

学位授与番号：乙 3 0 7 4 号

氏 名：齊藤良太

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 12 月 25 日

学位論文名：

マウス不死化肝細胞を用い作成した肝臓オルガノドの大網および腎臓への移植に関する検討

主論文名：

Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney.

（マウス不死化肝細胞を用い作成した肝臓オルガノドの大網および腎臓への移植に関する検討）

学位審査委員長：田尻久雄教授

学位審査委員：岡野ジェームズ洋尚教授、横尾隆教授

論文要旨

論文提出者名	斉藤 良太	指導教授名	矢永 勝彦
<p data-bbox="161 551 304 580">主論文題名</p> <p data-bbox="161 600 1190 633">Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney</p> <p data-bbox="161 647 1410 680">(マウス不死化肝細胞を用い作成した肝臓オルガノドの大網および腎臓への移植に関する検討)</p> <p data-bbox="161 696 588 730">Artificial Organs 2011;35:80-83</p> <p data-bbox="161 790 268 824"><要旨></p> <p data-bbox="161 840 1445 1108">【背景】肝移植治療は末期肝不全患者に対する有効な治療法として定着しているが、ドナー不足の問題からその代替治療としてバイオ人工肝臓 (BAL: bio-artificial liver) が注目されている。慢性肝疾患を対象とした場合、長期的な肝庇護の立場から、BAL を生体埋め込み型人工肝臓として使用し治療する方法が考えられる。肝機能を代替する組織 (肝臓オルガノイド) を慢性肝疾患患者に移植し、長期の肝サポートを期待するものである。本研究では、その第一歩としてマウス不死化肝細胞より肝臓オルガノイドを作製し、ヌードマウスへの移植を試みた。</p> <p data-bbox="161 1124 1445 1348">【方法】自施設で開発したラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) system を用い、マウス不死化肝細胞 (IMHs) を不死化伊東細胞 (HSCs) および不死化類洞内皮細胞 (SECs) と共培養し肝臓オルガノイドを作製し、形態および機能(遺伝子発現)につき検討した。なお、培養時の工夫として生体可溶性を有する apatite fiber scaffold (AFS) を担体として用いた。続いて作製した肝臓オルガノイドを、ヌードマウスの大網および腎皮膜に移植し、その生着について検討した。</p> <p data-bbox="161 1364 1445 1588">【結果】RFB を用いて作製した肝臓オルガノイドでは類円形の不死化肝細胞が積み重なるように高密度に培養され、島状の肝細胞の間に扁平な細胞で裏打ちされた血管様構造を認めた。SEM による観察では微絨毛を有する不死化肝細胞が AFS の格子の間で3次元様に増生しているのを認めた。移植した肝臓オルガノイドは大網および腎皮膜下で生着を認めた。両移植部位における肝特異的遺伝子(Albumin, Cx26, Cx32, G6Pase)の発現は良好であったが、TAT については大網に移植したオルガノイドでのみの発現となった。</p> <p data-bbox="161 1603 1445 1682">【結語】細胞源として不死化肝細胞を使用し RFB system を用い作成した肝臓オルガノイドは、肝組織移植における新しい cell source として有用であると示唆された。</p>			

論文審査の結果の要旨

齊藤良太氏の学位申請論文は, “Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney” (マウス不死化肝細胞を用い作成した肝臓オルガノイドの大網および腎臓への移植に関する検討) です. 以下に主論文の要旨と論文審査会の審査結果をご報告いたします.

肝移植治療は末期肝不全患者に対する有効な治療法として定着していますが, ドナー不足の問題からその代替治療としてバイオ人工肝臓 (BAL: bio-artificial liver) が注目されています. 急性肝不全に対しては, BAL を体外循環装置として用い, 脳症の改善やアンモニア, ビリルビン数値の改善などの報告がされてきました. 慢性肝疾患に対して肝細胞移植が行われてきましたが, その効果は一部の代謝性肝疾患で確認されるのみであり, また一度に移植できる細胞数の制限や免疫を介した拒絶反応を受けやすいなどの問題があります. 慢性肝疾患を対象とした場合, 長期的な肝庇護の立場から, BAL を生体埋め込み型人工肝臓として使用し治療する方法が考えられます. すなわち肝機能を代替する組織 (肝臓オルガノイド) を慢性肝疾患患者に移植し, 長期の肝サポートを期待するものです. 本研究では, その第一歩としてマウス不死化肝細胞より BAL を用い肝臓オルガノイドを作製し, ノードマウスへの移植を行いました.

ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) system を用い, マウス不死化肝細胞 (IMHs) を不死化伊東細胞 (HSCs) および不死化類洞内皮細胞 (SECs) と共培養し肝臓オルガノイドを作製し, 形態および機能 (遺伝子発現: RT-PCR を用い肝特異的酵素である albumin, connexin26 and 32, HNF-4 α , TAT, G6Pase の mRNA 発現) を検討しました. 培養時の工夫として生体可溶性を有する apatite fiber scaffold (AFS) を担体として用いました. 不死化細胞の cell line は SV40 large T Ag を組み込んだ transgenic mouse より樹立しました. 肝細胞と非実質細胞との共培養により, 肝特異的機能発現の改善が認められることが報告されており, 培養群として肝細胞単独培養群と, 肝細胞と伊東細胞, 類洞内皮細胞を共培養した群を設定し比較しました. ラジアルフロー型バイオリアクターは自施設で開発したリアクターであり, 培養液が培養筒 (チャンバー) の中をラジアル (放射状) に灌流することで効率のよい高密度培養が可能となります. また, 容易に scale up, scale down できる利点があります.

続いて作製した肝臓オルガノイドをノードマウスの大網および腎皮膜に移植し, その生着について検討しました. 腎被膜および大網を選択した理由として腎皮膜は, 古くより膵臓のラ氏島移植に用いられ, 生着に必要な血流が豊富であることや recipient からの拒絶反応を受けづらい利点があります. 大網はその access の容易さや一度に多量の細胞を移植できる利点があります.

RFB を用いて作製した肝臓オルガノイドでは類円形的不死化肝細胞が積み重なるように高密度に培養され, 島状の肝細胞の間に扁平な細胞で裏打ちされた血管様構造を認めました. SEM による観察では微絨毛を有する不死化肝細胞が AFS の格子の間で3次元様に増生

しているのを認めました。肝特異的機能において、肝細胞単独培養群と比較し共培養オルガノイド群において albumin の発現の低下が認められました。またアルブミン合成を制御する遺伝子である HNF-4 α においても共培養オルガノイド群での発現の低下が認められました。Albumin の産生は、遺伝子発現や遺伝子転写レベルで複雑に制御されており、今回の実験においてどの因子が albumin 発現に影響したかを判定するのは困難です。培養条件の違いにより、不死化細胞が本来とは異なった遺伝子発現を示したと推測していますが、今回の albumin の発現低下の原因については、更なる検討が必要であると考えています。

移植した肝臓オルガノイドは大網および腎皮膜下で生着を認めました。両移植部位における肝特異的遺伝子(Albumin, Cx26, Cx32, G6Pase)の発現は良好でしたが、TAT については大網に移植したオルガノイドでのみの発現となりました。大網は、その解学的な位置および構造により膵からのインシュリンやグルカゴンなどの肝増殖性のホルモンを受けやすい特徴を有しており、これが TAT の発現の差に関係していると考えられました。

細胞源として不死化肝細胞を使用し RFB system を用い作成した肝臓オルガノイドは、肝組織移植における新しい cell source として有用であることが示唆されました。

本論文に対する審査会は、平成 25 年 12 月 2 日(月)に岡野ジェイムス洋尚教授, 横尾 隆教授のご臨席のもと開催され、両教授より貴重なご意見、ご示唆をいただきました。

席上 1) なぜ、不死化肝細胞を細胞源として用いたか。 2) 移植部位として腎および大網を選択した理由。 3) 移植 8 週以降の増殖様式あるいは腫瘍化の問題。 4) albumin 発現低下の理由。 5) Scaffold としての AFS(apatite fiber scaffold)は有用か。他の Scaffold と比較してその利点は何か。 6) 各種 bioreactor の特性について。 7) 共培養群において、肝細胞→伊東細胞→内皮細胞の順に細胞を投入した理由。 8) オルガノイドの生着について毛細血管網の発達様式。 9) 今後、どのようにして臨床応用につなげるのか。などの質問がありましたが、これらについて齊藤良太氏は適切な回答と意見を述べました。その後、審査会は慎重審議の結果、本論文を学位申請論文として十分に評価あるものと認めた次第です。