

## 人工肝臓(脱細胞化骨格技術)

慶應義塾大学医学部外科学(一般・消化器)

八木 洋

Hiroshi YAGI



### 1. はじめに

肝臓機能を補助するためのいわゆる人工肝臓技術は、大きく2つに分けられると考える。1つが透析装置に近い体外還流型であり、もう1つが体内埋め込み型である。体外還流型の補助人工肝臓装置は海外を中心に臨床試験が行われ、一定の効果が示されているが<sup>1)</sup>、体内埋め込み型の臨床応用への実現はまだ達成されていない。体内埋め込み型の人工肝臓を達成し得る技術として着目されているのが再生医療技術であり、中でも一定の細胞数による臓器機能の発現が期待できると考えられているのが、オルガノイド技術<sup>2)</sup>、キメラ動物からの臓器創出技術<sup>3)</sup>、そして本稿で述べる脱細胞化骨格技術<sup>4)</sup>である。ただし、それぞれが臨床応用に向けて様々な問題点を抱えており、技術開発の途上にあるのが現状である。例えばオルガノイドは、一つひとつは小さいため、臨床的に有効な機能を発現させるためには、積層化や重層化が必要であるが、体内で一定数の機能的肝細胞を維持するために工夫が必要である。キメラ動物については、小動物では均一なヒト化臓器の創出が達成されているが、ヒトに応用可能な大動物では安定した創出のために乗り越えるべきハードルがあると考えられる。脱細胞化技術についても、臨床応用に向けて解決しなければならない問題点があり、例えば、適切な細胞ソースの確保、移植箇所や方法の選択が挙げられる。

本稿では、人工臓器技術の中でも、この数年で複数の臓器で大動物移植実験の成功が報告され<sup>5),6)</sup>、生体材料としても注目されているこの脱細胞化技術による人工肝臓の動

向に絞って、最近の技術開発の現状と展望について述べる。

### 2. 脱細胞化臓器骨格を用いた研究開発の背景

肝不全に対する現在唯一の根治的治療法は肝臓移植であるが、ドナー不足や免疫抑制薬の永続的使用および移植手術自体が持つ高いリスクは依然として大きな問題である。ヒトiPS細胞(人工多能性幹細胞)を用いた再生医療技術は、これらの問題を一気に解決できる可能性を秘めた画期的な技術といえる。しかしながら、ヒトiPS細胞を肝再生医療に応用するためには、他の部位とは異なる実質臓器特有のスケールと複雑な機能を補うために体内に大量の細胞を生着させ、安定した機能を発現させる新しい技術開発が求められる。実際に成熟した肝細胞を体外から複数回肝臓内部に注入しても永続的な肝機能改善には至らなかった過去の臨床経験が、体内での長期的な細胞機能維持の難しさを物語っている<sup>7)</sup>。

iPS細胞など、治療に必要な細胞を大量に体内で維持可能な新しい技術を開発するために、臓器が持つ細胞外マトリックス(ECM)の骨格に着目したのが「脱細胞化骨格技術」である。体を構成する細胞(リンパ管、脈管内の細胞を除く)はすべてECMが作るタンパク質の骨組みに支えられており、物理的・生物学的に相互に影響を及ぼして存在している。ECM骨格自体は線維芽細胞などから生成され、マクロファージなどによって貪食される流動的な構造であって、特に肝臓においては肝硬変などの病態に密接に関連している。体内で大量の細胞を受け入れて、細胞機能を維持可能な構造として、この臓器由来の自然なECM骨格を臓器再生の基盤技術として利用することは理にかなっていると考えられる。

臓器を使った「脱細胞化」の技術は、2008年にボストンのグループからラットの心臓を用いた実験で初めて報告さ

#### ■ 著者連絡先

慶應義塾大学医学部外科学(一般・消化器)

(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地)

E-mail: h\_yagi@a3.keio.jp

れ<sup>8)</sup>、その後、肝<sup>9)</sup>、肺<sup>10)</sup>、腎臓<sup>11)</sup>など様々な臓器を使って報告され、技術の再現性・汎用性の高さが示された。特に本邦に比べて脳死移植のシステムが確立されている欧米では、心停止時間が長いものや摘出された臓器の質的な問題で、脳死移植ドナーに適さないと判断され廃棄される肝臓が存在し、米国だけでも年間2万件を超えるといわれている<sup>12)</sup>。したがって、せっかく摘出した臓器を無駄にしないために、その活用法の一つとして「臓器の脱細胞化」という手法が世界的に注目を浴び、多くの研究施設で主に小動物を用いて開発が進められてきた。しかしながら、実際に脱細胞化した後の骨格の中に外から細胞を充填・生着させること、さらに、作製した臓器様構造を体内に移植した後に出血や凝固を制御することは技術的に非常に難しく、もちろん血管吻合を伴う移植実験自体が小動物か大動物かにかかわらず高度に熟練した外科的技術を要することから、世界的にも脱細胞・再細胞化臓器作製と移植の研究開発を総合的に完遂できるグループは非常に限られているのが現状である。

