
再生医工学的アプローチによる肝臓関連機構を応用した
ハイブリッド型人工肝臓の研究

(12470233)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成 15 年 5 月

研究代表者 葛 西 真 一

(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

複雑な機能を有する肝臓の重篤な障害の究極的な治療法は肝移植である。しかしながら、脳死臓器移植が法的に可能になったにもかかわらず、期待した症例の増加はない。また、欧米においては提供臓器の不足が問題となっている。一方、近年の発生生物学あるいは分子生物学などの進歩発展はめざましく、臓器、組織の再生には stem cell が重要であることを明らかにした。また、再生医学の重要性が明らかになりつつある。本研究では、肝機能の体内、外補助の方法として、肝臓関連に基づく再生医工学的アプローチによる開発について検討した。

研 究 組 織

研究代表者：葛西 眞一（旭川医科大学医学部教授）

研究分担者：柿坂 明俊（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者：河野 透（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者：小野寺一彦（旭川医科大学医学部講師）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 12 年度	4,300	0	4,300
平成 13 年度	2,600	0	2,600
平成 14 年度	2,700	0	2,700
総 計	9,600	0	9,600

研究発表

(1) 学会誌等

1. 澤 雅之、他：人工肝臓開発の現況. 外科治療 82(2):189-194,2000.
2. 葛西眞一、他：肝細胞移植による肝不全の治療. 蛋白質・核酸・酵素 45(13):2301-2306,2000.
3. Kasai Shinichi, et al: Artificial liver support floating hepatocyte. 63(5):522-527,2001.
4. 小野寺一彦、他：肝細胞移植と肝の再生医学. 日本アフエレーシス学会雑誌 21(2),127-131,2002.
5. 中澤文朗、他：臨床応用のための凍結保存ヒト肝細胞. 医学のあゆみ 201(11):827-831,2002.
6. Arikura Jun, et al: UW solution: a promising tool for cryopreservation of primarily isolated rat hepatocytes. J.Hepatobiliary Pancreat Surg 9:742-749,2002.

(2) 口頭発表

1. Sawa Masayuki: Efficacy of encapsulated allogeneic hepatocyte transplantation for the treatment of acute hepatic failure rats after 90% hepatectomy. 第 17 回国際消化器外科学会、2000 年 9 月 6 日、ハンブルグ
2. 葛西眞一：肝臓および肝細胞移植と肝再生. 第 30 回日本創傷治癒研究会、2000 年 12 月 8 日、東京
3. 葛西眞一：肝臓の機能補助をめざして. 第 28 回日本集中治療学会、2001 年 3 月 8 日、東京

4. 葛西眞一：肝細胞移植は有効かー現況と問題点ー。第9回細胞療法研究会、2001年4月20日、松本

5. Arikura Jun: UW solution is a promising tool for cryopreservation of primarily isolated hepatocytes. 第5回国際肝胆膵学会、2002年4月25日、東京

6. 岩元 純:分離膵ランゲルハンス島におけるNO産生のバイオイメージング。第2回日本NO学会、2002年5月24日、東京

7. 小野寺一彦：旺盛な増殖力を持つ肝細胞源の悪性化ポテンシャルの検討。第13回日本消化器癌発生学会、2002年9月5日、大阪

(3) 出版物

1. 葛西眞一：低温環境利用ハンドブックー肝細胞保存。森北出版株式会社、森北肇、2001年、総頁510p

研 究 成 果

<研究目的>

生体の物質代謝の中樞である肝臓は、極めて複雑多岐にわたる機能を有しているため、ひとたび重篤な機能不全に至ればその予後は今日なお不良であり、現在臨床的には血液透析濾過、吸着剤血液灌流、血漿交換などが行われているが、劇症肝不全の救命率はなお 20~30%である。肝臓の本来持っている再生能力を期待しうる急性肝不全には人工肝臓が、そうでない慢性肝不全には肝移植が唯一の治療手段である。後者の肝移植の最大の問題点はドナー不足であり、ドナー肝が入手出来るまでに約 30%の患者が間に合わないという。本邦では生体肝部分移植がやむを得ず行われているが、この waiting 時のサポートにも人工肝臓が必要とされる。我々はこれまで、遊離肝細胞を代謝のリアクターとしたハイブリッド型人工肝の基礎的研究を進め、肝不全動物の延命に成功したものの救命には至っておらず、臨床応用にむけてさらなる研究を継続している。

生体における肝臓の主な機能は物質代謝と解毒機能であり、この両者の機能は肝細胞内の膨大な酵素系により営まれている。ハイブリッド型人工肝臓は、代謝のリアクターとしてこの遊離された肝細胞をモジュール化する事になっているが、その機能を十分に長期間維持させる方法の開発が最重要課題である。一方生体においては、肝臓と膵臓が相互の臓器相関機構をたくみに活用して肝臓のエネルギー代謝を維持し、ホメオスターシスを維持していることが知られている。

