

ニッポン放送賞

# 脱細胞化肝臓を足場とした肝臓構築技術の開発

九州大学大学院 工学府 物質プロセス工学専攻  
博士後期課程 2年

白木川 奈菜

# 1. 諸 言

肝臓はヒトの生体内において最も大きな臓器であると同時に、非常に多種類の機能を有している。その構造は右葉、左葉、方形葉、尾状葉という四葉からなり、重量にして成人体重の約1/50に相当する約1.5 kgである(図1)。肝臓の機能は、タンパク質や糖質をはじめとする生体に必要な物質の合成、貯蔵、アルコールなどの代謝解毒など複雑多岐にわたっている。そのため、機能不全に陥ると重大な生命の危機につながるが、重度の肝不全患者に対する根本的な治療法は肝移植しかない。肝移植は心臓死ドナーからの移植はできないため、脳死ドナーもしくは親族からの生体肝移植<sup>1</sup>しかなく、慢性的なドナー不足や拒絶反応が大きな問題となっている。複雑多岐な機能を有するゆえに機械的な人工臓器の開発は困難である。細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓は即効性が期待できるが、血液を体外で循環させるため適用時間が制限されるという大きな問題がある。

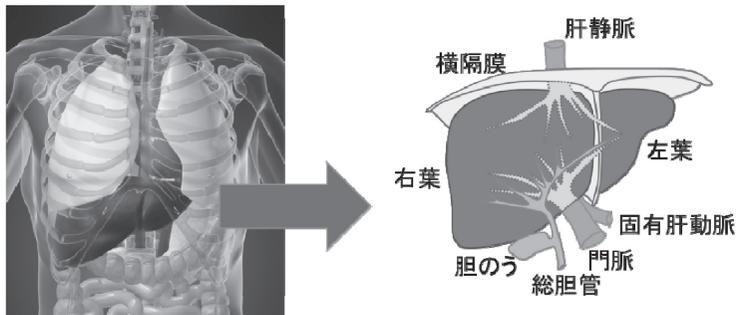


図1 肝臓の位置と構造

近年、体内で臓器を再構築しようという再生医工学の誕生によりこれらの問題の解決が期待された [1]。肝臓は再生能を有する臓器<sup>2</sup>なので、正常な肝臓の 20 ~ 30% の組織が構築できれば、根本的な治療に用いることが可能であると考えられる。しかしながら、肝細胞<sup>3</sup>は酸素消費速度が高いために緻密な血管網がなければ、厚さ 100 $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>程度の組織までしか生存できない。既往の研究では構築できる肝組織の厚みは最大1 mm 程度であり、肝臓の代替組織として使用するには程遠い。

本研究では実用的な肝組織構築を目指して以下のようなアプローチを考案した。肝細胞の配置密度を生体内における肝臓の 1/100 にすると厚さ 1 mm 程度までは周囲からの拡散で酸素や栄養素の供給が可能であると仮説をたてた。まず 1 mm 程度の間隔の血管網を有する組織を構築し、その血管網周囲に生体内における肝臓の 1/100 の密度で肝細胞を有する組織を作製する。その作製した肝組織を体内に移植し、生体内において肝細胞の増殖や毛細血管の新生を誘導する。以上により根本的な治療が可能な規模の肝組織を構築するというもので

1 健康なドナーから右葉、もしくは左葉を摘出し、患者に移植するという治療法。健康なドナーを傷つける上、患者はもちろん健康なドナーも命の危険を伴う。  
2 生体肝移植等でヒトの肝臓を半分程切除した場合でも約1年で元の大きさになる。  
3 肝臓の大部分を構成し、肝臓の主な機能を担う細胞。特徴として、大きさが直径約 20  $\mu\text{m}$  と他の細胞より大きく、約 40 % の確率で核を 2 つ持つ。  
4 1 mm = 1000  $\mu\text{m}$

