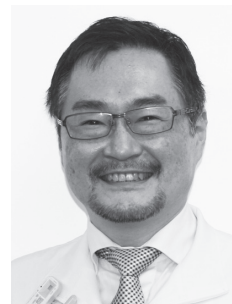


肝臓の再生医療 ～細胞移植から移植可能な人工臓器の作製へ

京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科

石井 隆道, 福光 剣, 小木曾 聡

Takamichi ISHII, Ken FUKUMITSU, Satoshi OGISO



1. はじめに

1963年に世界で初めてコロラド大学で肝臓移植が行われて以来、肝移植医療が盛んに行われ始めた。その後の移植技術の進歩や免疫抑制剤の開発などによって、肝移植医療は飛躍的に普及してきた。今ではその有効性と安全性とはある程度確立され、一般的な医療になりつつある。しかしながら、2010年の改正臓器移植法施行や臓器提供意思表示カードの配布など、移植医療のより広範な普及に向けて積極的な取り組みがなされているものの、いまだにドナー不足のため必要な患者全てに移植を行うことができていない。ドナー不足を解消する試みとして、1966年にはチンパンジーの肝臓を用いた異種間肝移植が行われたがレシピエントの生存期間は非常に短かった。その後、1984年に分割肝移植が、1988年に生体部分肝移植が報告されており、1990年には初の生体部分肝移植成功例が報告されている¹⁾。生体肝移植ではドナー不足の問題はある程度解決できるが、健康なドナーに対して手術を行うことに倫理的な問題点が残る。臓器移植医療におけるドナー問題を解消するため、ドナーによる臓器提供に依存しない再生医療の発展が期待されている。

2. 肝臓の再生医療

臓器機能を発現・維持させるためには、臓器機能を担う特有の細胞群や、細胞が生存する足場となる生体材料、細胞の組織形成を促す適切な微少環境などが必要である²⁾。肝機能はおもに肝細胞で担われているが、成体肝細胞や胎

児肝細胞の他にES (embryonic stem) 細胞やiPS (induced pluripotent stem) 細胞などの多能性幹細胞が肝臓の再生医療における細胞源として研究されてきた。足場としての生体材料としては、足場構成因子であるタンパク質としてのコラーゲンやラミニンなどの研究が進んでいる。臓器特異的な細胞外基質は細胞接着に必要なだけでなく、未熟な肝細胞を成熟化させたり肝細胞機能を維持させたりすることに有用である。しかし、細胞集団が立体的構造をとる空間を提供するための足場をゼロから*in vitro*で再現することは難しく、肝臓を立体構造として再構築すること、すなわち人工肝臓を作製することは困難であった³⁾。一方でES細胞やiPS細胞の持つ可能性に注目され、これら多能性幹細胞を用いた細胞移植に関する研究が盛んとなった。

3. 肝細胞移植

肝細胞移植とは、肝機能を担う肝細胞を移植することによって肝不全を補う治療である。肝細胞移植は肝移植に比較して極めて侵襲が少ない治療であり、繰り返し施行可能な治療である。1992年に初めて肝細胞移植を臨床応用した報告がなされ⁴⁾、おもに先天性代謝障害に対して臨床的に肝細胞移植が行われてきた。しかしながら、一時的な肝機能の改善はみられるものの永続的な肝機能回復は得られず、今のところ肝細胞移植は肝移植への橋渡しとしての意味づけしか与えられていない⁵⁾。肝細胞移植治療においては、克服すべき課題が多く残っている。

我々の研究室でもこれまでにトランスジェニックマウスを用いて致死的急性肝不全状態を人為的に惹起し、マウス成体肝細胞や胎仔肝細胞 (図1A, B)、あるいはマウスES細胞由来内胚葉細胞 (図1C, D) を細胞移植する実験を行ってきた^{6)~8)}。それぞれの細胞種は、脾臓に注射することにより脾静脈経由で門脈から肝臓に移行し、微小な塞栓を

■ 著者連絡先

京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科

(〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54)

