慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ブタ脱細胞化技術と幹細胞の融合により三次元胆管・血管構造を有す新規移植肝臓の開発
Sub Title	Organ engineering by decellularized scaffold for transplant and regenerative therapy
Author	八木, 洋(Yagi, Hiroshi) Soto-Gutierrez A
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	脱細胞化臓器骨格は、再生細胞の足場として有用であるだけでなく臓器特有の三次元構造から外科的に移植可能なマクロ構造へ連続する血管網、細胞外マトリックス構造を有している。我々はiPS細胞技術の臨床応用に向けて、ブタの肝臓を用いて脱細胞化骨格の移植手技の定型化に努めてきた。移植後の長期的機能維持を目指し、還流血液の凝固の問題をクリアするため、内皮細胞や抗凝固粒子による門脈系の被覆、門脈カテーテルを用いた抗血栓薬の持続投与によって大幅な改善を得た。今後は、膵臓・小腸を含めた本技術の幅広い応用の可能性を含め、脱細胞化臓器骨格を基盤としiPS細胞を用いた再生医療を実現すべく更に本研究を推進していきたい。 Recent technology in stem cell engineering has raised new possibilities for the study of complex physiological processes in vitro, as well as the potential to fabricate entire organs for transplantation. After the huge progress in vitro using human-induced pluripotent stem cells which can differentiate relatively functional somatic cells, we should go for the next stage to investigate clinical applications of those cells using feasible animal models. Therefore, we have been developed a new technology using acellular three-dimensional scaffolds to generate transplantable whole liver which can be recellularized with appropriate cell types. It can retain all the necessary cues of tissue regeneration with efficient blood supply by suturing vascular access in vivo. For the clinical application, it should be applied to preclinical experimental large animal models. We believe that this technology may help to open new insight into organ regeneration as well as drug metabolism and toxicity.
Notes	研究種目：若手研究(A) 研究期間：2011～2013 課題番号：23689059 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23689059seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　５　月　２１　日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３６８９０５９

研究課題名（和文）ブタ脱細胞化技術と幹細胞の融合により三次元胆管・血管構造を有す新規移植肝臓の開発

研究課題名（英文）Organ Engineering by Decellularized Scaffold for Transplant and Regenerative Therapy

研究代表者
八木　洋（YAGI, HIROSHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：２０３２７５４７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　20,500,000円、（間接経費）　　6,150,000円

研究成果の概要（和文）：脱細胞化臓器骨格は、再生細胞の足場として有用であるだけでなく臓器特有の三次元構造から外科的に移植可能なマクロ構造へ連続する血管網、細胞外マトリックス構造を有している。我々はiPS細胞技術の臨床応用に向けて、ブタの肝臓を用いて脱細胞化骨格の移植手技の定型化に努めてきた。移植後の長期的機能維持を目指し、還流血液の凝固の問題をクリアするため、内皮細胞や抗凝固粒子による門脈系の被覆、門脈カテーテルを用いた抗血栓薬の持続投与によって大幅な改善を得た。今後は、膵臓・小腸を含めた本技術の幅広い応用の可能性を含め、脱細胞化臓器骨格を基盤としiPS細胞を用いた再生医療を実現すべく更に本研究を推進していきたい。

研究成果の概要（英文）：Recent technology in stem cell engineering has raised new possibilities for the study of complex physiological processes in vitro, as well as the potential to fabricate entire organs for transplantation. After the huge progress in vitro using human-induced pluripotent stem cells which can differentiate relatively functional somatic cells, we should go for the next stage to investigate clinical applications of those cells using feasible animal models. Therefore, we have been developed a new technology using acellular three-dimensional scaffolds to generate transplantable whole liver which can be recellularized with appropriate cell types. It can retain all the necessary cues of tissue regeneration with efficient blood supply by suturing vascular access in vivo. For the clinical application, it should be applied to preclinical experimental large animal models. We believe that this technology may help to open new insight into organ regeneration as well as drug metabolism and toxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：幹細胞　臓器再生　再生医療　組織工学