ある。これを実現するために、本研究では脱細胞化肝臓を足場としてあらかじめ1 mm 以下の間隔にて血管網を構築し、その周囲にゲルに懸濁した肝細胞を配置することにより血管網を有する肝初期構造体を作製する。そしてそれを移植して肝細胞の増殖や毛細血管網の新生を促し、治療に有効な規模の肝組織の構築を目指す(図2)。本論文では① 1 mm 程度の間隔で肝細胞が生存可能という仮説の検証、② 足場となる脱細胞化肝臓の取得、③ 脱細胞化肝臓を足場とした血管網の構築、④ 脱細胞化肝臓への肝細胞の配置、⑤ ③と④を組み合わせた肝初期構造体の構築について報告する。

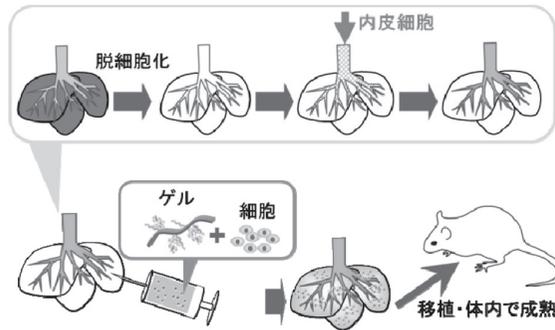


図2 本研究のコンセプト

## 2. 実験

### 2.1 1 mm 程度の間隔で肝細胞が生存可能という仮説の検証

この仮説を検証するため、厚さ1 mm のモデル組織を作製してラット皮下に移植した。モデル組織としては、ポリウレタンフォーム (PUF)<sup>5</sup>で厚さ1 mm、直径1 cm の円盤状のディスクを作製し、その中に肝細胞懸濁ゲルを満たしたものをを用いた。肝細胞懸濁密度は生体肝(約 $1 \sim 2 \times 10^8$  cells/ml)の1/100の密度として、 $10^6$  cells/mlとした。一部の被移植ラットには部分肝切除<sup>6</sup>を施した。移植7日間後に摘出し、組織学的評価<sup>7</sup>を行い、観察された肝細胞の核数を計数した。動物実験に関しては動物愛護、生命倫理の観点に十分に配慮し、所属機関における学内規定に従い、適切に取り扱うこととし、承認された計画書に従い、安全の確保に最大限の注意を払って研究を進めている。

摘出後のサンプルを厚さ4  $\mu$ m にスライスして組織学的評価を行ったところ、1 mm<sup>2</sup>あたり $2.6 \pm 1.1$ 個の肝細胞の核が観察された [2]。この結果から、厚さ1 mm の血管がない空間でも、肝細胞の密度が低ければ肝細胞が生存可能であることがわかる。また、部分肝切除を施したラットに移植したサンプルでは、1 mm<sup>2</sup>あたり $8.2 \pm 3.6$ 個の肝細胞の核が観察された [2]。部分肝切除により、肝細胞の増殖を促進する因子が体内で大量に分泌され、その影響で移植した肝細胞の生存率が向上したのと考えられる。つまり、部分肝切除によりラット体内で誘発された状態を移植した肝細胞周囲に再現できれば、生存率の向上が期待できる。