E-mail. taishii@kuhp.kyoto-u.ac.jp

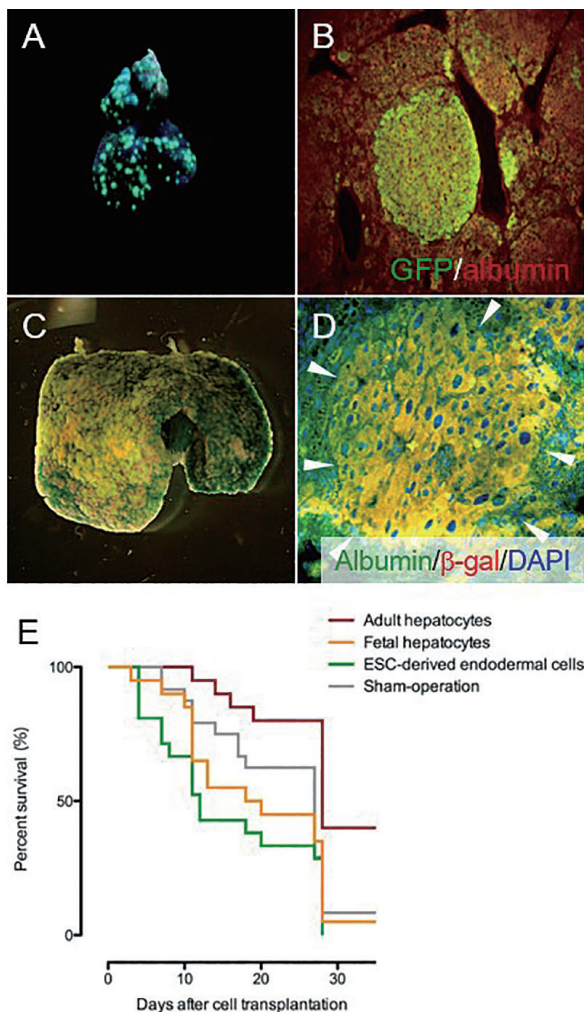


図1 肝細胞移植の成績

(A, B) マウス胎仔肝細胞を細胞移植した急性肝不全モデルマウスの肝臓。移植細胞はGFPで緑色にマーキングされている。(A) マクロ像、(B) ミクロ像。移植された細胞はGFP陽性かつアルブミン陽性となっている。(C, D) マウスES細胞由来内胚葉細胞を細胞移植した急性肝不全モデルマウスの肝臓。移植細胞はβ-galで青色にマーキングされている。(C) マクロ像、(D) ミクロ像。移植された細胞はβ-gal陽性かつアルブミン陽性となっている。(E) 移植細胞の分化度による生存率の比較。
DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; GFP, green fluorescent protein.

形成することで肝臓に細胞が生着し増殖していく。この細胞移植により、急性肝不全モデルにおいて移植群で有意差を持って生存率が改善されることを示した。さらに、移植細胞の分化成熟度によって、細胞移植による生存率に差があることも示した。すなわち、肝細胞機能を十分に有する成体肝細胞が最も治療効果が高く、未熟な胎仔肝細胞やES細胞由来内胚葉細胞と比較して有意に生存率が高かった(図1E)⁹⁾。慢性肝不全を含めた全ての肝不全状態において前記結果が当てはまるかは分からないが、少なくとも本研究で使用した急性肝不全モデルでは、「即戦力」となる成体肝細胞が移植細胞源として最適であった。この結果は、ES細胞やiPS細胞を用いた肝細胞移植では、未分化な状態

での細胞移植では治療効果が少なく、細胞移植前に十分に肝細胞機能を有する状態にまで分化誘導を行う必要があることを示唆している。

さらに我々の研究室では、移植肝細胞の挙動を詳細に観察するために、マウスよりやや大きなラットを用いた細胞移植実験を行った¹⁰⁾。致死的急性肝不全モデルである90%肝切除ラットに対して、腸管膜経由でラット成体肝細胞を移植した。90%肝切除ラットにおける7日後生存率は肝細胞移植群で69.2%、非移植群で7.7%と有意に移植群で改善した。しかし、移植細胞数は移植16時間後には約1%に減少しており、移植細胞がレシピエントの腸間膜内で機能していることで生存率改善に寄与しているわけではなかった。移植細胞の長期的な生着が認められていないにもかかわらず、移植群で生存率が改善する理由は解明できていない。しかしながらこれまでの我々の研究では、単純な細胞移植ではレシピエントへの長期生着は困難であることが示唆された。