１．研究開始当初の背景

日本国内だけで 100 万人と言われる肝疾患患者の中で年間 4 万人以上がその関連疾患により死亡している。特に重症肝障害に対しては肝移植がほぼ唯一の根治的治療法であるが、米国だけでも年間 8000 人がドナー肝を待ちながら死亡する現状で、そのほとんどを生体ドナーに委ねる日本においては、臓器移植法が改正されたとは言えドナー不足は深刻な問題となっている。臓器移植に代わり少ないドナーから多くの患者を救うために肝細胞移植が世界的に試みられたが（IJ Fox, N Engl J Med, 1998）その長期的機能保持の限界から新しい治療法として確立するには至らなかった。この結果は細胞機能を保持する上での生体に本来あるべき細胞外マトリックス構造の重要性を示唆し、その後マトリックスの構成成分を融合させたバイオ肝臓の研究が長年に渡って行われる一つの根拠となった。その結果動物モデルで一定の機能を発現するに至ったが（Ohashi K, Nat Med, 2007）、肝類洞構造を含む微細血管系から解剖学的に吻合可能な門脈/肝動脈/肝（中心）静脈系までの連続的血管再構築の困難性は、腸管からの栄養豊富な血液を供給する肝再生にとって不可欠な門脈血流循環の欠如をもたらし、それに加え肝臓特異的な連続的胆管構造による胆汁排泄機能の欠落は、未だに臨床応用可能なモデルの出現を妨げている。この状況を打破すべく本申請代表者はハーバード大学の研究員時代に Ott らのラット心臓を用いた脱細胞化によるマトリックスの保持・臓器の作製法に学び（Ott HC, Nat Med, 2008）、ラット肝臓の脱細胞化と肝細胞生着によって得られた新しいグラフトの作製とその移植に成功した（Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Nat Med, 2010）。この技術の大きな特徴は生細胞をすべて除去しながらもその作製した半透明な肝臓スキャフォールドの中に生体に本来あるべき三次元立体構造が十分に保持され、それ故に上述の細胞成熟・再生に必須な細部に渡る血管および胆管構築を有しながら細胞一つ一つが生着するマトリックスのベッドと言える微細構造を保つ点である。しかしながら一方で移植後表面からの出血及び内部での血液凝固により長期には生体内に保持できず、胆汁排泄能の欠落も含め肝機能も未熟であるなどの問題点が浮かび上がった。臨床応用にとって重大な欠陥であるこれらの問題点は、脱細胞化により消失してしまった血管内皮細胞等の血管内腔構成細胞および肝細胞と共に胆管細胞の再生着が必須であることを物語っていた。代表者が間葉系幹細胞の抗炎症/肝保護効果を研究テーマの一つとしてきた経験から（Yagi H,Mol Ther,2010）(Yagi H,Tissue Eng Part A,2009)、間葉系幹細胞が持つ血管内皮細胞への機能修飾効果に着目し、また本モデルのような新鮮肝細胞を用いる限りドナー不足の根本的解決策にはなり得えないことから、これらの問題点を解決すべく『(1) 間葉系幹細胞を応用した脱細胞化肝臓内での血管構築の最適化、(2) 胆管細胞の再生着による胆管構造の再生、(3) 最終的な細胞ソースとしての iPS 細胞技術を応用したオーダーメイド肝臓の開発』を大きな目標に見据え、本年 4 月から慶應義塾大学医学部外科学教室の研究専任助教として帰室した。ラットモデルを用いた本プロジェクトに対して慶應義塾大学次世代研究プロジェクト推進プログラムによる助成金（2010～2012 年）を獲得しこれを基盤として、胆管再生に関してはコラーゲン構造内での微細胆管再生の研究を行っている理工学部谷下一夫教授（Hashimoto W, Am J Pathol,2008）と、間葉系幹細胞に関しては生理学教室松崎有未准教授（Morikawa S,J Exp Med,2009）と、そして iPS 細胞に関しては同岡野栄之教授とそれぞれ共同研究を締結した上で、まず当研究室で同じ脱細胞

