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
Author(s)	渋谷, 一陽
Description	配架番号：2635
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14619号
Issue Date	2021-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14619
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82961
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuaki_Shibuya.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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)

2021 年 6 月

北海道大学

渋谷　一陽

学位論文

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)

2021 年 6 月

北海道大学

渋谷　一陽

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・　1 頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2 頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6 頁

方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　9 頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　13 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　35 頁

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　39 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　40 頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　41 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

１、Kazuaki Shibuya, Masaaki Watanabe, Ryoichi Goto, Masaaki Zaitsu, Yoshikazu Ganchiku and Akinobu Taketomi, The efficacy of hepatocyte spheroid for hepatocyte transplantation, Cell Transplant, in press (2021.02.14 Accepted)

本研究の一部は以下の学会に発表した

１、　渋谷一陽、渡辺正明、巖築慶一、金沢亮、財津雅昭、川村典生、後藤了一、武冨紹信　球状肝細胞の肝細胞移植における有用性
第 119 回日本外科学会（2019.4.20 大阪）

２、　Shibuya K, Watanabe M, Ganchiku K, Kanazawa R, Zaitsu M, Kawamura N, Goto R, Taketomi A The efficacy of the spheroidal hepatocyte for hepatocyte transplantation
American Transplant Congress 2019 (2019.6.1 Boston)

３、　渋谷一陽、渡辺正明、巖築慶一、金沢亮、財津雅昭、後藤了一、武冨紹信　球状肝細胞の肝細胞移植における有用性
再生医療学会(2020.5.25 横浜, web)

４、　Shibuya K, Watanabe M, Ganchiku K, Kanazawa R, Zaitsu M, Goto R, Taketomi A The efficacy of the spheroidal hepatocyte for hepatocyte transplantation
American Transplant Congress 2020 (2020.5.30 Philadelphia, Web)

要旨

【背景と目的】

肝細胞移植は急性肝不全や代謝性肝疾患に対して行われている治療であり、特にその低侵襲性から、肝臓移植に代わる次世代の治療法として応用が期待される。しかし、これまでの臨床肝細胞移植の報告では、多くの症例で病態の改善を一時的に認めるものの、最終的に肝臓移植が必要となる。肝細胞移植の問題点として、移植される single hepatocyte が肝臓からの単離精製過程で傷害を受け、その機能が低下すること、また、移植によって惹起される自然免疫応答により移植された single hepatocyte の大部分が失われ、長期生着が得られないことが挙げられる。single hepatocyte から構築される肝細胞スフェロイドは、より肝臓組織に近い細胞環境を有し、single hepatocyte と比較して構造的に強固であるとともに、高い生存率を保ち、肝特異的機能を維持していることから、肝細胞移植に応用できる可能性がある。本研究の目的は肝細胞移植における肝細胞スフェロイドの有用性を検討することである。

【材料と方法】

C57BL/6J マウス肝臓から肝細胞を単離し、Hanging drop 法で肝細胞スフェロイドを生成した。肝細胞スフェロイドの生存率測定、組織学的評価、肝細胞特異的機能評価として細胞内 mRNA(アルブミン, ornithine transcarbamylase (otc), coagulation factor VII, coagulation factor IX, glucose-6-phosphate (g6p), apolipoprotein E (ApoE), alpha-1-antitrypsin, low density lipoprotein recepter (ldlr))発現量、培養液中のアルブミン、尿素、ApoE 各濃度を、同細胞濃度で collagen coat dish 上で 3 日間単層培養した単層培養後単一肝細胞とそれぞれ比較した。マウス肝細胞移植モデルとして、単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイドをそれぞれ ApoE knockout(-/-)マウスの肝臓内に経門脈的に移植した。移植後の血清 ApoE 濃度を経時的に測定するとともに、移植された単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイドの機能評価、形態学的評価を組織学的に行なった。肝細胞移植後の肝臓内の炎症反応を評価するため、移植 6 時間後の肝臓を摘出し、interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6), tumor necrotic factor-α(TNF-α), macrophage inflammatory protein-1β(MIP-1β), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)の mRNA 発現量を評価した。肝細胞スフェロイドの異所性肝細胞移植への応用を検討するため、単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイドをそれぞれ腎皮膜下、皮下に移植し、移植 1 ヶ月後に組織学的評価を行った。

【結果】

Hanging drop 法で肝細胞を培養すると、3 日目には大きさ約 200μm の肝細胞スフェロイドが観察され内部は CK18 で染色された。生成直後の肝細胞スフェ

ロイドにおけるアルブミン, otc, coagulation factor VII, coagulation factor IX, ApoE, alpha-1-antitrypsin, low density lipoprotein receptor の mRNA 発現量は単層培養後単一肝細胞と比較して有意に高値であった。また、培養液中のアルブミン、尿素、ApoE 各濃度は単層培養後単一肝細胞と比べ肝細胞スフェロイドで高値であった。生成後の肝細胞スフェロイドの生存率、アルブミン mRNA 発現量は回収直後から 6 時間後までほぼ変わらず維持されており、肝細胞スフェロイドが肝細胞移植に応用可能であると判断した。一方、単離直後単一肝細胞の生存率、アルブミン mRNA 発現量は単離直後から急速に低下した。移植直前の単離直後単一肝細胞の ApoE mRNA 発現量は肝細胞スフェロイドと比べ有意に高値であった。しかし、移植後マウスの血清 ApoE 濃度は、肝細胞スフェロイド移植群で高い傾向がみられた。肝細胞移植後の組織学的評価では肝細胞スフェロイド移植後 4 日目で門脈内に ApoE 陽性の肝細胞スフェロイドを認め、7 日目で肝細胞スフェロイドは平らな形状に変化し門脈壁に広がって接するとともに肝臓実質内にも ApoE 陽性細胞が認められた。肝細胞スフェロイド移植後 28 日目の Elastica-Masson 染色を含む組織学的評価では、門脈内に存在する肝細胞スフェロイドの表面は新たな内皮細胞で覆われており、さらに門脈の内皮細胞を超えて肝実質内にも ApoE 陽性細胞は存在していた。一方、単離直後単一肝細胞移植後 4 日目の組織学的評価では孤立した ApoE 陽性細胞が肝臓実質内に散見され、移植後 28 日後でも同様の所見であったが、門脈内には ApoE 陽性細胞は認めなかった。肝細胞移植 6 時間後の肝臓内の炎症性サイトカイン(IL-1β, IL-6, TNF-α, MIP-1β, MCP-1)mRNA 発現量は、単離直後単一肝細胞移植群、肝細胞スフェロイド移植群ともに正常肝と比較し有意な上昇を認めたものの、単離直後単一肝細胞移植群、肝細胞スフェロイド移植群の間で統計学的有意差はなかった。