4. 脱細胞化技術を用いた人工肝臓

全ての小腸と右側結腸、および脾臓からの静脈血流が門脈を経由して肝臓に流入する。末期肝不全においては肝臓の線維化による肝硬変を生じる。臓器抵抗が増加することによって門脈圧が亢進し、その結果、腸管うっ血や脾腫、側副血行路の発達を認めるようになり、臨床症状としては腹水貯留や汎血球減少、食道静脈瘤などの破裂、肝性脳症、栄養障害などをきたす。これらは肝細胞機能のみを補う肝細胞移植では解決できない問題であり、肝細胞移植と比較した時に肝移植の大きな利点となる。臓器移植を目指した肝臓の再生医療を考えた場合、肝臓のような複雑な立体構造を有する実質臓器を再構築することは非常に困難であった³⁾。この課題を解決するために、生体の臓器より細胞外基質のみを鋳型として取り出す脱細胞化技術が試みられている^{11),12)}。脱細胞化技術は、既に臓器の形態を保持している立体的細胞外基質を足場として、目的の細胞を再細胞化して臓器を再構築することを目指す。一旦凍結した後に融解することで物理的に細胞膜を破壊し、トリプシンなどの酵素反応により細胞を溶解し、さらに酸や界面活性剤による化学的な処理を組み合わせることで脱細胞化が行われる。最終段階として、門脈から界面活性剤を灌流させると徐々に肝臓を構成する細胞の細胞壁が破壊され、それらの破壊組織片が下大静脈から排出される。数時間から数日かけて細胞成分が溶出し、白く軟らかい細胞外基質のみが残存する(図2A)。門脈や胆管から色素を注入することにより、肝臓組織内の脈管構造が維持されていることが示され

