblast cell sheets promote migration of hepatic progenitor cells in the incised host liver in allogeneic rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9 (11), E108-E115, 2015. (査読有)
doi: 10.1002/term.1718.
- ⑬ Zhassulan Baimakhanov, Kosho Yamanouchi, Yusuke Sakai, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Fumihiko Fujita, Kengo Kanetaka, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi. Efficacy of multi-layered hepatocyte sheet transplantation for radiation-induced liver damage and partial hepatectomy in a rat model. *Journal of the American College of Surgeons*, 221 (4), Supplement 1, S157, 2015. (査読有)
- ⑭ 堺裕輔、江口晋. 組織工学による低侵襲な肝疾患治療, *細胞*, 47 (8), 18-21,

2015. (査読無)

- ⑮ Yusuke Sakai, Makiko Koike, Hideko Hasegawa, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Teruo Okano, Susumu Eguchi. Rapid fabrication of engineered liver tissue using novel fibroblast system. ALTEX Proceedings, 3 (1), 44, 2014. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 江口晋、黄宇、堺裕輔；効率的・移植可能な肝胆膵領域での再生医療；第 17 回日本再生医療学会総会、横浜、2018 年 3 月 21 日。(シンポジウム、指定演者)
- ② 堺裕輔、高槻光寿、江口晋；細胞シート工学を利用した血管網を有する皮下培養型ヒト肝組織作製；第 103 回日本消化器病学会総会、東京、2017 年 4 月 22 日。(ワークショップ、査読有)
- ③ 堺裕輔、小池真章子、曾山明彦、日高匡章、高槻光寿、江口晋；術後急性肝不全予防のための迅速な肝細胞複合シート作製；第 16 回日本再生医療学会総会、仙台国際センター(宮城県、仙台市)、2017 年 3 月 7 日。(ポスター、査読有)
- ④ 堺裕輔、小池真章子、長谷川英子、山之内孝彰、曾山明彦、日高匡章、高槻光寿、江口晋；肝特異的な特徴を有するヒト肝組織の皮下構築と機能発現解析；第 23 回肝細胞研究会、大阪大学中之島センター(大阪府、大阪市)、2016 年 7 月 7 日。(口頭、査読有)
- ⑤ 小池真章子、堺裕輔、川原大輔、高槻光寿、江口晋；安定した肝細胞複合シート作製のための線維芽細胞培養条件の検討；第 23 回肝細胞研究会、大阪大学中之島センター(大阪府、大阪市)、2016 年 7 月 7 日。(ポスター、査読有)
- ⑥ 堺裕輔、小池真章子、山之内孝彰、曾山明彦、日高匡章、黒木保、江口晋；皮下性ヒト肝組織構築に伴う血管網と肝特異機能発現の評価；第 15 回日本再生医療学会総会、大阪、2016 年 3 月 17 日。(口頭、査読有)
- ⑦ 堺裕輔、小池真章子、長谷川英子、山之内孝彰、曾山明彦、日高匡章、黒木保、江口晋；皮下性ヒト肝組織構築による肝疾患治療；第 22 回肝細胞研究会、鳥取、2015 年 6 月 4 日。(シンポジウム、査読有)

- ⑧ 小池真章子、堺裕輔、川原大輔、黒木保、江口晋；支持細胞密度による初代肝細胞の形態および機能発現制御；第 22 回肝細胞研究会、鳥取、2015 年 6 月 4 日。(ポスター、査読有)

- ⑨ Yusuke Sakai, Makiko Koike, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Susumu Eguchi; Reconstruction of vascularized subcutaneous liver tissue for minimally invasive cell therapy; ASGCT 18th Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, 15 May. 2015. (ポスター、査読有)

- ⑩ 堺裕輔、小池真章子、長谷川英子、山之内孝彰、曾山明彦、日高匡章、高槻光寿、黒木保、江口晋；細胞シート工学を利用した血管誘導ヒト肝組織の迅速な自己構築；第 115 回日本外科学会定期学術集会、名古屋、2015 年 4 月 18 日。(パネルディスカッション、指定演者)

- ⑪ Yusuke Sakai, Makiko Koike, Hideko Hasegawa, Kosho Yamanouchi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhsa Takatsuki, Tamotsu Kuroki, Teruo Okano, Susumu Eguchi; Rapid fabrication of engineered liver tissue using novel fibroblast system; 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9), Prague, Czech Republic, 25 Aug. 2014. (ポスター、査読有り)

[その他]

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 移植・消化器外科
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/surgery2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 晋 (EGUCHI, Susumu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80404218

(2) 研究分担者

堺 裕輔 (SAKAI, Yusuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：10608904

山之内 孝彰 (YAMANOUCHI, Kosho)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：10448508

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

小池 真章子 (KOIKE, Makiko)

長谷川 英子 (HASEGAWA, Hideko)

大橋 一夫 (OHASHI, Kazuo)

高槻 光寿 (TAKATSUKI, Mitsuhsa)

日高 匡章 (HIDAKA, Masaaki)

曾山 明彦 (SOYAMA, Akihiko)