化システムを立ち上げ、それぞれの細胞を本システムに適応させる研究を開始した。その結果まず間葉系幹細胞と血管内皮細胞の共培養によりスキャフォールドへの選択的細胞生着が顕著となることが示された。一方でラットにおけるマトリックス構造の脆弱性と門脈領域への部分肝移植という技術的困難性から、本グラフトの臨床的適合性を評価にするために早い段階での大動物モデル特にヒト肝臓と近似性の高いブタモデルの構築が必須であると考えた。当教室の肝移植グループですでにブタを用いた実験を行っていること、及び代表者が元々肝移植グループに所属し京都大学移植外科にも臨床留学経験があること（Yagi H,Surg Today,2004）からブタを使ったモデルの構築が可能と判断し、同じ脱細胞化システムがブタに応用可能かを試みた。その結果に示すごとく『ブタ肝の脱細胞化が可能であり且つ内部マトリックス構造及び血管構造が十分に保たれその構造がラットに比し強固なことが示された』ため移植への強い手応えを得、本申請に至った。

２．研究の目的

本研究は生体組織の脱細胞化技術を用いて作製した半透明なブタ由来の全肝三次元スキャフォールドに『肝細胞、間葉系幹細胞、胆管細胞、血管内皮細胞』を生着させることで、肝臓機能に必須な『細胆管から小葉間胆管構造を経た連続的な胆汁排泄経路と微細血液循環系から吻合可能な門脈/肝動脈/肝（中心）静脈系への連続的血管構造を有するこれまでにない機能的な肝臓グラフト』を開発し、これを肝再生・増殖に重要な役割を担う門脈血流へ吻合/移植することによって、臓器として十分に機能する『新しい移植肝臓を提供する』ことを目的としている。この新技術を基盤として年間数万人がその命を落とす重症肝障害治療への新たな道筋を示すことを目指す。

３．研究の方法

（1） ブタ肝臓の脱細胞化とその評価

我々はラットですでに確立した脱細胞化法を用いてブタの脱細胞化が技術的に可能であることを示す。まず得られた脱細胞化肝臓が細部に渡り十分に細胞を保持するマトリックス構造を有しているか、吻合可能な強度を持つ血管構造が保たれているか、これまで評価されていない内部胆管構造の詳細について
を遺残 DNA 解析・免疫染色・プラスチック注入法・電子顕微鏡などを用いて評価した。

（2） ブタ脱細胞化肝臓への間葉系幹細胞/血管内皮細胞の生着とその評価

ヒト間葉系幹細胞とブタ血管内皮細胞のスキャフォールド内での共培養系を独自の循環培養閉鎖式チャンバーを用いて行い、計時的に 7 日間まで細胞生存とその局在を組織学的（CD31、CD90、Integrinβ1 染色）に評価した。

（3） ブタ再細胞化肝臓の移植

作成した再生肝臓が移植可能であるかどうか、血管吻合を用いて 20kg のブタの門脈、下大静脈に接続した。門脈血流を再開し、内部の状態を確認した後閉創。7 日目にこれを摘出し、病理学的に解析した。また適切な移植方法について定型化した。

４．研究成果

本研究によって、再生肝臓の作成が大動物でも可能であること、更にブタへの移植が可能であることが明らかとなった。またこの結果は世界初の報告として論文化し、発表された論文は雑誌の年間ダウンロード数上位 10 件

に入るほどの注目を集めた。大動物での成功に対するインパクトは大きく、プレスリリースを行って、一般にも周知させていただいた。本件かを受け、施設代表の北川雄光の名の下、「JST 再生医療実現拠点ネットワークプログラム　技術開発個別課題」に採択をいただき、実際の臨床応用へ向けて更なる具体的な実験を展開するに至った。若手研究（A）による研究助成がまさに結実したものである。しかしながら、本研究によって今後の課題も明らかとなった。その一つが、移植をしてその評価が可能な大動物モデルがないこと、また移植後の内部の強い凝固の問題である。この二点については、本研究内では解決に至らなかったため、引き続き JST のプロジェクトとして取り組んでいる。3 年～5 年をめどに、ブタでの POC を取得し、臨床応用の実現を目指したい。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　4　件）

1. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Kitagawa Y. Whole-organ re-engineering: a regenerative medicine approach in digestive surgery for organ replacement. Surg Today. 2013;43(6):587-94 DOI 10.1007/s00595-012-0396-1s 査読あり

2. Yagi H, Fukumitsu K, Fukuda K, et al. Human-Scale Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation: a Regenerative Medicine Approach. Cell Transplant 2013;22(2):231-42 DOI10.3727/096368912X654939.査読あり

3. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Kitagawa Y. Decellularized scaffold as a platform for novel regenerative therapy. Nihon Geka Gakkai Zasshi. 2012 Sep;113(5):419-23.査読あり

4. Fukumitsu K, Yagi H, Soto-Gutierrez A. Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver. Transplant Proc. 2011 Jul-Aug;43(6):2137-8.DOI10.1016/j.transproceed.2011.05.014.査読あり

〔学会発表〕（計　17　件）

注)門多由恵：八木洋指導下の大学院生

1. 八木洋、Large Scale Transplantable Liver Graft using Decellularized Whole-Organ Scaffold. Cell and Gene Therapy 2013 Orlando 2013.10.23

2. 門多由恵、Human-Scale Transplantable Liver Graft using Decellularized Whole-Organ Scaffold. 2013.10.23 TERMIS-ASIA 中国

3. 門多由恵、Mesenchymal stem cell supports hepatocyte function in acellular whole organ scaffold. CAST 2013.9.3 京都

4. 八木洋、TRANSPLANTABLE DECELLULARIZED WHOLEORGAN SCAFFOLD FOR LIVER REGENERATIVE THERAPY IN LARGE ANIMAL MODEL. ISSCR Boston 2013.6.13

5. 八木洋、Human-Scale Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation. 2013.4.26 Amsterdam

6. 八木洋、Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2012.11.10

7. 八木洋、ブタ脱細胞化肝臓と幹細胞技術を用いた新しい肝再生療法の開発、日本移植学会、仙台、2012 年 10 月 5 日

8. 八木洋、脱細胞化・再細胞化による臓器再生．第 48 回日本移植学会総会，名古屋，2012.09.20

9．門多由恵、Reconstruction of the hepatic sinusoid with decellurarized liver matrix scaffold and mesenchymal stem cells、万国外科学会、横浜、2012 年 8 月 31 日
10．八木洋、ブタ脱細胞化技術とヒト幹細胞の融合により三次元血管・胆管構造を有する肝臓グラフトの開発、日本消化器外科学会、名古屋、2012 年 7 月 14 日
11．門多由恵、Reconstruction of the Hepatic Microvasculatures with Decellularized Liver Matrix Scaffold and Mesenchymal Stem Cells. American Transplant Congress 2012, Boston, 2012.06.3
12．八木洋、脱細胞化肝骨格を用いた肝臓再生．第 12 回日本抗加齢医学会総会，横浜，2012.06.22
13．八木洋、Large-scale whole-organ engineering for liver transplantation. American Transplant Congress 2012, Boston, 2012.06.5
14．八木洋、ブタ全肝脱細胞化スキャフォールドを用いた新しい肝再生療法の開発、日本外科学会、紙面開催（東京予定)、2012 年 5 月 26-28 日
15．八木洋、Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation a Regenerative Medicine Approach―. Universidade de Sao Paulo, Gastrointestinal and colorectal surgery meeting, Sao Paulo, 2012.03.9
16．八木洋、Large-scale whole-organ decellularization of swine liver for transplantation. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, San Francisco, 2011.11.3
17．門多由恵、Reconstruction of the hepatic sinusoid with decellularized liver matrix scaffold and mesenchymal stem cells. International Surgical Week ISW 2011 (32nd ISS/SIC), Yokohama, 2011.08.28

〔図書〕（計　2　件）

1．八木洋，北川雄光．第 6 回 脱細胞化肝骨格を用いた肝臓再生 G.I.Research 20(3): 254 -256 2012，先端医学社
2．Yagi H, Soto-Gutierrez A, Kitagawa Y, Yarmush ML. Mesenchymal Stem Cell Therapy: Immunomodulation and Homing Mechanisms. Stem Cells and Cancer Stem Cells Volume 8, 2012, pp 91-104, Springer

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://keiosurg.umin.jp/ggs/study_group/keio_surgery_regenerative_therapy-new_000.htm
http://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2012/kr7a4300000b06y3.html

６．研究組織

(1)研究代表者
八木　洋　　（Yagi　Hiroshi）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20327547

(2)研究分担者　なし
(　　)

(3)連携研究者　なし
(　　)

(4)研究協力者
Soto-Gutierrez A
Assistant Professor
Department of Pathology
University of Pittsburgh, USA