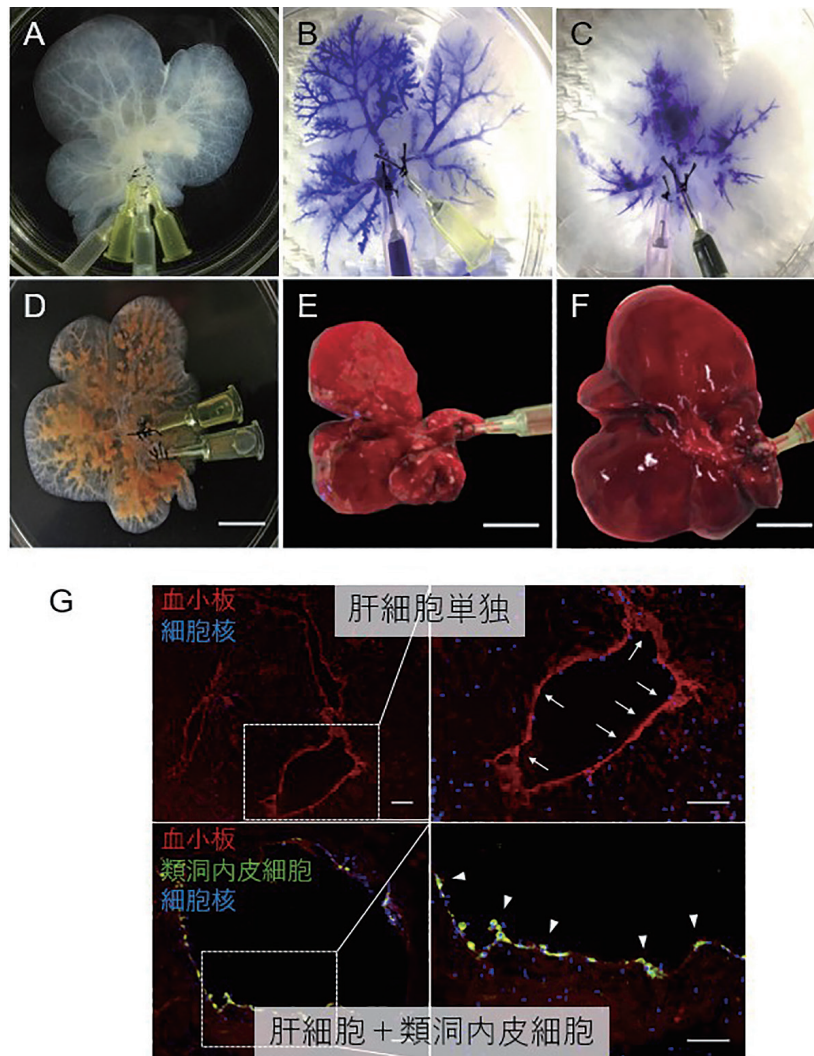


図2 脱細胞化技術を用いた体外循環可能な人工肝臓

(A) 脱細胞化された肝臓。(B) 門脈内に青色色素を注入した図。(C) 胆管内に青色色素を注入した図。(D) 脱細胞化肝臓にラット肝細胞を経胆管的に再細胞化。(E) 脱細胞化された肝臓に肝細胞のみを再細胞化し、血液循環を行った。血栓形成のため十分な血流灌流ができていない。(F) 脱細胞化された肝臓に肝細胞を経胆管的に、類洞内皮細胞を経門脈的に再細胞化し、血液循環を行った。肝臓に血流が十分行きたっている。(G) 肝細胞単独の再細胞化では血管内腔に血小板が凝集しているが、類洞内皮細胞とともに再細胞化すると血管内腔を類洞内皮細胞が被覆し血小板凝集を抑制している。

る(図2B, C)。さらに、これらの細胞外基質には各種の成長因子も保持されていることが報告されている。

脱細胞化された肝臓の細胞外基質を人工肝臓に利用する次のステップは、この細胞外基質を鋳型として、外部から細胞を新たに生着させ再細胞化させることである。肝臓を構成する細胞種は、肝細胞や胆管細胞、血管内皮細胞など多種にわたる。これらの細胞種を肝臓の中に適切な立体構造を構成するように注入し、再分布させる方法が重要になる。主要な役割を担っているのは肝細胞であるが、我々は肝細胞の投与について、その投与経路などいくつかの条件を最適化することを試みてきた。門脈から投与する報告が多いが、胆管経由で投与することによって肝実質腔に均等

に肝細胞を再分布させ、再細胞化した肝臓の機能や構造を向上させることを示した(図2D)¹³⁾。一方で、多彩な肝臓の機能を幅広く再現するためには、肝細胞の生着だけでなく臓器全体の血流を維持することや胆汁排泄の仕組みを再現することも必要である。最終的に臓器として移植することを念頭に置くと、特に血管系の構築は重要である。細胞外基質へ直接血液を灌流させると、血小板は直ちに血栓を形成する。血栓形成を防ぎ末端の肝臓組織まで血流を維持させるためには、血管内皮細胞による血管内腔の再細胞化は重要である。我々は血管内皮細胞および類洞内皮細胞を用いて、脱細胞化肝臓の血管内腔を経門脈的に再細胞化させた。これにより、少なくとも8時間は血栓形成を認めず

に再細胞化肝臓の体外循環が可能となった(図2E~G)¹⁴⁾。将来、生体への移植という臨床応用を見据えた場合に、血管内皮細胞をはじめとした血管構造を適切に再構築することは重要と思われる。

脱細胞化肝臓を人工肝臓として利用する利点は次の3点である。①細胞外基質を構成するタンパク質の組成が本来生体において存在していたものであるため、再細胞化するためにはこの細胞外基質は細胞接着や細胞機能維持に最適であると考えられる。また、成長因子が保持されていることも利点であろう。②脱細胞化肝臓に再細胞化を行うことにより、生体内での立体的構造をそのまま人工肝臓として利用できる。もともと生体内で構築された構造であるため、ミクロの観点でも人工肝臓として理想的な立体構造をとっていると思われる。またマクロの観点でも、移植を想定した場合にレシピエントと吻合するための脈管構造が維持されていることは大きな利点である。③細胞外基質そのものは免疫原性に乏しく、脱細胞化技術を用いた人工臓器を移植しても細胞外基質は拒絶の対象となりにくい。

