HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝細胞移植における肝細胞スフェロイドの有用性に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	渋谷, 一陽
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14619号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/82960
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号：2635
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Kazuaki_Shibuya_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　渋谷　一陽

	主査	教授	大場　雄介
審査担当者	副査	准教授	夏賀　健
	副査	准教授	岩永　ひろみ

学 位 論 文 題 名

肝細胞移植における肝細胞スフェロイドの有用性に関する研究
（The efficacy of hepatocyte spheroid for hepatocyte transplantation）

申請者は C57BL6 マウスから単離した肝細胞を用いて、肝細胞スフェロイドを生成し、さらに肝細胞スフェロイドを経門脈的にマウス肝臓に移植し、移植細胞の細胞機能を評価することで、肝細胞移植における肝細胞スフェロイドの有用性を検証した。肝細胞スフェロイドの作成では、マウス肝臓から肝細胞を単離する条件、単離した肝細胞の培養条件を検討し、Hanging drop 法で肝細胞スフェロイドを生成する方法を確立した。まず、生成した肝細胞スフェロイドが肝細胞機能を維持していることを示し、次に経門脈的マウス肝臓内肝細胞スフェロイド移植を施行し、移植後も肝細胞スフェロイドが機能していることを示した。また、組織学的に移植した肝細胞スフェロイドがその形態を変えながら門脈内及び門脈の内皮を超えて肝実質に存在していることを示した。さらに腎皮膜下、皮下への肝細胞移植を施行し、肝細胞スフェロイドが肝臓外でも生着することを示した。

審査にあたり副査の夏賀准教授から、免疫抑制剤の使用について質問があり、本実験は同種同型モデルであるため使用しなかったが、臨床応用にあたっては同種異型移植モデルでの検証が必要でありその段階ではレシピエントの免疫抑制が必要と回答した。移植した細胞がどのように内皮を超えているのかとの質問に、推測だが変形した肝細胞スフェロイドが肝細胞 1 個ずつ類洞から実質内に入り込んでいると回答した。臨床的に移植場所はどこが一番適していると考えるかとの質問に、肝細胞であるため肝臓が最適と回答した。

次に副査の岩永准教授から、肝細胞スフェロイドがどのように肝臓実質に入り込んで生着しているのか証明はできていないかとの質問に、検証できてないと回答した。Hanging drop 法での培養中に肝細胞は分裂しているかとの質問に、単離直後の single hepatocyte は分裂せず、生き残るために細胞同士が凝集すると回答した。肝細胞スフェロイドを構成する細胞は 100%肝細胞かとの質問に、ほぼ肝細胞だが線維芽細胞などは入り込んでいると回答し、胆管細胞、伊藤細胞など他の細胞がいるかどうか分析した方が良いと指摘された。

最後に主査の大場教授から、iPS によって移植細胞を作成する方法もあるが、なぜ肝細胞スフェロイドなのかとの質問に、肝細胞スフェロイドでは肝臓移植に使用できない肝臓でも単離してスフェロイドにすることで viability の低い細胞を除外でき、再利用できるメリットもあると回答した。自分の肝細胞でも良いのかとの質問に、代謝性肝疾患の場合は遺伝子異常のため iPS や自家移植は治療として無効であり、ドナーの肝臓が必要になると回答した。現在の肝細胞移植の成績は一時的な効果に止まっているという問題点に対するこの研究の回答は？との質問に、本研究で示すことができたのは肝細胞スフェロイド移植が可能であるという段階までで、single hepatocyte と比べた治療成績の比較は今後の課題となると回答した。ApoE KO マウスの予後についての質問に、ApoE KO マウスは脂質代謝異常によって高脂血症になり動脈硬化を引き起こすモデルである

ため、臨床的な治療効果を評価するには、血中の脂質の変化や動脈硬化の程度を治療効果判定にできれば良かったが、そこまでできなかったと回答した。腎皮膜、皮下移植後のマウスの血清 ApoE 濃度はどうであったかとの質問に、検出感度以下であり、生着はしているが細胞機能を発揮する経路が不十分な可能性と移植細胞量が少なかった可能性があると回答した。１匹のマウスに必要なドナー数についての質問に、１匹のマウスから十分量の肝細胞が採取でき、５匹は十分可能と回答した。人間では 1/5 肝臓が必要になりますか？との質問に、代謝性肝疾患の場合は肝臓全体の機能ではなく、一部の酵素が補えればいいので文献的に 3–5%の肝細胞量が補えれば十分であると回答した。採取からスフェロイド形成までに必要な時間や輸送に対する耐性はどうかとの質問に対し、肝細胞スフェロイドの形成には３日間必要なため、その間に患者側がスフェロイドを作成している施設に移動することも可能である。また、衝撃に対する耐久性は検証していないが、ヒトが運搬する程度の衝撃には耐え得ると回答した。

この論文は、マウス肝臓から肝細胞を単離し、さらに肝細胞スフェロイドを生成する方法を確立した点、生成した肝細胞スフェロイドを用いたマウス肝細胞スフェロイド後も移植細胞が機能していることを示し、肝細胞スフェロイド移植が肝細胞移植に有用である可能性を示唆した点が高く評価される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。