そこで本研究では、この生体における肝膵相関機構を再生医工学的アプローチにより生体外で再現し、ハイブリッド型人工肝システムに組み込み、肝機能

を高度かつ長期間維持させる方法の開発を目的とする。

近年、再生医学の研究が進められているが、これには従来からの再生医工学的応用が極めて重要である。肝機能の再生を、tissue engineering の観点からみると、代謝機能を担う細胞、この細胞が分裂増殖するために必要な足場である基質、そして、細胞間のあるいは細胞内のシグナル伝達機構として重要なサイトカインの3つの要素の有機的再現がその根本である（論文別刷参考）。肝の代謝機能を担う細胞の供給源を、ヒトの生体肝に依存することは、肝移植におけるドナー不足と同一の問題を抱えることになり、新たな細胞源を検討する必要があり、採取や保存といった問題の解決も必要とされる。

また、細胞がその機能を最大限に、かつ良好な状態で長期間発現する為には、その環境の構築が極めて重要である。

さらにサイトカインとしては、各種の成長因子が必要であることが知られている。

本研究では、これらの点についても検討を進めた。

ハイブリッド型人工肝臓の開発は、21世紀の医療に期待される主な人工臓器のひとつであるが、複雑な機能を代行させる為とその開発は簡単ではない。そこで、生体のホメオスターシス機構のひとつである肝臓関連機構を再生医工学的アプローチにより人工肝臓に応用するという、本研究は極めて独創的であり、他に類をみず学術的にも大変興味を持たれるところである。

<研究方法と成績>

1. ラット胎児肝・膵混合脾内移植実験

成体の肝・膵組織は通常分裂・増殖する能力を示さないので、再生活性の強い胎児組織に着目した。妊娠 18 日目の胎児ラットを開腹し、肝臓および膵臓の組織をピンセットで機能的に破碎してコラゲナーゼやディスパーゼなどの消化酵素液を加えながら混合し、培養液で洗浄した後、両細胞・組織をミンスした状態で、成体ラットの脾臓内に移植し、経過を組織学的に観察した。

移植 1 週間後には、肝細胞と膵外分泌組織がそれぞれ集塊をなして生着している像が観察されたが、ラ氏島を確認することは出来なかった (図-1, 2)。

一方、移植した 6 ヶ月後の脾臓を検索したところ、肝細胞とラ氏島が混合して生着している像が観察された。ところが膵外分泌組織は認められなかった (図-3: HE 染色標本、図-4: インスリン染色、ラ氏島が茶褐色に染まっている。肝細胞もクラスターを形成している)。

肝・膵細胞あるいは組織の混合培養により、両者の活性が高まったことを示すものと思われ、肝・膵関連機構の再現を期待させるものであり、再生医工学的アプローチによるハイブリッド人工肝臓のような、体外型代謝器への応用について、今後更に検討を続けたい。

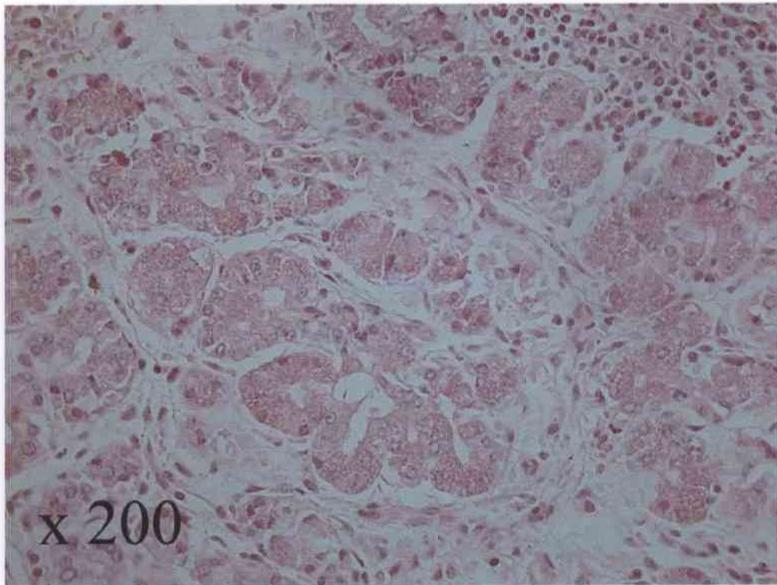
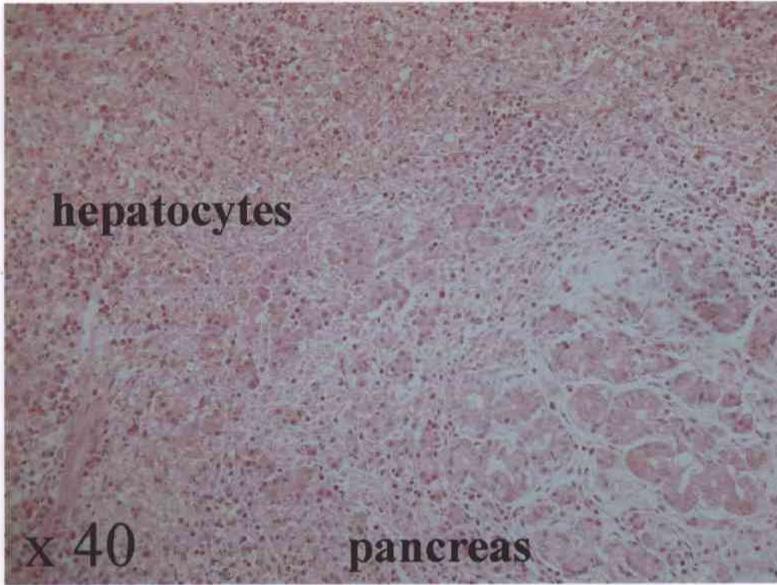