5. 移植可能な人工肝臓を目指して

理想的な将来像としては、以下のようなモデルが考えられる。すなわち、細胞外基質は免疫原性が少ないため、異種動物由来(xenograft)や同種他個体由来(allograft)の脱細胞化肝臓を利用する。細胞源としては、自己由来 autograft)のiPS細胞を肝細胞や胆管細胞、血管内皮細胞などへ分化させた細胞を利用し、前記の脱細胞化肝臓へ再細胞化を行うことにより、免疫拒絶反応を惹起しにくい自己由来の細胞成分を持つ人工肝臓を作製できると考えている。iPS細胞は無限に増殖し凍結保存も可能であるため、必要に応じて人工肝臓を作製できることが期待される。我々もヒトiPS細胞由来内胚葉細胞をラット脱細胞化肝臓へ再細胞化し、不十分ながらも肝機能を発現しえたことを報告した¹⁵⁾。

克服すべき問題点としては、iPS細胞から肝細胞や胆管細胞などへの高い分化誘導効率を持ちつつ大量の細胞を培養できる培養技術や、各細胞種を脱細胞化肝臓内へ適切に再分布させる再細胞化技術、血栓形成予防のための血管内腔の処理方法(血管内皮細胞の再細胞化の他に抗血小板抗体や抗血栓性コーティングなど)の開発などが挙げられる。多くの課題は残るものの、脱細胞化技術を用いた人工肝臓は肝移植におけるドナー不足を解消する有望な手段になると考えている。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Starzl TE, Murase N, Marcos A, et al: History of liver and multivisceral transplantation. Transplantation of the liver, ed by Busuttil RW, Klintmalm GK. Elsevier-Saunders, Philadelphia, 2005, 3-22
- 2) Vacanti JP, Langer R: Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Lancet **354** Suppl 1: SI32-S4, 1999
- 3) 福光 剣: ドナー不足解消に向けた移植可能な臓器作製. BIO Clinica **35**: 68-71, 2020
- 4) Mito M, Kusano M, Kawaura Y: Hepatocyte transplantation in man. Transplant Proc **24**: 3052-3, 1992
- 5) Dixit V: Hepatocyte transplantation in liver disease. Transplantation of the liver, ed by Busuttil RW, Klintmalm GK. Elsevier-Saunders, Philadelphia, 2005, 1379-86
- 6) Machimoto T, Yasuchika K, Komori J, et al: Improvement of the survival rate by fetal liver cell transplantation in a mice lethal liver failure model. Transplantation **84**: 1233-9, 2007
- 7) Ishii T, Yasuchika K, Machimoto T, et al: Transplantation of embryonic stem cell-derived endodermal cells into mice with induced lethal liver damage. Stem Cells **25**: 3252-60, 2007
- 8) Ishii T, Yasuchika K, Fujii H, et al: In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. Exp Cell Res **309**: 68-77, 2005
- 9) Kamimura R, Ishii T, Sasaki N, et al: Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage. Cell Transplant **21**: 2351-62, 2012
- 10) Kita S, Yasuchika K, Ishii T, et al: The Protective Effect of Transplanting Liver Cells Into the Mesentery on the Rescue of Acute Liver Failure After Massive Hepatectomy. Cell Transplant **25**: 1547-59, 2016
- 11) Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, et al: Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. Nat Med **16**: 814-20, 2010
- 12) Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, et al: A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. Tissue Eng Part C Methods **17**: 677-86, 2011
- 13) Ogiso S, Yasuchika K, Fukumitsu K, et al: Efficient recellularization of decellularized whole-liver grafts using biliary tree and foetal hepatocytes. Sci Rep **6**: 35887, 2016
- 14) Kojima H, Yasuchika K, Fukumitsu K, et al: Establishment of practical recellularized liver graft for blood perfusion using primary rat hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells. Am J Transplant **18**: 1351-9, 2018
- 15) Minami T, Ishii T, Yasuchika K, et al: Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold. Regen Ther **10**: 127-33, 2019