### 3. 脱細胞化臓器骨格の再細胞化

臓器再生と代替機能の再現のためには、脱細胞化した骨格に対して一定の細胞数を体外で充填し、安定的に生着させ、体内でその機能を維持させることが必須である。これを「recellularization (再細胞化)」といい、その手法について確立した方法論は報告されていない。実際には、使用する細胞種(ヒトiPS細胞などを用いた場合にはその分化度)、脈管など細胞の注入ルート、注入圧、還流速度、注入順序、さらに注入後の品質評価法など、多くの要素技術が複合的に関連するため、これら一つひとつを最適化した上で方法を確立する必要がある。また、すべての組織や臓器には構成する細胞が少なくとも複数種類存在し、しかも実質臓器となると機能発現のためには大量の細胞が必要となる。実際には個々の細胞によって大きさ、必要数、接着程度、細胞強度などが異なるため、それぞれの細胞に合わせた体外還流培養下での生着方法の確立が必須である。

我々が研究を重ねたラット肝臓の知見によって、肝細胞を間質内に均等に充填することは、移植後の血液還流とその凝固阻止においても非常に重要であることがわかっている。肝臓では胆管細胞を胆管から、血管内皮細胞を門脈と肝静脈から、肝細胞および間葉系幹細胞などの非間質細胞を肝静脈から逆行性に、それぞれ特定の順序および一定の注入圧以下で注入し、持続的に還流培養を行うことで、安定した細胞充填が得られることが示された。ただし、体外で骨格内のすべてのスペースを埋めることは不可能と考え

られるため、移植手術を実施した直後のストレスに耐え得る分だけの細胞を脱細胞化骨格内に充填し、体内で血流が維持されれば、移植後の体内で細胞が血流に乗って骨格内に遊走すること、また体外であらかじめ充填された細胞が自己増殖することによって、移植後に体内で成熟化することが期待される<sup>13)</sup>。

### 4. 脱細胞化臓器骨格を用いた人工臓器開発の大動物 proof of concept (POC) の動向

2010年前後に相次いで小動物モデルでの人工臓器作製と移植成功例が報告されて以降、大量の細胞準備の必要性や前述した移植技術の困難性から、大動物の proof of concept (POC) を示す報告が長らくなされていなかった。2018年には大動物の肺を用いて初めての大動物移植実験の成功例が報告され、最長で2ヶ月まで一定の機能を示した<sup>5)</sup>。肝臓については、2020年になって米国 Mayo Clinic の Dr.Scott Nyberg らのグループが、ヒト培養内皮細胞の充填を優先的に行って血管網を被覆し、大動物に移植後2週間にわたる良好な血流再開を示し、その後、脱細胞化肝臓の血管化の約2週間後にブタの新鮮肝細胞を一部充填したグラフトをブタに移植した結果を報告した。残念ながら、本報告では術後わずか2日後に摘出して解析をしており、肝細胞が実際に機能したのかは明らかではなかった<sup>6)</sup>。

しかしながら、これらの報告によって、血管内皮細胞による脱細胞化骨格内部の血管壁の被覆をしっかりと行えば、脱細胞化臓器移植の実現化の障壁になり得る、内部の血栓化・長期的血流維持の問題を解決できる、という1つの光明が見えたといえる。我々のグループは2022年に、ブタ内皮細胞とともに、移植後の代替機能を示すことが可能な全肝の5%を目安としたブタ新鮮肝細胞を脱細胞化骨格に充填したグラフトを、免疫抑制薬投与下に肝障害ミニブタに移植し、1ヶ月にわたってグラフト機能が維持されたことを、臨床病理学的に示した<sup>14)</sup>。脱細胞化した臓器骨格に必要な細胞を充填して移植可能な部分肝臓グラフトを作製すれば、肝臓の治療効果を体内で発揮できることを、大動物の POC として示した世界初の報告である。