図-1. ラット胎児肝・膵混合移植

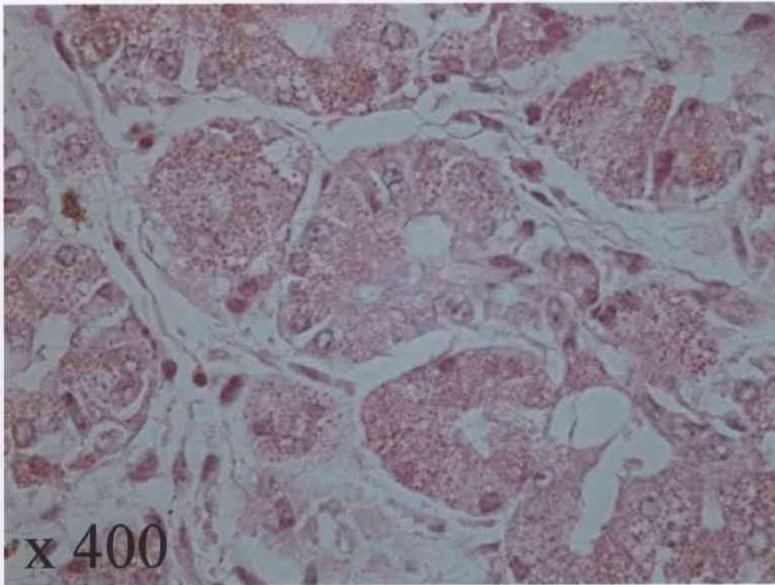
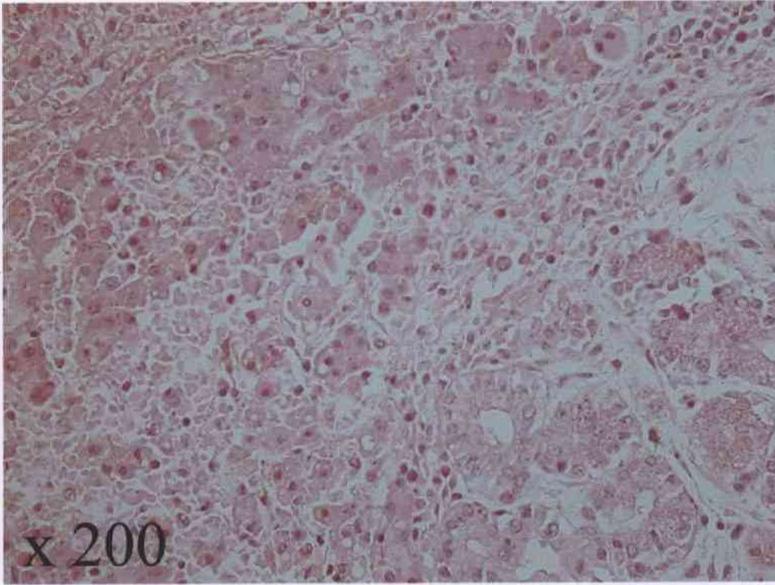