5 空隙率は95%以上で、モデル組織はほぼゲルで構成される。生体に分解されにくく、移植後でも観察できる。

6 肝臓を全体の70%程切除すること。ラットの場合、約1週間で元の大きさになる。

7 本論文では核を紫に、細胞質をピンクに染色するHE染色を用いた。

以上のことから、血管網が1 mm 以下の間隔であれば、移植する肝細胞が生存可能であると期待され、仮説が正しいと示唆された。

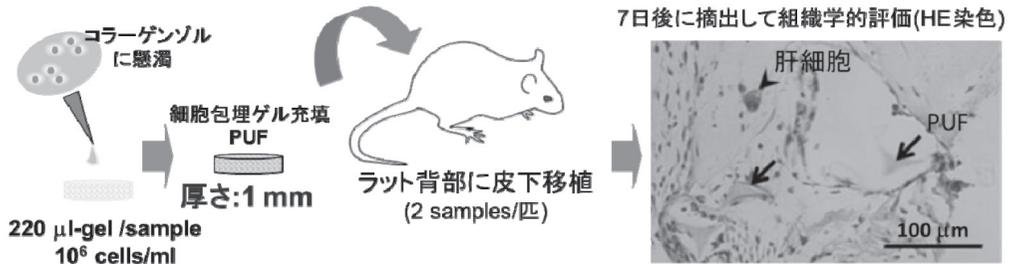


図3 移植の流れと結果

## 2.2 足場となる脱細胞化肝臓の取得

移植した肝細胞への酸素供給を効率的に行うためには臓器規模の血管網構築が必須である。規則的な形状の積み重ねなどは報告されている [3] が、根元から血管の末梢に向かうにつれ細くなるといった階層構造を臓器規模で達成できている人工的な足場材料はまだ開発されていない。そこで、本研究では脱細胞化肝臓に注目した。脱細胞化肝臓とは、肝臓から細胞を抜き去ったものである。細胞を抜き去るので、心臓死ドナーやブタ等の異種動物からの臓器提供が可能となり、ドナー不足の解消が期待できる。この脱細胞化肝臓を足場として血管網が構築できないかと考えた。そこで、血管構造を保ちつつも細胞を抜き去ることができるよう肝臓の脱細胞化条件を最適化した。門脈から種々の界面活性剤溶液<sup>8</sup>を注入すること