腎皮膜下、及び皮下への移植後 1 ヶ月目の組織学的評価で、肝細胞スフェロイド移植群では ApoE 陽性の肝細胞を腎皮膜下、皮下それぞれの移植部位に認めた一方、単離直後単一肝細胞移植群では移植部位に ApoE 陽性細胞は認められなかった。

【考察】

3 日間培養後の肝細胞スフェロイドはアルブミン産生などの肝臓特異的機能を維持しているとともに、その機能は浮遊状態でも長時間維持されており、肝細胞スフェロイドが肝細胞移植において有用な細胞形態であることが示唆された。肝細胞スフェロイドは 3 次元培養により細胞間シグナル伝達が強化されることで、細胞機能の亢進を認めるという過去の報告と矛盾しない結果であった。移植直前の ApoE mRNA 発現量は肝細胞スフェロイドと比べ単離直後単一肝細胞で高値であるにも関わらず、肝細胞移植後の血清 ApoE 濃度は肝細胞スフェロイ

ド移植群で高い傾向を示した。また、移植後肝臓内の炎症反応は単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイド両移植群で有意差を認めなかった。これらの結果から、単離直後単一肝細胞の生存率は単離直後から低下するため、移植直前にはさらに低下している可能性があること、肝細胞スフェロイドが構造的に強固であり、移植後の自然免疫応答による細胞傷害に対して単離直後単一肝細胞よりも耐性がある可能性があること、肝細胞スフェロイドは生成期では遺伝子の発現が抑制されているとの報告があり、移植後完全な機能回復には時間がかかる可能性があること、などが考えられた。腎皮膜下、皮下への異所性移植の組織学的検討では肝細胞スフェロイド移植群でのみ ApoE 陽性細胞が認められ、肝細胞スフェロイドの肝臓以外への移植への応用も期待できる。

【結論】

肝細胞スフェロイドは現状の肝細胞移植で用いられている single hepatocyte に変わりうる有望な細胞形態である。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ApoE	apolipoprotein E
ApoE KO	apolipoprotein E knockout
Calcein-AM	3',6'-Di(*O*-acetyl)-4',5'-bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
g6p	glucose-6-phosphatase
HBSS	Hank's balanced salt solution
H.E.	hematoxylin and eosin
IBMIR	instant blood mediated inflammatory reaction
IFN-γ	interferon-gamma
IL-1β	interleukin-1β
IL-6	interleukin-6
mRNA	messenger ribonucleic acid
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1β	macrophage inflammatory protein-1β
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
otc	ornithine transcarbamylase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
TMB	3,3',5,5'-tetramethyl-benzidene
TNF-α	tumor necrotic factor-α
UGT1A1	uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1
WME	William's medium E

緒言

本邦の非代償性肝硬変はウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、非アルコール性脂肪肝炎、アルコール性肝障害、代謝性肝疾患などを背景疾患として進行し、本邦の肝不全による死亡者数は年間約 17,000 人に上る(厚生労働省)。栄養療法、肝代替療法などによる治療が行われるが(Tsochatzis et al., 2014)、長期的な予後の改善につながるのは肝臓移植のみである(Ishigami et al., 2008; Merion et al., 2005; Sharma et al., 2009)。

代謝性肝疾患は肝臓で合成される酵素やタンパク質の欠如により、代謝異常が発症する疾患で Criglar-Najjar syndrome、尿素サイクル異常症、ウィルソン病などがある。Criglar-Najjar syndrome は Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)の活性欠損または低下によりグルクロン酸抱合されず胆汁から排泄されなくなった非抱合型ビリルビンが中枢神経系に沈着し核黄疸に至る予後不良な疾患である(Arias et al., 1969)。尿素サイクル異常症では血中のアンモニアを尿素に代謝する尿素サイクルの酵素の異常により高アンモニア血症が引き起こされる。新生児期高アンモニア血症を呈すると、不可逆的な神経障害を引き起こし、予後不良な疾患である。低タンパク食や薬物療法によりアンモニアの低下を図る対症療法が主な治療となるが、治療を生涯続ける必要がある(Matsumoto et al., 2019)。これらの代謝性肝疾患に対しては肝臓移植により欠損した酵素を補うことが最も有効である(Haberle et al., 2012)。しかし、代謝性肝疾患で合成できないタンパク質や酵素の補充に必要な肝細胞の量は全肝細胞の 5-15%と報告されており(Jorns et al., 2012)、高度な侵襲を伴う肝臓移植に変わる、より低侵襲な治療法である肝細胞移植が注目される。

肝細胞移植は 1976 年に Matas らによって Criglar-Najjar syndrome の疾患モデルである Gunn ラットに対して行われ、肝細胞の同種移植によって血漿ビリルビン値の低下が報告された(Matas et al., 1976)。ヒトに対しては 1992 年に Mito らにより報告され、肝硬変患者に対する肝細胞の脾内投与が施行されている(Mito et al., 1992)。現在の臨床肝細胞移植では、単離した肝細胞を経皮経肝的に門脈内に留置したカテーテルを通して肝臓内に移植する(Miki, 2019)。現在、肝細胞の単離および移植(経門脈的投与)の基本技術は確立されており、臨床肝細胞移植の安全性と短期間の有効性はすでに報告されている。(Horslen et al., 2003; Iansante et al., 2018; Jorns et al., 2016)。しかし、短期的な有効性は示されているものの、多くの報告で肝細胞移植の効果は一時的であり、最終的には肝臓移植が必要となる(Allen et al., 2008; Bhogal et al., 2011; Dhawan et al., 2010; Fox et al., 1998; Hughes et al., 2005; Lysy et al., 2008; Meyburg et al., 2009; Puppi et al., 2008; Strom et al., 1997)。そのため肝細胞移植は肝臓移植に至るまでの橋渡しの治療として位置づけられているのが現状である。

このように代謝性肝疾患に対して有用性が期待できる肝細胞移植であるが、いくつかの問題点を有する。一つは肝細胞の単離・培養の技術的問題である。肝臓摘出から単離のための肝灌流開始までの時間が長いほど生存率が低下する傾向があり、灌流までの時間が 3 時間以内で生存率は 50%、5 時間以上かかると生存率は 20%に低下すると報告されている(Bhogal et al., 2011)。その原因として、単離された肝細胞は、非接着環境下ではアポトーシスが誘導されることが報告されている。Francoise らによると、接着培養では 120 分後でも生存率が 90%以上保たれているのに対し、非接着培養では 15 分後からアポトーシスがみられ、生存率は 15 分後で 20%以下、60 分で 10%以下にまで低下する(Francoise N. Smets, 2002)。臨床肝細胞移植では肝臓から単離された肝細胞は、長時間の点滴により経門脈的に肝臓内に移植されるが、その環境下では肝細胞は患者に移植される前に、すでに生存率が低下している可能性が高い。このような肝細胞の単離後の細胞傷害を軽減し、細胞機能を維持する方法として、4 型コラーゲン、マトリゲル、ラミニンなどの細胞外マトリックスを利用することも考慮されるが、臨床肝細胞移植への応用にあっては、他生物由来タンパク質を用いることとなるため、ハードルが高い(Miner and Yurchenco, 2004; Watanabe et al., 2016b)。