図-2. ラット胎児肝・脾混合移植

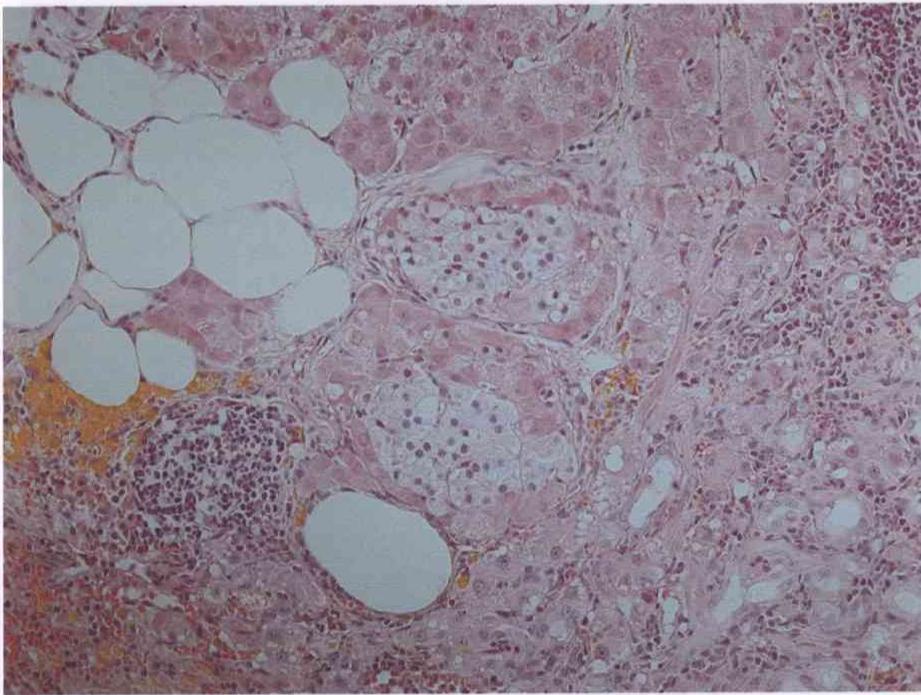
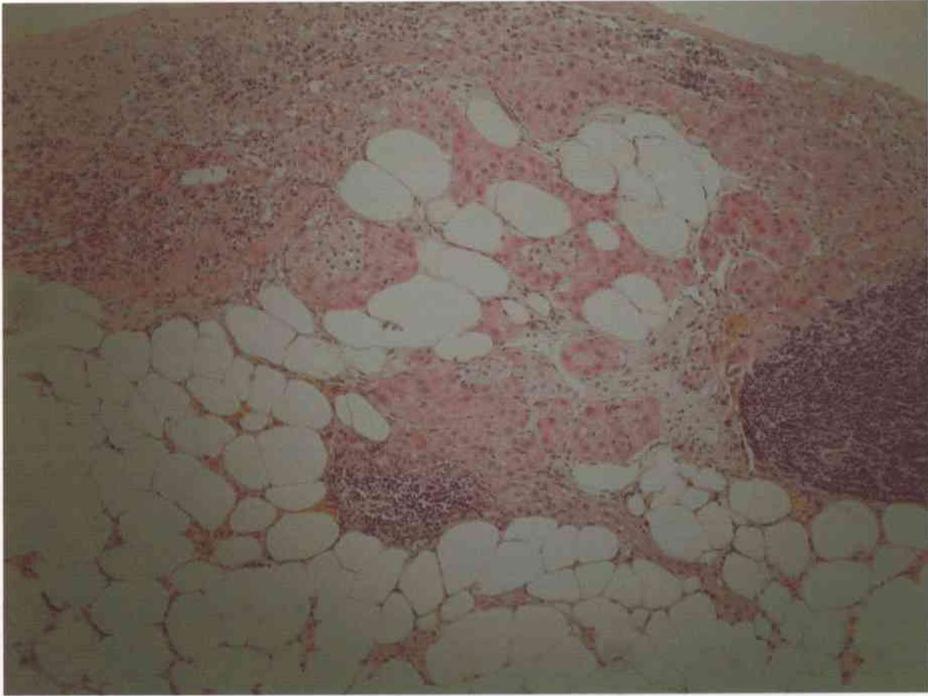