大動物を用いたこれらの成果によって、技術的に脱細胞化骨格を用いた大型の人工肝臓が作製・移植可能であり、移植後は体内で一定期間治療的機能を保つことが示された。しかしながら、これらのグラフトは新鮮ブタ肝細胞を用いているため、将来の臨床応用を目指すためには、ヒト由来の細胞を用いて治療効果を示し、POC を得ることが必須である。

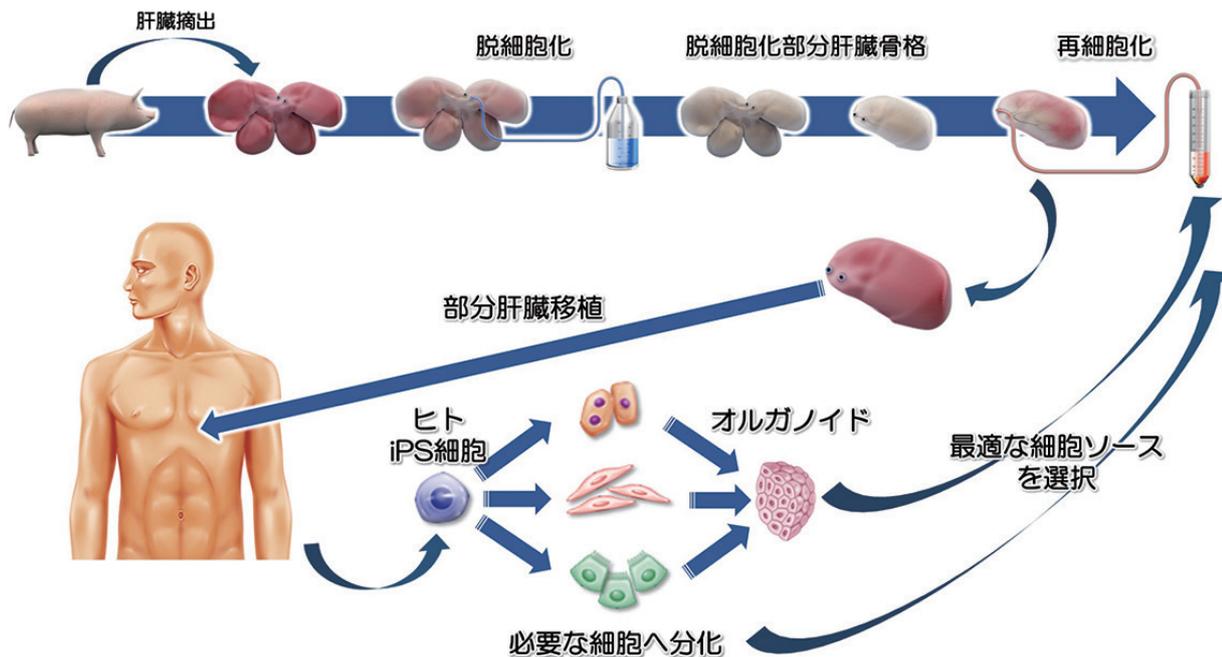


図1 プタ脱細胞化骨格を用いた再生肝臓移植のコンセプト

## 5. ヒトiPS細胞由来の細胞による再細胞化の可能性

臓器の再生医療を実現するためには、患者やドナーの皮膚などの細胞をわずかに採取することによって樹立することが可能なiPS細胞技術を応用すれば、ドナーの負担をほとんど考えることなく必要とする大量の細胞を入手できるため、臓器移植医療の多くの問題を解決できることが期待される。しかしながら、ヒトiPS細胞をもとに臨床応用に耐え得る成熟度の高い肝細胞を大量に得ること自体が、未だに技術的に困難なのが現状である。その原因として、体外で生体に近い細胞周囲環境を再現できないことが1つの問題となっている。

実際に最近の研究によって、生体に近い3次元立体構造やECM-細胞間相互作用を正しく制御・再現することが、幹細胞をはじめとする多くの細胞が分化・成熟するために大変重要な役割を担っていることが示されている<sup>15)</sup>。実際に幹細胞を成熟肝細胞へ分化誘導する場合も、ECM-細胞間相互作用が重要な役割を果たすことが数多く報告されており<sup>16)</sup>、2019年にはピッツバーグ大学のグループが、ヒトiPS細胞から分化させた複数種類の細胞をラット脱細胞化肝臓に充填して、最終的に非アルコール性脂肪肝炎(NASH)のモデルを作製して報告した<sup>17)</sup>。また、特に最近注目されているのが、ヒトiPS細胞などから作製したオル