二つ目の問題点は移植後の炎症反応による移植細胞の喪失である。その原因は移植後に血管内で起こる instant blood mediated inflammatory reaction (IBMIR)と総称されるドナー抗原非特異的な免疫反応で、移植後早期の肝細胞傷害の主な原因と考えられている(Lee et al., 2016)。単離された肝細胞が門脈内に移植され血液と接触すると、血小板凝集や凝固、補体系の活性化が引き起こされる(Gustafson et al., 2011; William Bennet and Heide Brandhorst, 1999)。さらにこれらの反応が炎症性サイトカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、interleukin-1β (IL-1β)、interleukin-6 (IL-6)、tumor necrotic factor-α (TNF-α)、interferon-gamma (IFN-γ)の産生を促し(Lorenzo Piemonti, 2002; Satoh et al., 2007)、好中球、マクロファージが活性化されるとともに、これらの炎症性サイトカイン自身も直接的に移植細胞に傷害を与える(Kuraya et al., 2013; Watanabe et al., 2016a)。IBMIR を回避する 1 つの方法として、肝細胞を肝臓外に移植する異所性肝細胞移植がある。異所性肝細胞移植では移植細胞と血液との接触を回避するだけでなく、より多くの細胞を移植するスペースの確保が可能になるというメリットも有する。これまでに子宮内膜(Macedo et al., 2018)、腸間膜(Kita et al., 2016)、腎臓被膜下(Ohashi et al., 2005)、皮下(Griffith and Naughton, 2002)への肝細胞移植の報告があるが、移植部位に関係なく生着率は不良であった。

これらの肝細胞移植の問題点を解決するにあたり、我々は肝細胞スフェロイドに着目した。スフェロイド生成は Moscona が胚細胞を(Moscona, 1961)、

Sutherland らが腫瘍細胞を(Sutherland et al., 1971)用いて行ったのが初めで、細胞接着を阻害するハイドロゲル上で培養する超低接着環境(Zhang et al., 2018)、回転する密閉した円筒容器内で培養する回転培養(Mitteregger et al., 1999)、プレートから吊り下がった液滴内で細胞を培養する Hanging drop 法(Mueller et al., 2014)などの特殊な培養条件下で生成できる。スフェロイドの利点は、細胞間相互作用が増強することにより細胞機能が維持されることである。スフェロイドは単層培養条件下の細胞と比較し、より生体内に近い微小環境を有し、細胞間シグナルの強化によるアポトーシスの抑制、血管新生に関連する遺伝子発現の増強が報告されている。(Bhang et al., 2012; Luebke-Wheeler et al., 2009; Mylotte et al., 2008; Napolitano et al., 2007)。これらの特性を有するスフェロイドは薬物代謝研究(Mittler et al., 2017)、癌研究(Rolver et al., 2019; Shigeta et al., 2020)、および組織工学(Baze et al., 2018)で使用されている。

肝細胞スフェロイドは、Landry らによって 1985 年に初めてラット肝細胞を用いた報告がなされ(J. Landry, 1985)、動物モデルを用いた移植の報告もある(Li et al., 2019; Nicolas et al., 2018)。構造的な特徴として、スフェロイドの内部に胆管上皮マーカーである cytokeratin-19 が染色され(J. Landry, 1985)、細胆管構造を認めるとともに、細胞骨格に染まる cytokeratin-18 でも染色され、構造的な強さも裏付けられている(Bhogal et al., 2011)。機能的には単層培養条件下の肝細胞よりも生存率、アルブミン産生能が優れていることや(Park and Song, 2006)、アポトーシスから肝細胞を守るという報告もある(Bhang et al., 2012)。これらの特徴をふまえると、肝細胞スフェロイドは形態的強度に優れるとともに、機能的にも生体内の環境に近い構造特性をもつと考えられ、肝細胞の単離過程における細胞傷害の軽減、移植後免疫反応に対する抵抗性を有することが示唆され、移植肝細胞の生着率の向上、治療効果の改善、長期にわたる治療効果の維持が期待できる可能性がある。

本研究では、肝細胞スフェロイドが現行の single hepatocyte に変わりうる有効な細胞形態かどうかをマウスの肝細胞移植モデルを用いて検討した。

方法

・マウス

雄 C57BL/6J、アポリポプロテイン E 欠損マウス（apo E -/-; B6.129P2-Apoetm1 Unc N11、ApoE knockout マウス: ApoE KO マウス）を実験に使用した。C57BL/6J は日本 SLC から、ApoE KO マウスはチャールズリバー株式会社から 7 週齢のものを購入し北海道大学医歯学研究棟 8 階に搬入、飼育し、実験には 9-14 週齢の個体を用いた。また、本研究における動物実験は「北海道大学動物実験に関する規程」を遵守しながら施行した。

・肝細胞の単離

肝細胞は 3 段階コラゲナーゼ灌流法を用いて行なった(Jorns et al., 2013)。

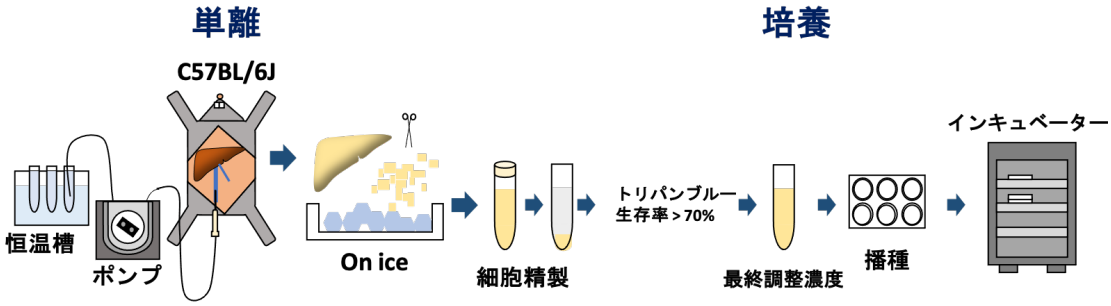


図 1　マウス肝臓の単離・培養過程

マウスをイソフルラン吸入麻酔下に腹部正中切開し腎静脈合流部より尾側の下大静脈に 24 ゲージ針をカニュレーションした後、横隔膜下で下大静脈をクランプ、門脈を切開し I 液：0.5 mmol/L methylene glycol tetraacetic acid 含有、カルシウム、マグネシウム非含有 Hank's balanced salt solution(HBSS)(Thermo Fisher Scientific)で灌流を開始した。次に II 液：25 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)(Thermo Fisher Scientific)含有 HBSS で灌流し、III 液：0.4 mg/mL コラゲナーゼ IV (Worthington Biochemical Corporation)含有 William's medium E (WME)(Sigma-Aldrich) を灌流し単離を行なった。全ての灌流液は 38℃の恒温槽で温めながら灌流を行なった。コラゲナーゼ灌流が完了したら肝臓を摘出し 0℃の WME の中で機械的に粉砕し 100 μm のフィルターを通した後、遠心分離（50G/2 分）を行なった。上清を棄てペレットを溶解し遠心分離をする工程をさらに 2 回、合計 3 回繰り返し、トリパンブルーによる生存率チェックで 70%以上を採用した。単離した肝細胞は培養液：WME (100 nM dexamethasone, 2 mM glutamine, 5 μg/mL insulin, 20 mM HEPES, 0.1 mM gentamicin and 10%ウシ胎仔血清含有)を用いて培養した(図 1)。