图-3. HE 染色标本

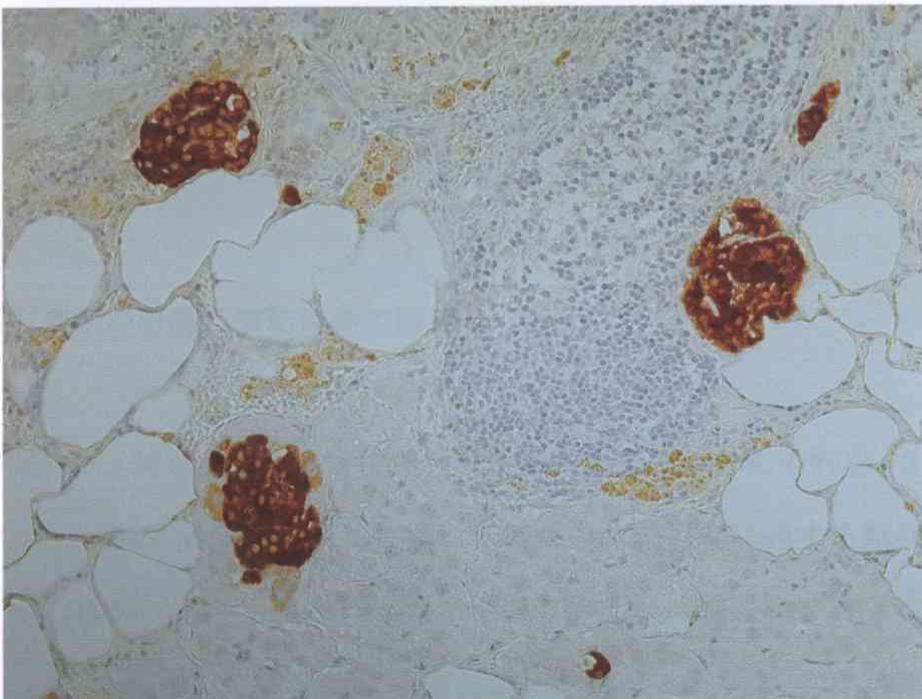


図-4. インスリン染色

2. 肝細胞の凍結保存法の改善

肝細胞の凍結保存法としては、凍害防止剤として DMSO を用い、プログラミングフリーザーを用いて 4°C/分の冷却速度で凍結し、液体窒素槽に保存する方法により、長期保存が可能であることを報告してきた。今回は、凍害保護剤に、UW 液（ヒト肝臓の低温保存時に使用される肝保存液）の有用性について検討した。

ラット肝細胞はコラゲナーゼ酵素灌流法により分離して得た。凍害保護液は 12%DMSO、10%FBS を含む UW 液である。また凍結保存後に得られた細胞にレンチウイルスをベクターとして LacZ を導入可能か否かを検討した。更に、凍結保存細胞をガラクトサミン肝不全ラットに移植して、救命率の向上が認められた（文献参照）。

3. ヒト肝細胞の分離と凍結保存の研究

ヒト肝細胞は、何らかの理由で使用されなかった脳死体からの肝を、3 ステップコラゲナーゼ酵素消化法により分離して得た。凍結保存に適する細胞は、若年者ドナー、80%以上のバイアビリティーを有する肝細胞、脂肪肝でない細胞である。

凍結保存には 12%DMSO を含有する UW 液を用いた。プログラミングフリーザーで 4°C/分の冷却速度で凍結した。

解凍後のバイアビリティーは約 50%を示した（本研究はピッツバーグ大学 Dr. Strom との共同研究によった）（文献参照）。

4. 細胞源の研究—骨髄細胞由来肝細胞の確立

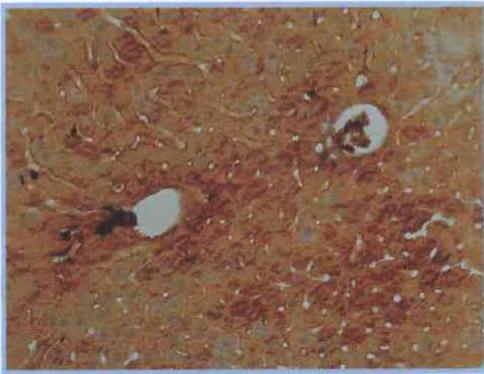
ドナー肝あるいは肝細胞のソースとして、脳死体から供給されることは、もはや限界がある。そこで近年の発生生物学あるいは分子生物学などの学問の発展を背景に、幹細胞の存在がクローズアップされてきた。Petersen らは肝障害を与えたマウス宿主肝内に移植した骨髄細胞が肝細胞へ分化することを報告した。そこでわれわれも、新しい観点から骨髄細胞が肝細胞へ分化しうるか否かを検討した。

方法は、先天性にアルブミンを合成できない Nagase 無アルブミンラットに、アルブミンを合成できる同系ラットの骨髄を移植し、アルブミン産生細胞を同定するものである。

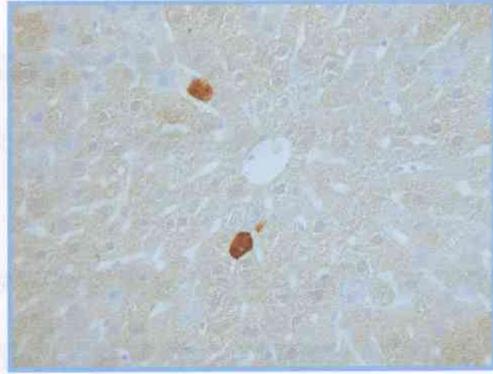
エーテル麻酔下にラットの両大腿骨より骨髄細胞を採取し、非連続密度勾配法により単核球分画の細胞浮遊液を作成して移植に用いた。

図-A の左は、アルブミン産生ラットの肝組織標本のアルブミン染色像で、右は無アルブミンラットの肝組織標本である。無アルブミンラットの肝臓にはアルブミン産生細胞は、極めて稀にしか存在しない事がわかる。

図-A. アルブミン染色



正常ラット (F344)



無アルブミンラット (F344alb)

図-B は、各グループにおける肝臓のアルブミン染色標本である。下段にみられるように、肝切という再生刺激を与えて骨髄細胞を移植したところ、アルブミン染色陽性の肝細胞集団が観察された。骨髄細胞が肝細胞に分化したことを示唆する。