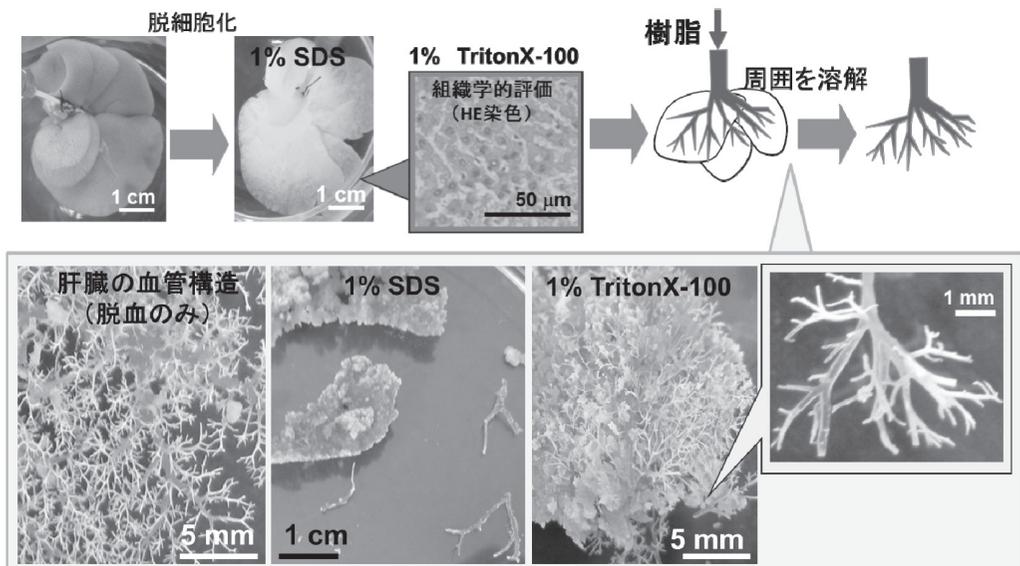


図4 脱細胞化条件最適化の過程

8 洗剤の一種。細胞膜のリン脂質を溶解させる。

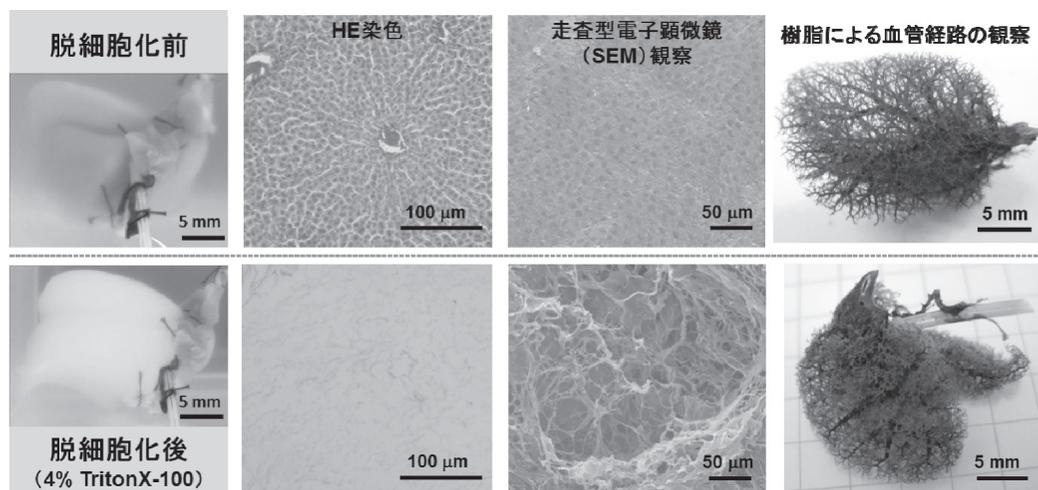


図5 最終的に得られた脱細胞化肝臓と脱細胞化前の肝臓の比較

で脱細胞化を行った。血管構造を観察するため、血管構造に樹脂を注入して、周囲の組織を溶解し、血管構造の型取りを行った。また、細胞が抜けているかを観察するために組織学的評価を行った。

強すぎる脱細胞化条件 (1% SDS) では血管経路が崩壊した。一方で弱すぎる脱細胞化条件 (1% TritonX-100) では血管経路が維持されたが、細胞構成物が残ってしまった (図4) [4]。様々な条件を試した結果、4% TritonX-100溶液を 3時間流入後、0.5 mg/ml DNase I, RNase A<sup>9</sup> 添加緩衝液を 37℃下で 6時間還流することにより、血管構造を維持しつつも細胞を抜き去った脱細胞化肝臓を取得することに成功した (図5) [4, 5]。

### 2.3 脱細胞化肝臓を足場とした血管網の構築

緻密な血管構造を有する脱細胞化肝臓を得ることができたので、それを足場とした血管網の構築を目指した。血管は層構造をとっているが、今回は血管化の第一歩としてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)<sup>10</sup>を用いて内皮化<sup>11</sup>を試みた。2×10<sup>6</sup>個の内皮細胞を門脈側から播種し<sup>12</sup>、3日間培地循環培養<sup>13</sup>を行った。さらに内皮化の機能を観察するため、培養後の脱細胞化肝臓の門脈側から血液を注入した。

内皮細胞を播種して培養3日後、組織学的評価から、内皮細胞が血管構造の内壁を覆うようにして伸展している様子が観察された。また、血管構造からその周囲への内皮細胞の漏洩は観察されなかった。このとき蛍光顕微鏡により播種前に Cell Tracker Orange<sup>14</sup>で赤色蛍光を取り込ませていた HUVEC を観察したところ、血管構造に沿って存在している様子が観察された。さらに、この培養後の脱細胞化肝臓に対して、門脈側から血液を注入した