・肝細胞スフェロイドの生成

肝細胞スフェロイドの生成は三次元培養プレート(MPc350, クラレ）を用いてHanging drop 法で行なった(Foty, 2011)。3.0 × 10^5 個/mL に調整した肝細胞液を 1 ウェルあたり 4mL ずつ注入し、培養液：WME (100 nM dexamethasone、2 mM glutamine、5 μg/mL insulin, 20 mM HEPES、0.1 mM gentamicin、10% ウシ胎仔血清含有)を用いて 37 度、5% CO_2 下で 3 日間培養した。

・肝細胞の生存率の評価

3',6'-Di(*O*-acetyl)-4',5'-bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester, DMSO solution (Calcein-AM 液, Invitrogen)により単離直後単一肝細胞、単層培養後単一肝細胞、Hanging drop 法で生成した肝細胞スフェロイドを蛍光染色した。1 mM の Calcein-AM 液を phosphate buffered saline (PBS)に 10 μM に希釈した。希釈した Calcein-AM 液を細胞培養液の 1/10 量、細胞培養中のウェル内に注入し 37 度、5% CO_2 で 15 分間培養した。培養後 PBS で培養液を洗浄後、蛍光顕微鏡（KEYENCE）で観察した。

・肝細胞の生細胞数の評価

スフェロイドを構成する全ての細胞の生存率を評価するため、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay を施行した。単離後 0 時間、3 時間、6 時間後 3.0 x 10^5 個/mL の肝細胞液 100 μL を 96 ウェルプレートの 1 ウェルに入れ、12 μL の MTS solution を注入し 37 度 5% CO_2 で 1 時間培養した。培養後吸光度 490 nm でプレートリーダー(Thermo Fisher Science)で測定した。全て 1 サンプルを 3 つに分けて施行した。

・アルブミン、尿素測定

アルブミン、尿素の濃度測定はそれぞれ Serotec TIA-ALBG(セロテック)、Serotec UN-L(セロテック)、Hitachi 7020 automatic biochemical analyzer (Hitachi)を用いて免疫比濁法で測定した。

・肝細胞移植

イソフルラン吸入麻酔下にマウス腹部を正中切開し門脈本幹を露出し、24 ゲージ翼状針を門脈に穿刺留置した上で、肝細胞を経門脈的に肝臓内に移植した。移植細胞量は単離直後単一肝細胞 3.6 × 10^6 個、同数の総細胞量から生成した肝細胞スフェロイドをそれぞれ移植した。経門脈的肝臓内移植後のマウスからは 1

週毎に尾静脈より血液を採取し、遠心分離後血清を－80℃で冷凍保存した。肝臓標本も適宜採取し－80℃で冷凍保存した。また、腎皮膜下、皮下にも同数の単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイドをそれぞれ移植し、1ヶ月後に移植された細胞を組織学的に比較検討した。また、移植後のマウスから採取された血液を用いて、血清 ApoE 濃度を測定した。

・enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

培養液中、血清中の ApoE 濃度は ELISA kit (abcam)を用いて測定した。サンプルを希釈液で 30 倍に希釈し、96 プレートの各ウェルに 50μL 注入し、さらに各ウェルに 50μL の抗体液を注入した。プレートを密封し 1 時間室温で 400 回転/分のプレート遠心機上でインキュベートした。各ウェルを洗浄液で 3 回洗浄し、水滴を除去した後に、各ウェルに 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidene (TMB) substrate を 100μL ずつ注入し 10 分暗室、室温でインキュベートした。反応停止液を各ウェルに 100μL ずつ注入し、ELISA プレートをリーダー(Thermo Fisher Science)にセットし、450 nm で吸光度を測定した。

・定量 polymerase chain reaction (PCR)

培養後単層培養後単一肝細胞、肝細胞スフェロイド、肝細胞移植後の肝臓標本から RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて ribonucleic acid (RNA)を抽出し、それぞれのサンプルの RNA 量が 1 ng/mL になるように調整したのちに complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)を作成した。アルブミン, ornithine transcarbamylase (otc), coagulation, factor VII, coagulation factor IX, glucose-6-phosphate (g6p), ApoE, alpha-1-antitrypsin, IL-1β, IL-6, TNF-α, macrophage inflammatory protein 1β（MIP-1β), MCP-1 を測定しそれぞれ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）と比較した。

・組織学的評価

単離直後単一肝細胞や肝細胞スフェロイド移植後の肝臓は hematoxylin and Eosin（H.E.)、Elastica-Masson によって染色し光学顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE)によって観察した。

・免疫組織学的評価

単離直後単一肝細胞や肝細胞スフェロイド移植後の肝臓はアルブミン(abcam)、ApoE（abcam)、cytokeratin-18（abcam)で染色し光学顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE)によって観察した。

・マウス大量肝切除モデルの作成

C57BL/6J マウスをイソフルラン吸入麻酔下に腹部正中切開し、肝臓の左葉、右内側葉を切除し断端を 4-0 絹糸で結紮した。尾状葉と右外側葉を残して 70%肝切除モデルを作成した。80%肝切除モデルはさらに尾状葉切除を追加した(図２)。術後の生存期間を評価するとともに、急性肝不全モデルとして肝細胞移植に使用した。

