

堺 裕輔 論文内容の要旨

主 論 文

Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered
hepatocyte/fibroblast sheets in mice

肝細胞／線維芽細胞複合シートによる血管誘導皮下性ヒト肝組織の構築

堺 裕輔、山之内孝彰、大橋一夫、小池真章子、鵜頭理恵、長谷川英子、
村岡いづみ、末松貴史、曾山明彦、日高匡章、高槻光寿、黒木 保、江口 晋

Biomaterials・65巻 66—75 2015年 (10ページ)

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
主任指導教員：江口 晋 教授

【緒言】

血管網を有する機能性臓器（肝臓）の構築は、再生医療における最終目標の1つである。これまでに、共培養や三次元培養による肝機能維持や立体組織化、良好な生着を目的とした血管網が豊富な場所（大網や腎皮膜下）への移植、脱細胞化スカффォールドを利用した再構築肝臓の移植等、多方面から研究されているものの、血管網を含む機能的な肝組織の構築には至っていない。

皮下は、グラフト除去や再移植が可能であることから安全かつ低侵襲であり、有望な移植場所として期待される。しかし、血管網が乏しく、グラフト不全が頻繁に起こる。この課題を打開するため、移植前に血管新生処理を施すことでマウス肝細胞シートの生着が実証された。ただし、これらの手法は、前処理や培養に長い期間を必要とするため、急性肝不全等の治療は制限される。

本研究では、移植前の血管新生処理や内皮細胞との共培養を必要としない簡便かつ迅速な皮下性血管誘導ヒト肝組織（Vascularized subcutaneous human liver tissue; VSLT）の構築技術を確立する。さらに、肝特異機能や微小構造の維持を実証する。

【方法】

(1) 肝細胞複合シートの作製・特徴解析

外科的に切除した肝組織の非腫瘍部から、二段階コラゲナーゼ灌流法によりヒト初代肝細胞を調製した。ヒト皮膚由来線維芽細胞（TIG-118細胞）を温度応答性培養皿（UpCell; 細胞シートを作製可能な市販の培養基材）にコンフルエントにした後、肝

細胞を播種した。培養 4 日目に肝細胞複合細胞シート (Engineered hepatocyte/fibroblast sheet; EHFS) を作製し、肝細胞と線維芽細胞の分布評価、微小構造解析等を組織学的に評価した。また、血管新生に関わる増殖因子の産生能を評価した。

(2) 肝細胞シート移植・皮下性肝組織の特徴解析

EHFS を免疫不全マウス (NOD SCID マウスおよび NOG マウス) の皮下に移植し、血管網の構築、細胞増殖、立体的な肝組織構築の有無、肝特異機能活性、微小構造等を組織学的に評価した。また、マウス血清中のヒトタンパク質 (ヒトアルブミン、ヒト $\alpha 1$ アンチトリプシン) 濃度を評価した。

【結果】

(1) *In vitro*における肝細胞複合シート (EHFS) の特徴

EHFS は、肝細胞のみ (Hepatocyte-only sheet; HS) と比較し、約 1.5 倍の厚みの細胞シートを形成した。下層の線維芽細胞 (ビメンチン陽性) は、培養 4 日目までに肝細胞 (アルブミン陽性) の上層に遊走し、二層の細胞組織体を構築した。また、肝に特徴的な毛細胆管構造を再構築した。

EHFS の血管新生に関わる増殖因子 (VEGF、TGF- β 1、HGF) の産生能は、HS と比較して有意に高値であった ($P < 0.01$, $n \geq 17$)。また、VEGF と TGF- β 1 に関しては、線維芽細胞のみと比較しても高値を示した。

(2) 皮下性血管誘導ヒト肝組織 (VSLT) の構築および特徴

EHFS は皮下で層状に凝集し、移植 7 日目には内皮細胞 (CD31 陽性) が観察され、14 日目までに移植組織内に血管新生した (Ki67 陽性内皮細胞)。肉眼でも毛細血管が観察され、14 日目には VSLT 全体が赤血球を含む赤色を呈した。

VSLT は $100 \sim 300 \mu\text{m}$ の厚みを有し、肝細胞周辺は線維芽細胞が存在した。肝細胞は、肝特異的機能 (グリコーゲン貯蔵、アルブミン合成、 $\alpha 1$ アンチトリプシン合成、血液凝固第 IX 因子合成) の維持と毛細胆管等の再構築を示した。移植 14 日目のマウス血清中ヒトアルブミン濃度は、HS 移植と比較して EHFS 移植で有意に高く (2712 ± 762 vs 100 ± 94 ng/mL; $P < 0.01$, $n \geq 10$)、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン濃度も同様であった (639 ± 265 vs 10 ± 15 ng/mL; $P < 0.01$, $n \geq 10$)。

【考察】

EHFS は、線維芽細胞の強い収縮によって迅速に剥離・シート化することができ、立体的な厚い層状組織を構築することで移植操作を容易にした。本来、皮下は移植組織の生着が困難であるという問題を抱えており、移植前の血管新生処理等を必要とするが、線維芽細胞を含む EHFS の高い血管新生因子産生によって良好な肝細胞生着と血管網構築を可能にし、肝特異機能と構造を維持したと考えられる。

移植した肝細胞は細胞増殖マーカーである Ki67 陰性であり、皮下で肝細胞が凝集して厚い VSLT を構築したと考えられる。血管構造を持たない肝組織体の生存限界は約 $40 \mu\text{m}$ であることが報告されており、VSLT は血管網を構築することによって約 8 倍もの厚い組織を形成することを可能にした。血管網は、移植 7 日目以降にヒト内皮細胞が散見され、調製肝細胞に含まれていたと考えられる。VSLT は肝特異機能発現を維持しているため、肝移植に代わる新しい肝再生医療ツールとして期待でき、将来的な遺伝性肝疾患などに対する治療応用の可能性を示した。