9 DNA, RNA を分解する酵素。

10 インフォームドコンセプトの下に採取されるが、国内での採取は許可されていないため、海外からの輸入となる。

11 内皮細胞で流路の内壁を覆うこと。

12 細胞を播くこと。

13 チューブにより回路を作製して、細胞の培養液である培地を、ポンプで循環させながら培養した。

14 CellTracker 添加培地に 30 分程さらすことで、細胞に蛍光物質を取り込ませることができる。

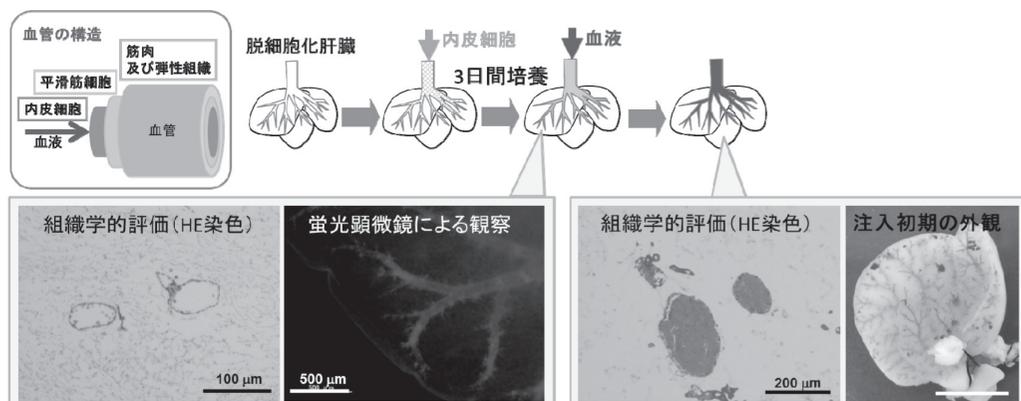


図6 培養後、及び血液注入後の脱細胞化肝臓の組織学的評価と外観

ところ、血液が血管構造に沿って樹状に流入し、内皮化された血管構造部分から赤血球がその周囲組織に漏洩してないことが観察できた(図6) [5]。以上のことから、脱細胞化肝臓の内皮化により、赤血球の漏洩を防ぐ臓器規模の血管網構築が期待できる。

## 2.4 脱細胞化肝臓への肝細胞の配置

脱細胞化肝臓への肝細胞の配置方法として、本研究では3通りの播種方法を考案した。(i) 門脈側から培地に懸濁して肝細胞を注入する方法 (ii) 肝静脈側から培地に懸濁して肝細胞を注入する方法 (iii) コラーゲンゲルに懸濁して周囲から針付シリンジを用いて肝細胞を播種する方法 の3つである。(i) , (ii) については血管構造を利用するので均一な播種が期待できる。また、細胞同士が接着することで細胞間相互作用<sup>15</sup>による肝機能発現の向上も期待される。(iii) についてはコラーゲンゲルに包埋して培養することで、肝機能発現の向上が期待される一方で、針で刺すことによる血管構造の崩壊が危惧される。

この3通りの播種方法を比較するため、脱細胞化肝臓に対して、それぞれ  $10^7$  個のラット

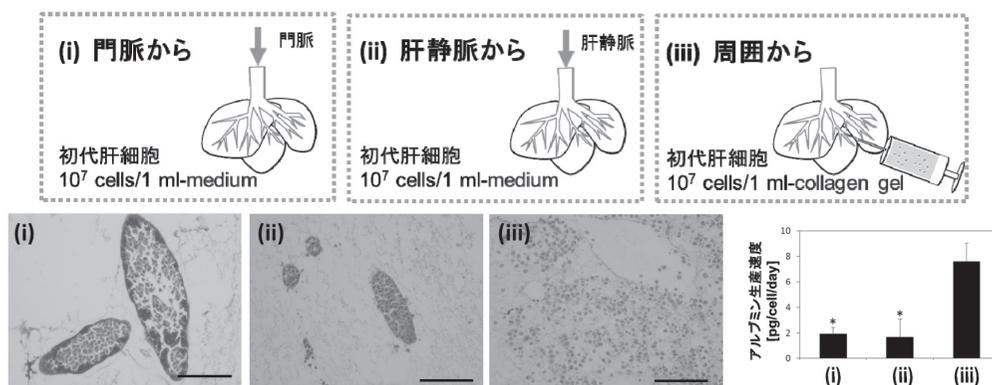


図7 肝細胞播種条件と培養後の組織学的評価及び肝機能評価の結果

15 細胞同士がお互いにシグナルを与えあうこと。

初代肝細胞<sup>16</sup>を播種し、培地循環培養を1日行った後、組織学的評価ならびに肝機能評価を行った。肝機能評価としては、肝特異的機能であるタンパク質の合成能の指標として一般によく用いられるアルブミン合成能を評価した。

組織学的評価から、血管構造を利用して肝細胞を播種した(i)と(ii)では、播種した肝細胞で血管構造が詰まっている様子が観察された。これは本研究で作製した脱細胞化肝臓が緻密な血管構造を有するためであると考えられる。一方、周囲から針付シリンジを用いて肝細胞を播種した(iii)では、血管構造の周囲に肝細胞が分散して配置できている様子が観察された。アルブミン生産速度を評価したところ、(iii)が最も高い値を示した。

この理由として、(i)、(ii)では、肝細胞が流路内で詰まり、流動を妨げてしまい、肝細胞に十分な酸素供給等が行えない部分が生じていたことが考えられる。一方で、(iii)では血管構造周囲に肝細胞が観察されたために、(i)、(ii)よりも培地が流れていたことが期待される。また、コラーゲンゲルに包埋したことによる肝機能向上も考えられる [6]。