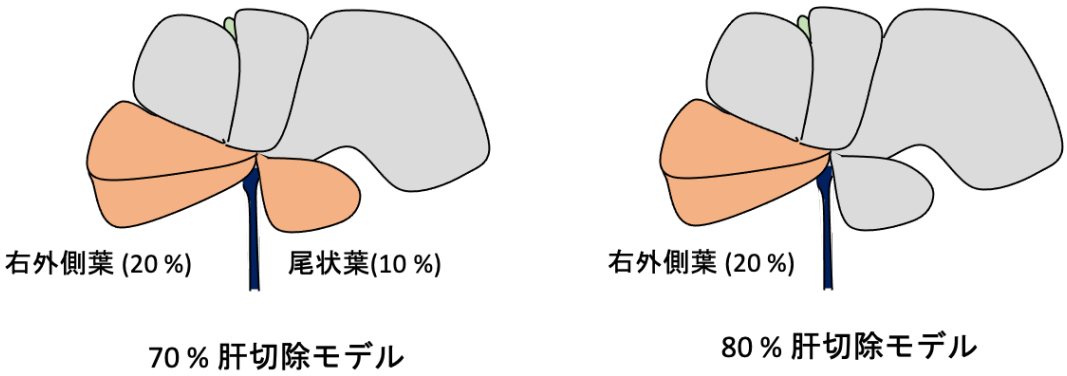


図２　マウス大量肝切除モデル

・統計学的検討

取得したデータはプリズム第 7.0 版（GraphPad Software)で解析した。連続変数は平均値±標準誤差で表し、２群間の比較は paired t-test もしくは t-test で評価し、p 値 < 0.05 を統計学的に有意と判断した。

結果

1. 肝細胞の単離・培養方法の確立

マウス肝細胞の単離・培養の条件確立のため予備実験を試行した。マウス肝臓からの肝細胞単離は 3 段階コラゲナーゼ灌流法で施行し、スフェロイド生成にあたっては超低接着プレート(ultra-low attachment plate)(Corning)を用いて培養した(Berry and Friend, 1969; Jorns et al., 2013)。

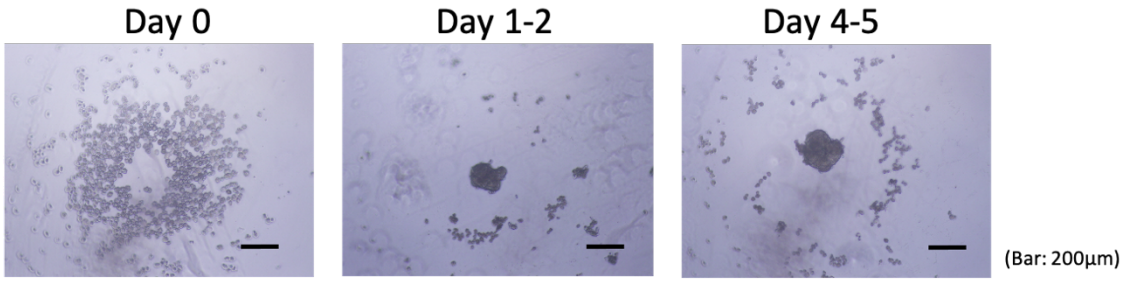


図 3　超低接着プレートを用いた肝細胞スフェロイド培養

超低接着プレートを用いたスフェロイド生成では肝細胞播種後 1-2 日目から細胞の凝集が観察され、4-5 日目には肝細胞スフェロイドを認めた。しかし、肝細胞が凝集しスフェロイドが観察できたのは、初回単離から 12 例目の単離・培養であった。その後も単離・培養を 50 例まで繰り返し施行したがスフェロイドは生成されなかった。

単離培養条件の見直しを行うため、各工程において、実験者側で制御可能な可変因子を抽出しそれぞれ条件検討した。図 4 で示したように、灌流段階ではコラゲナーゼ活性に影響を与える因子を念頭に、マウス年齢・体重、室温、恒温槽の温度、マウス血中酸素濃度、灌流時間、コラゲナーゼ活性が挙げられた。灌流後は、播種までの時間、細胞遠心分離の回数、播種にあたっては細胞液の濃度、プレート遠心の重力・回数、培養液交換の量・回数、コンタミネーションが挙げられた。

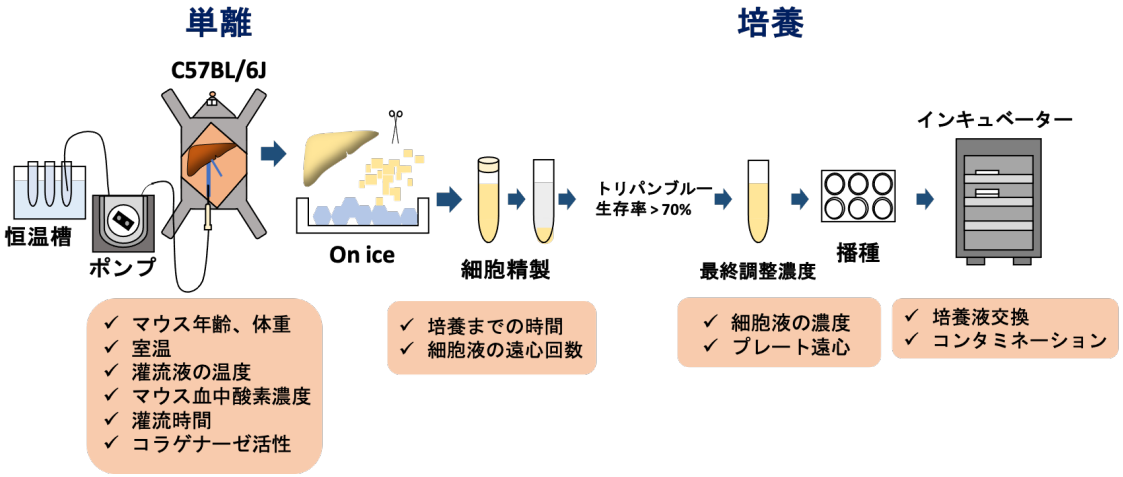


図 4　マウス肝細胞の単離・培養条件の可変因子

以下の条件因子は固定した。マウスの年齢は 9-14 週齢、体重は 28.0g 以下とした。室温は 22.0℃、恒温槽の温度は 38.0℃に設定した。肝臓摘出直前まで良好な血中酸素濃度を保つため、全身麻酔後に酸素吸入を導入した。灌流後から播種までの時間は手技を重ねるうちに約 30 分で完了できるようになった。培養液交換の量は半分交換を播種後 2 日目、4 日目に行うこととした。

細胞遠心分離の回数、プレート遠心の重力・時間、細胞濃度子は条件検討を行なった。細胞遠心分離の回数は 3 回、4 回、5 回で試行した。遠心分離の回数が多ければ、肝細胞の純度は上がるが、収量が減り、細胞の生存率は低下した。回数が少ないと灌流過程で発生した肝細胞以外の細胞や肝皮膜の残骸が増加した。遠心分離 3 回では純度が保て、収量の確保も可能であった(表 1)。

表 1　遠心分離回数と生存率、細胞収量

遠心分離回数	3 回	4 回	5 回
生存率（%）	99	80	50
細胞収量（$\times 10^6$ 個）	7.7	4.4	2.9

プレート遠心条件設定は重力/遠心時間をそれぞれ、100g/2 分、100g/3 分、200g/2 分に設定した。どの条件でも遠心後に肝細胞をウェル中央に集めることができたため、最も細胞への負担が少ない 100g/2 分と設定した(図 5)。