図-B. アルブミン染色

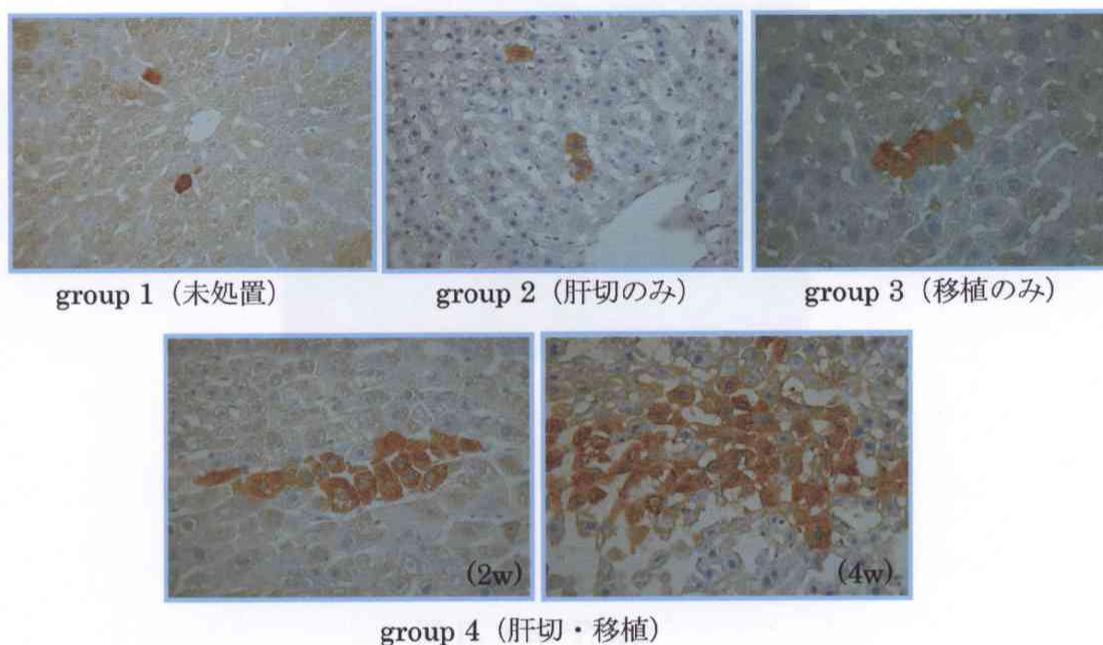


図-C は、メスの無アルブミンラットにオスの骨髄細胞を移植して、メスの肝内に、アルブミン陽性細胞内にオスの Y 染色体が認められた所見を示す。

図-D には、肝細胞に分化したアルブミン産生細胞が腫瘍性でないことを、GST-P 染色で確認した。

図-E には、アルブミン陽性細胞クラスターを採取し DNA を抽出して PCR 法によりアルブミン遺伝子の存在を示す（肝切・移植群の点線部分が分化した肝細胞により作製されたアルブミン）。