ガノイドを使用して脱細胞化臓器骨格と組み合わせる手法で、iPS細胞をsingle cellとして使用するより高い機能を持った構造体が得られることが報告されており、本技術の臨床実現化のために非常に有用な細胞ソースと期待されている(図1)。

## 6. おわりに

肝臓においては、肝硬変に表されるようなECMの病的変化とそれに起因する細胞-ECM間相互作用の変性が、細胞自体の病的変性を惹起し、最終的には臓器としての機能低下に強く関わっていることが示されている<sup>18)</sup>。実際に線維化肝臓から脱細胞化を行ってその組成の違いを示した報告もされている<sup>19)</sup>。また興味深いことに、線維化の強い肝炎の肝臓から肝細胞のみを分離した後で細胞周囲環境を可能な限り正常化できれば、細胞機能の低下が可逆的であることが示されており、ECMが肝臓の病態にいかに関与しているかが実験的にも明らかである。我々のこれまでの実験でも、細胞のない肝臓骨格だけを肝臓切除断面に貼り付けると肝臓の再生を誘導できることが示されている<sup>20)</sup>。したがって、生体由来のECMを効果的に用いる脱細胞化の技術開発を進めることで、移植可能な再生肝臓への期待のみならず、今後の肝臓再生医療の実現化にとって大変重要な知見を与えるのではないかと考えている。

ヒトiPS細胞と脱細胞化技術とを融合させることで部分再生肝臓を作製できれば、臓器不全に対する従来の治療法を根本的に置き換えられる可能性が期待される。また組織構造としてより安定したオルガノイドと組み合わせることで、臨床応用の可能性がさらに高まると考えられる。

## 謝 辞

本研究は日本医療研究開発機構 (AMED) 「再生医療実現拠点ネットワークプロジェクト (拠点C)」、AMED「医療分野研究成果展開事業 (先端計測分析技術・機器開発プログラム)」、文部科学省「科学研究費基盤研究B (22H03137)」、文部科学省「科学研究費挑戦的研究 (開拓) (22K18395)」の支援の下で、委託事業として実施されている。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

## 文 献

- 1) Kanjo A, Ocskay K, Gede N, et al: Efficacy and safety of liver support devices in acute and hyperacute liver failure: a systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep* **11**: 4189, 2021
- 2) Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**: 481-4, 2013
- 3) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al: Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* **142**: 787-99, 2010
- 4) 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
- 5) Nichols JE, La Francesca S, Niles JA, et al: Production and transplantation of bioengineered lung into a large-animal model. *Sci Transl Med* **10**: eaao3926, 2018
- 6) Anderson BD, Nelson ED, Joo D, et al: Functional characterization of a bioengineered liver after heterotopic implantation in pigs. *Commun Biol* **4**: 1157, 2021
- 7) Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al: Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* **338**: 1422-6, 1998
- 8) Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al: Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* **14**: 213-21, 2008
- 9) 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
- 10) Ott HC, Clippinger B, Conrad C, et al: Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* **16**: 927-33, 2010
- 11) Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, et al: Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med* **19**: 646-51, 2013
- 12) Whiting JF, Delmonico F, Morrissey P, et al: Clinical results of an organ procurement organization effort to increase utilization of donors after cardiac death. *Transplantation* **81**: 1368-71, 2006
- 13) Kadota Y, Yagi H, Inomata K, et al: Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis* **10**: 268-77, 2014
- 14) Higashi H, Yagi H, Kuroda K, et al: Transplantation of bioengineered liver capable of extended function in a preclinical liver failure model. *Am J Transplant* **22**: 731-44, 2022
- 15) Nelson CM, Bissell MJ: Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 287-309, 2006
- 16) Peerani R, Zandstra PW: Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering. *J Clin Invest* **120**: 60-70, 2010
- 17) Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, et al: Generation of Human Fatty Livers Using Custom-Engineered Induced Pluripotent Stem Cells with Modifiable SIRT1 Metabolism. *Cell Metab* **30**: 385-401.e9, 2019
- 18) Liu L, Yannam GR, Nishikawa T, et al: The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* **55**: 1529-39, 2012
- 19) Salim MS, Issa AM, Farrag ARH, et al: Decellularized liver bioscaffold: a histological and immunohistochemical comparison between normal, fibrotic and hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Hepatol* **5**: 35-47, 2019
- 20) Shimoda H, Yagi H, Higashi H, et al: Decellularized liver scaffolds promote liver regeneration after partial hepatectomy. *Sci Rep* **9**: 12543, 2019