以上のことから、本研究において脱細胞化肝臓への肝細胞の播種方法としては(iii)が適していることが示された。

## 2.5 2.3と2.4を組み合わせた肝初期構造体の構築

2.3から、血管構造に内皮細胞を配置可能なこと、2.4から肝細胞播種方法には周囲から注入する方法が本研究には適していることが示唆された。そこで、それぞれ今後の検討課題は山積しているが、この2つを組み合わせることが可能なかを評価するため、脱細胞化肝臓の内皮化及び肝細胞培養を同時に試みた。

CellTracker Green で緑色蛍光を取り込ませた  $10^6$  個の肝細胞 (ヒト肝がん由来細胞株 HepG2細胞<sup>17</sup>) を 1 ml のコラーゲンゲルに懸濁して2.4と同様に周囲から注入した。一方、CellTracker Orange で赤色蛍光を取り込ませた内皮細胞 (HUVEC) を 2.3と同様に  $2 \times 10^6$  個、門脈側から播種した。3日間培地循環培養を行い、組織学的評価と蛍光顕微鏡による観察を行った。

全体にわたって解析できているわけではないが、内皮細胞が血管構造に配置され、その周囲に肝細胞が配置できている様子が観察された(図8) [5]。このことから、脱細胞化肝臓を足場とした肝初期構造体の構築が期待できると考えられる。

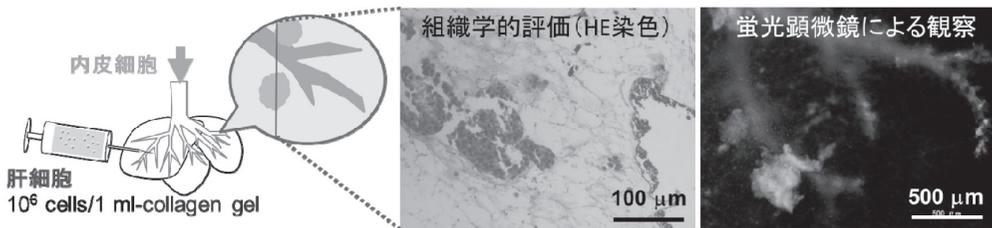


図8 肝初期構造体の構築

16 ラットの肝臓から採取したばかりの肝細胞。本研究室では雄性 Wistar rat 6-8 週齢より採取している。

17 通常、初代肝細胞は体外では増殖しないが、株化細胞は増殖する。今回用いた HepG2 細胞は肝機能も有し、増殖するので研究によく用いられる。初代肝細胞は蛍光を付与しにくいいため、この細胞を用いた。

### 3. まとめと今後の展望

以上のことから、1 mm 間隔で肝細胞が生存可能なこと、脱細胞化肝臓が 1 mm 以下の間隔で血管構造を有していること、脱細胞化肝臓の血管構造を足場として内皮化が可能だと期待されること、また脱細胞化肝臓に肝細胞を播種する際は周囲から細胞をゲルに懸濁して注入する方法が適していること、そして内皮化と肝細胞の播種を組み合わせることで肝初期構造体の構築が期待できることが示された。

これらの結果から、脱細胞化肝臓を足場とした肝臓の構築が期待される。今後の展望としては、血管網構築の際に内皮細胞以外の細胞も用いることや、肝細胞播種の際に細胞増殖を促進する因子をゲルに含ませることにより、より成熟した肝組織構築を目指す。一方で、肝初期構造体を用いて、肝不全ラットへの適応等による本研究の治療効果の実証等を行っている。

### 謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金：基盤研究(B) 22360348, 特別研究員奨励費(24・4676)により実施されました。本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました指導教官の井嶋博之教授に深く感謝いたします。また、日々共に研究を行ってきた研究室の各位に深く感謝します。

### 参考文献

- [1] R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920-926 (1993)
- [2] N. Shirakigwa and H. Ijima, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 568-570 (2013)
- [3] T. Sasagawa et al, *Biomaterials*, 31, 1646-1654, (2010)
- [4] N. Shirakigwa et al, *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 546-551, (2012)
- [5] N. Shirakigwa et al, *J. Biosci. Bioeng.*, in press, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.020.
- [6] H. Ijima, *Biochem. Eng. J.*, 48, 332-336 (2010)