図-C. 雌無アルブミンラット肝内での Y 染色体の存在

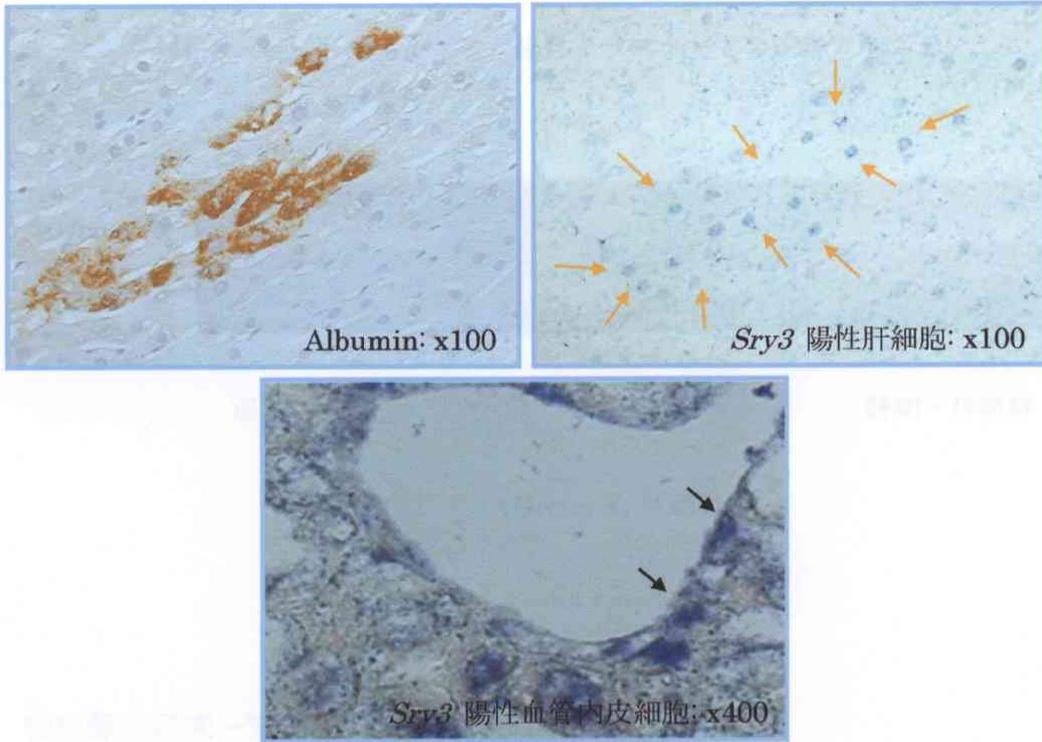
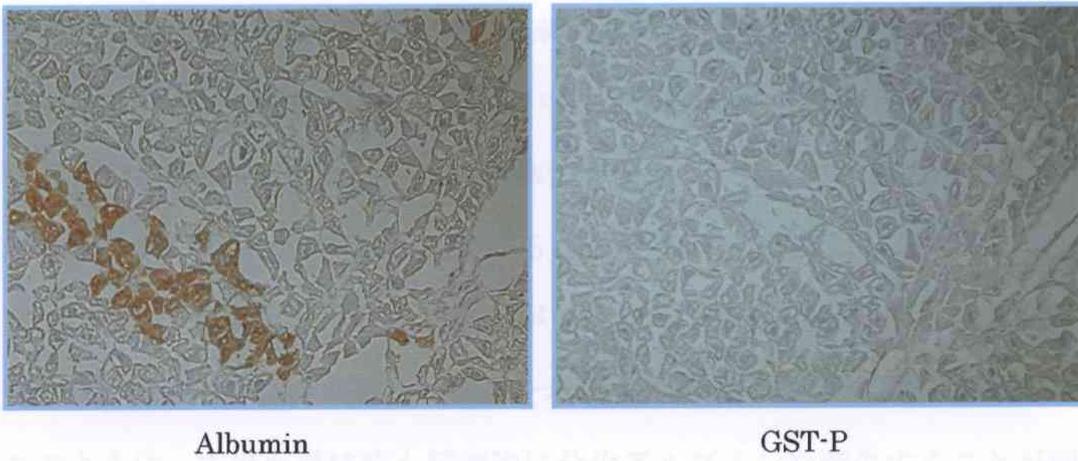
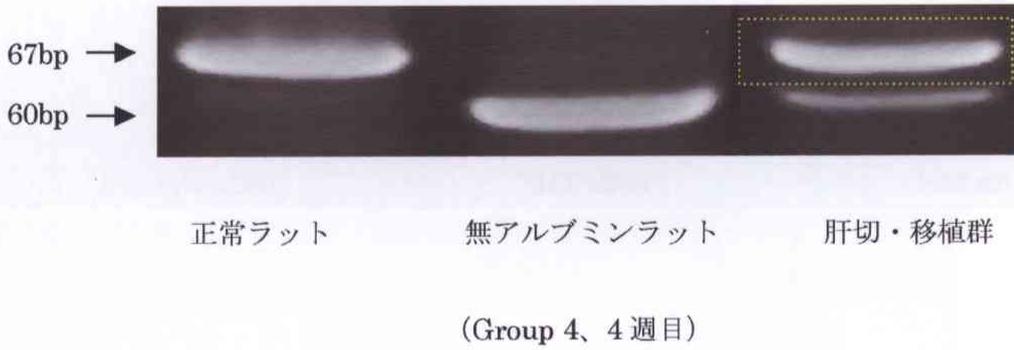


図-D. GST-P 染色



(Group 4、移植 4 週目)

図-E. 宿主肝内アルブミン陽性クラスターでの正常アルブミン遺伝子の存在



5. 細胞源の研究—末梢血由来肝細胞の確立

前述の骨髄細胞と同様な stem cell が末梢血中にも存在するか否かを検討した。ドナーラットには5日間 G-CSF を投与し、終了後全血を採取し密度勾配法で単核球分画を採取した。70%肝切後門脈より 200 万個注入した。