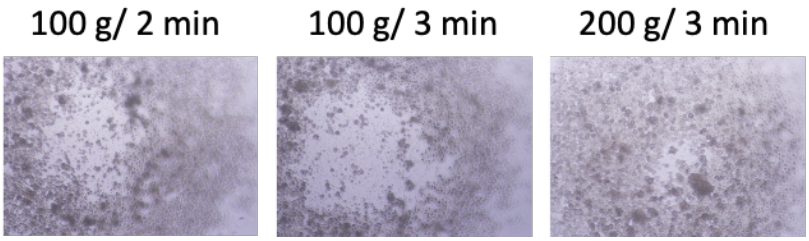


図５　プレート遠心の重力設定/遠心時間と培養前の細胞配置

肝細胞スフェロイドを生成する際の播種する肝細胞濃度は 5,000, 7,500, 15,000, 30,000 個/mL に設定した。細胞濃度を上げれば細胞間距離が小さくなり凝集がしやすくなるが、細胞環境は悪化した。4 条件ともに培養 4 日目に細胞凝集を認めたため、肝細胞濃度を 7,500 個/mL とした（図 6)。

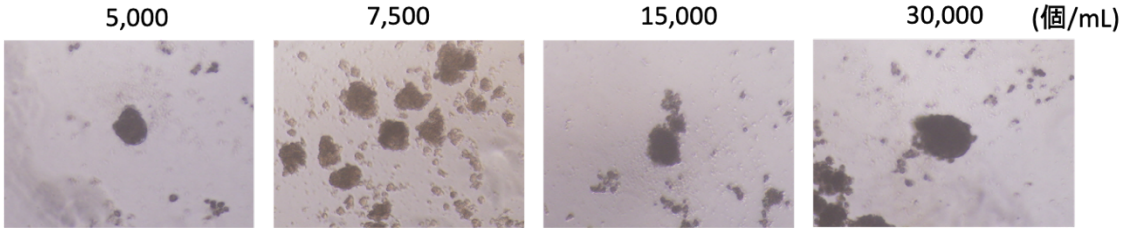


図６　培養細胞濃度と培養４日目の細胞凝集

以上の条件を整えた上で最後に残った条件はコラゲナーゼの活性であった。当初使用していたコラゲナーゼ（sigma）は 527 units/mg であり濃度を 50%に弱めて使用したが、細胞凝集、スフェロイドは認めなかった(図 7)。

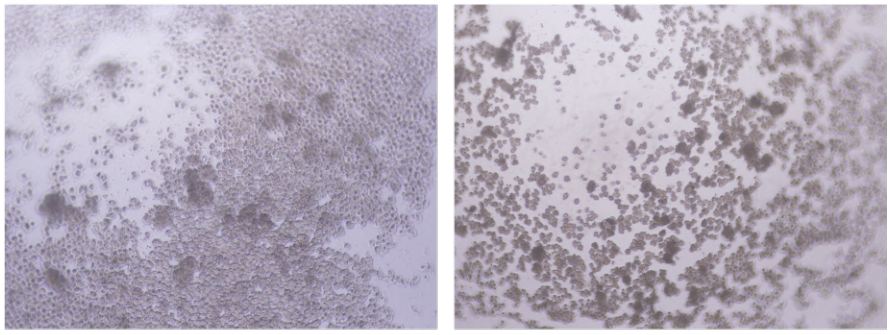


図７　コラゲナーゼ (527 units/mg) 50%濃度での肝細胞単離

次にコラゲナーゼそのものをより力価が低い 240 units/mg のコラゲナーゼ(Worthington)を使用して単離を施行したところ、細胞播種後３日目に安定して

スフェロイドが生成された。スフェロイドの生成期間を 3 日間とし、培養液交換はなしと変更した。(図 8)

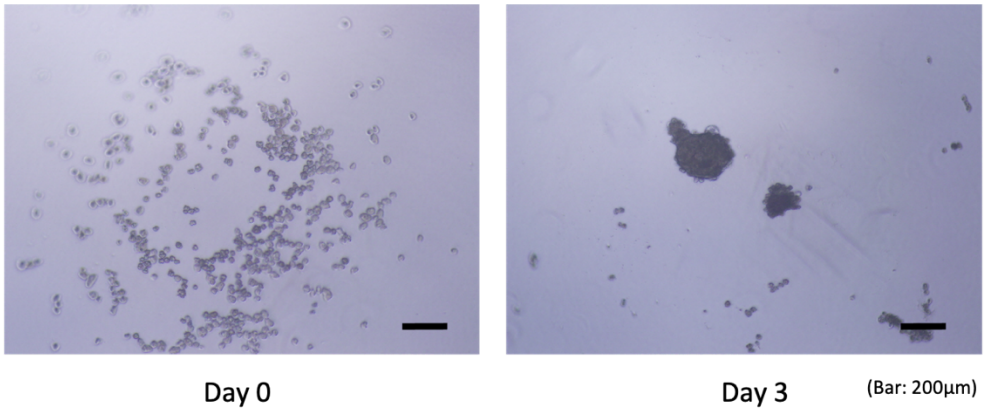


図 8　コラゲナーゼ（240 units/mg）での単離

２．スフェロイド生成方法の確立

超低接着プレートを用いたスフェロイドの生成では、1 個のスフェロイドが 96 ウェルプレートの 1 ウェルに生成される。動物に移植するにあたってスフェロイドを回収しなければならないが、回収作業には 1 プレートあたり約 30 分を要したため、容易に回収できる方法が必要となった。MPc350 を用いた Hanging drop 法では 1 ウェルに 864 個スフェロイドが生成され、アタッチメントに軽い衝撃を与えるだけで、表面張力が失われて全てのスフェロイドが回収することが可能である。MPc350 を用いた Hanging drop 法を行ってみたところ、播種後 3 日目にスフェロイドを確認できた。1 ウェルあたりの回収スフェロイド個数は平均約 780 個であり、回収時間は約 2 分であった（図 9）。

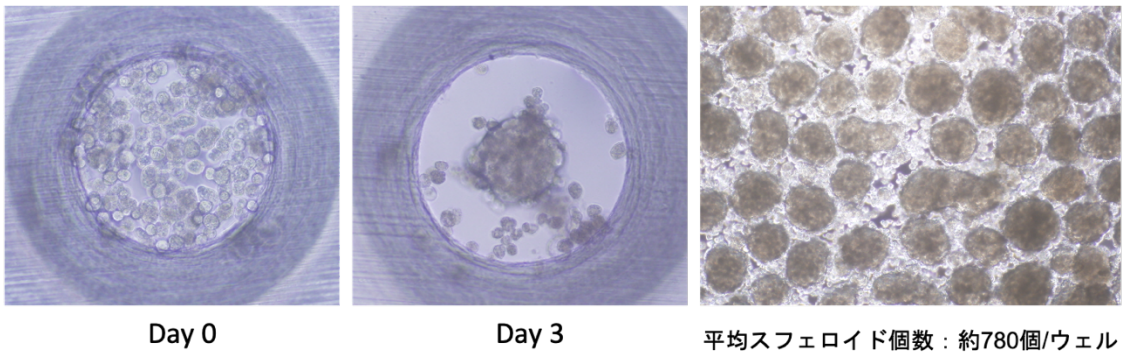


図 9　Hanging drop 法による肝細胞スフェロイドの生成

３．移植に適している肝細胞スフェロイドの大きさの検討

これまでの検討で肝細胞スフェロイドは安定して生成可能となった。次に、移植に最適なスフェロイドの大きさ、生成したスフェロイドの機能を検討した。

Hanging drop 法で生成する肝細胞スフェロイドの大きさは、1 ウェルに入る肝細胞の個数によって変化する。細胞培養濃度を 0.1, 0.15, 0.25, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 × 10^6 個/mL に調整後、Hanging drop 法で培養した(図 10)。0.75 × 10^6 個/mL 以上の濃度で生成したスフェロイドは、大きくなりすぎ肝細胞移植時の門脈穿刺に用いる 24 ゲージ針を通過しなかったため、移植には不適切であった。

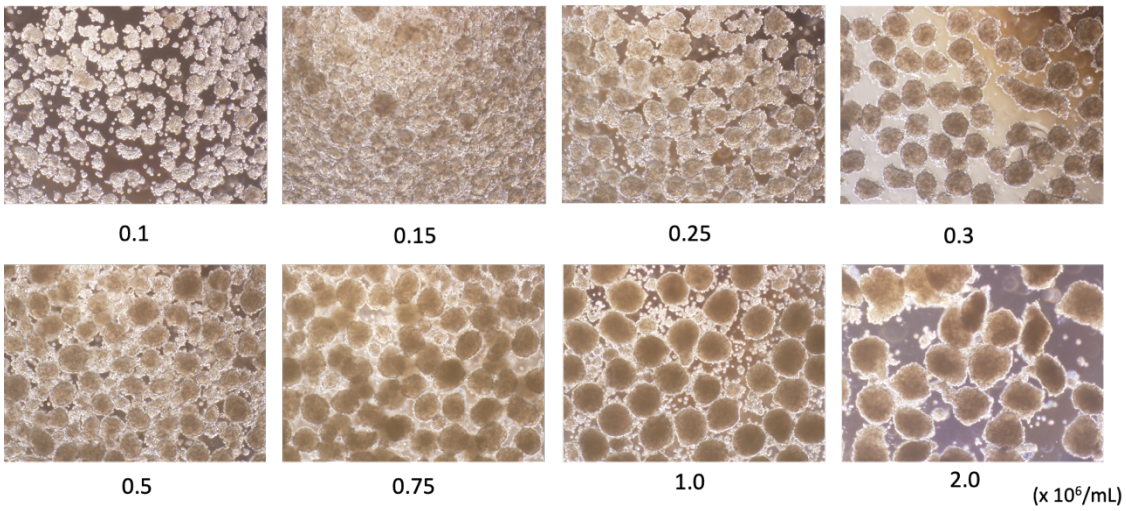


図 10　培養細胞濃度とスフェロイドの大きさ

次に、機能的検討として、3 日間にわたる肝細胞スフェロイド生成過程後の培養液中のアルブミン濃度、スフェロイド内のアルブミン mRNA を測定した。Hanging drop 法での各肝細胞濃度における培養液中のアルブミン濃度は細胞濃度が増加するにつれて増加を示したが、単位肝細胞あたりのアルブミン産生量は 0.15-0.3 × 10^6 個/mL で生成したスフェロイドで高値を示し、これ以上細胞濃度を増加しても、アルブミン産生量は逆に低下した(図 11A,B)。同傾向はアルブミン mRNA 発現量でも認められた。アルブミン mRNA 発現量は 0.3×10^6 個/mL で生成したスフェロイドで最も高値であった(図 11C)。

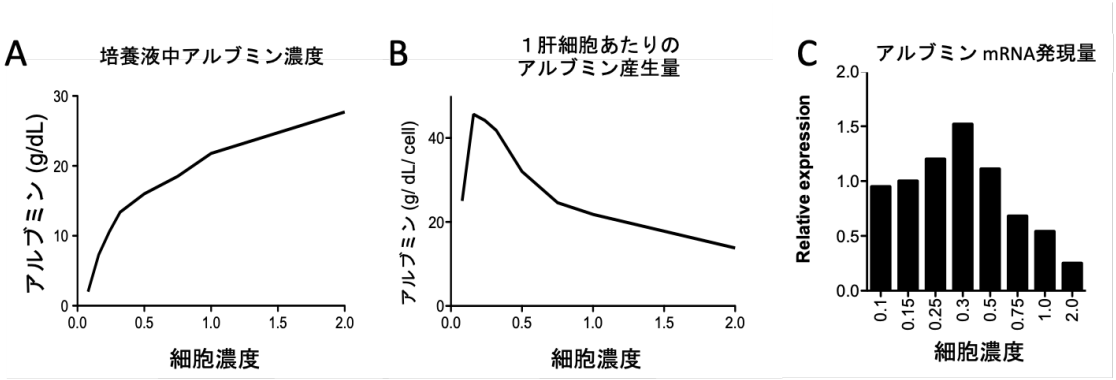


図 11　培養細胞濃度と培養液中アルブミン濃度、アルブミン mRNA 発現量

A：培養液中のアルブミン濃度は培養細胞濃度が大きくなるにつれて、増加した。

B：単位肝細胞あたりのアルブミン産生量は 0.15 - 0.3 × 10^6 個/mL で作成したスフェロイドで高値を示し、それ以上細胞濃度が増えてもアルブミン産生量は増加しなかった。

C：各培養濃度でのスフェロイド内のアルブミン mRNA 発現量は 0.3 × 10^6 個/mL で生成したスフェロイドで最も高値であった。

これらの結果から、肝細胞濃度 0.3 × 10^6 個/mL で生成した肝細胞スフェロイドが最も肝機能が優れていることが示され、今後の実験に使用する肝細胞スフェロイドは肝細胞濃度 0.3 × 10^6 個/mL で生成することとした。

４．Hanging drop 法で生成した肝細胞スフェロイドの解析

４-１．肝細胞スフェロイドの生存率の評価

肝細胞スフェロイドの生存率の評価をするため、細胞形態を維持しつつ、スフェロイドをそのまま染色できる Calcein 蛍光染色を選択し、単離直後単一肝細胞と 3 日間単層培養した単層培養後単一肝細胞と 3 日間 Hanging drop 法で生成した肝細胞スフェロイドを比較した。単層培養後単一肝細胞はわずかに染色されるだけであったが、肝細胞スフェロイドは単離直後単一肝細胞と同様に良く染色され、3 日間の培養後も生存率が保たれていた(図 12)。