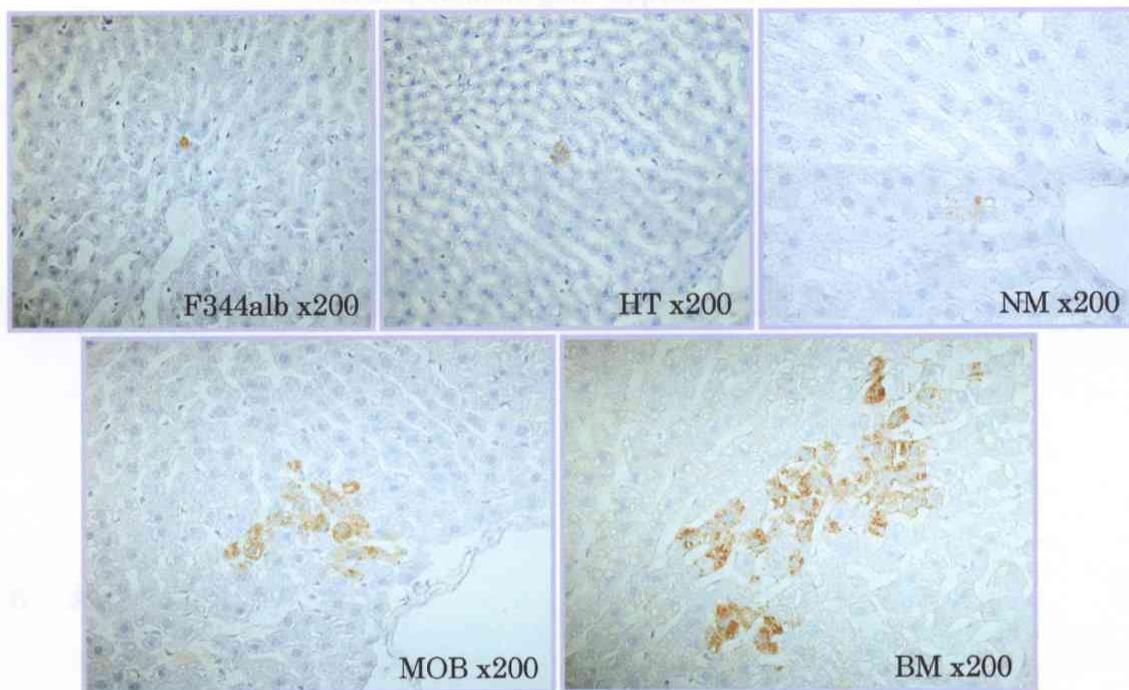
図-F の下段左側が、末梢血単核球由来アルブミン産生細胞であり、右側は骨髄由来のアルブミン産生細胞である。いずれも肝細胞の形態を示している。

図-G には、オスの末梢血由来 Y 染色体が赤印のようにメスの肝内で染色され、同一の細胞がアルブミンを産生していることを示す (下右)。

図-H には、末梢血単核球由来細胞がアルブミンを産生していることを示す (MOB)。BM は骨髄由来細胞の場合を示している。

このように、末梢血単核球も肝細胞に分化アルブミンを産生することが判明した。

☒-F. Results-1 immunostaining



☒-G. Donor origin alb+ cells proved by 1. In situ hybridization

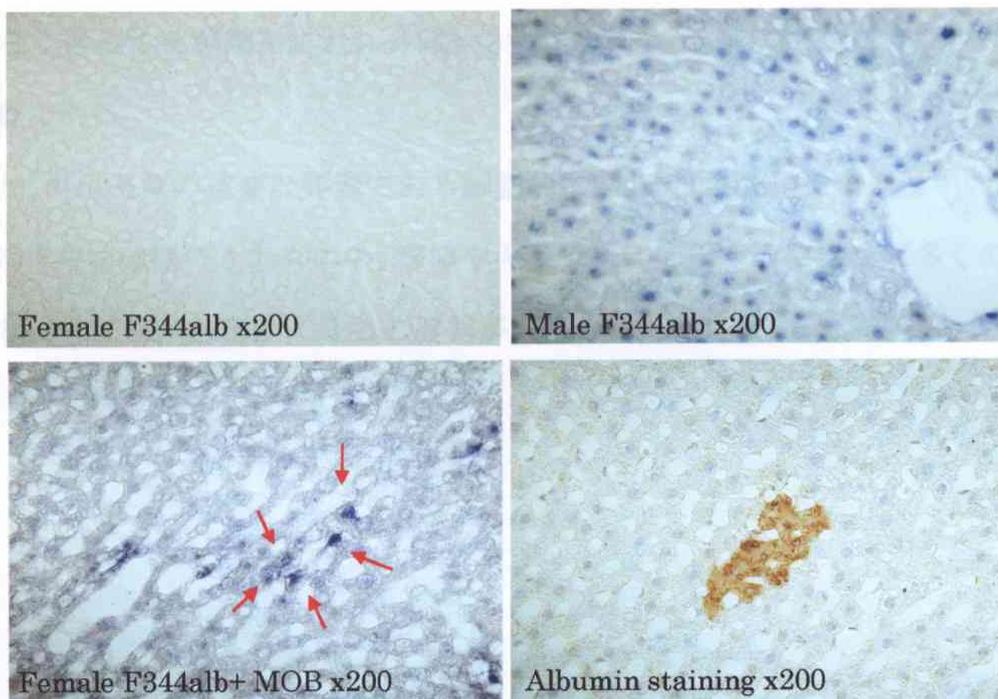


図-H. Donor origin cells proved by PCR:
Normal albumin gene appeared in alb+ cluster



6. おわりに

肝と脾は、再生医工学的にも、お互いに相関関係を保つことにより、良好な機能を長期間発現し、三次元構造を構築する可能性が見出された。

この事実は、生体内、外における肝機能の再生、補助法の新たなストラテジーになり得ることが期待され、今後いかなるモジュールに組み立てていけるかが問題である。

また、再生医療の重要な要素である細胞源に関しては、骨髄や末梢血中の stem cell の存在を確認できたものの、移植や人工臓器に応用するにはまだ多くの解決されるべき問題があるが、今後の展開が楽しみである。