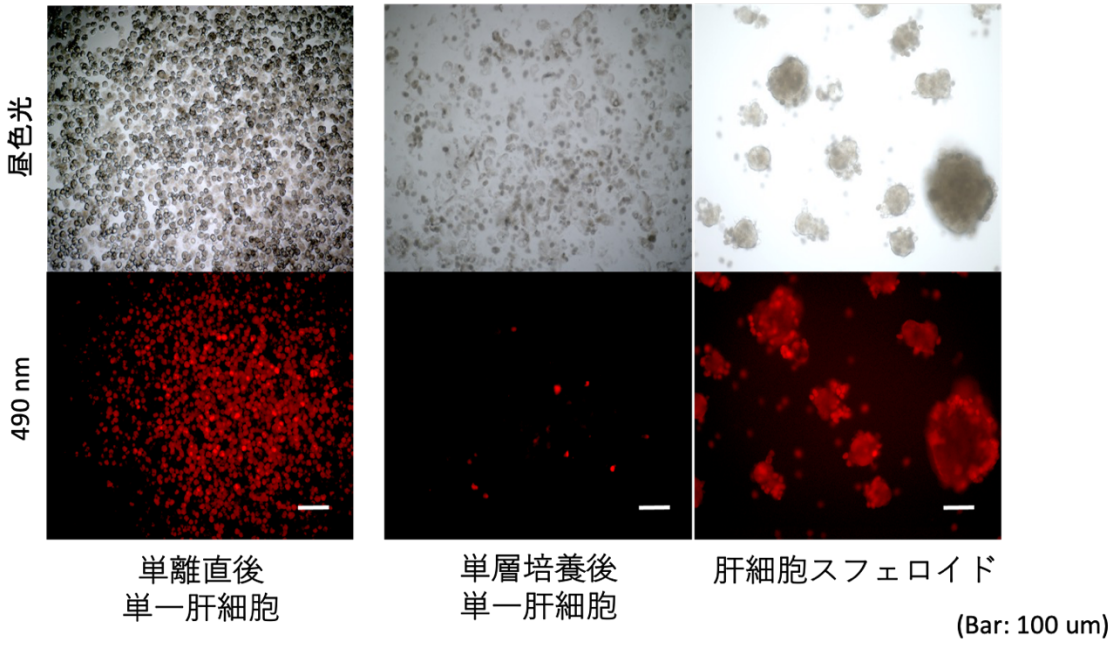
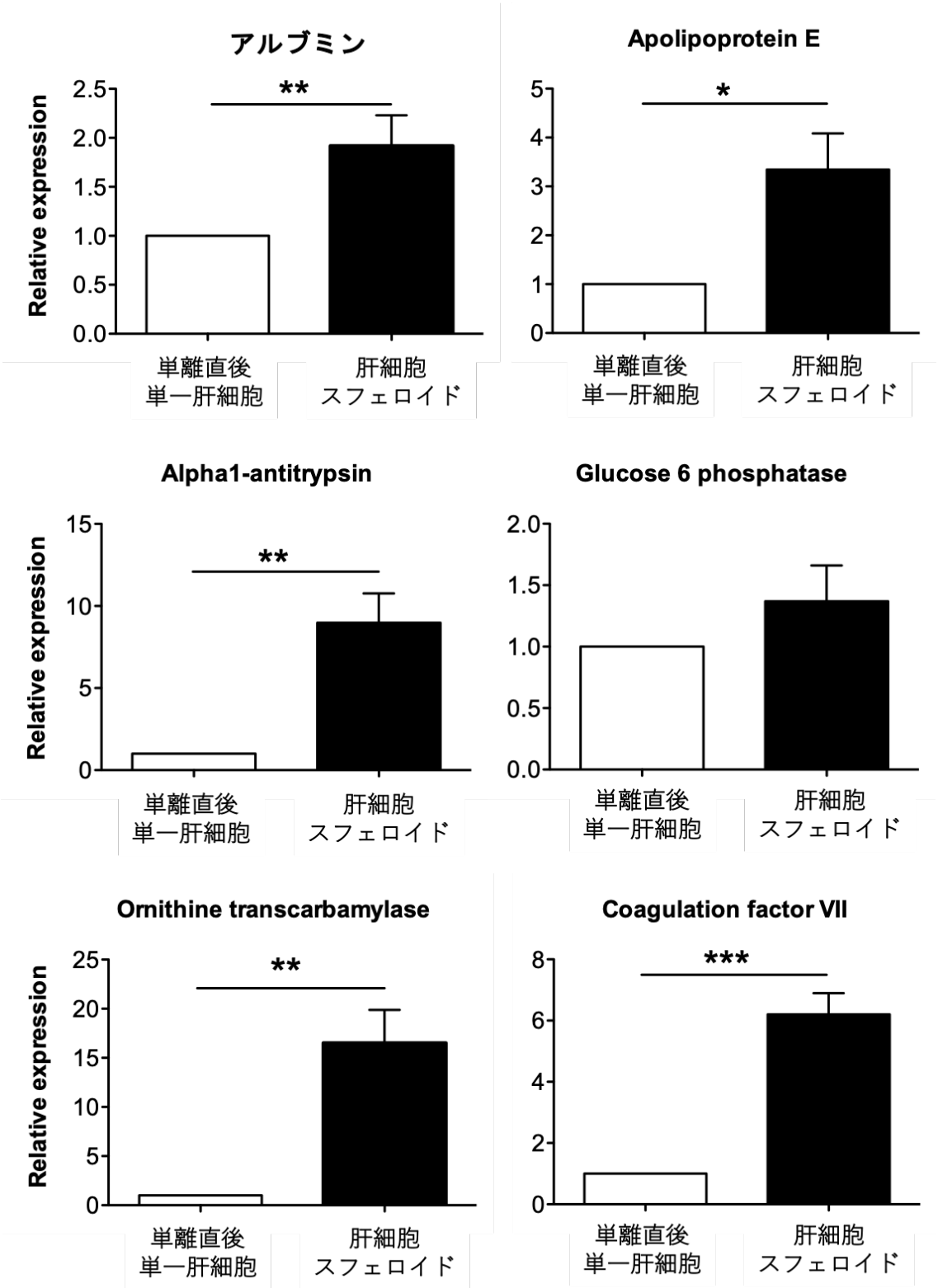


図 12　Calcein 染色による生存率の評価

単層培養後単一肝細胞の染色は弱いが、肝細胞スフェロイドは単離直後単一肝細胞と同様に染色され、生存率が保たれていた。

４-２．肝細胞スフェロイドの肝特異的機能の評価

肝細胞スフェロイドの肝特異的機能の評価をするため、細胞内 mRNA(アルブミン, ApoE, alpha-1-antitrypsin, g6p, otc, coagulation factor VII, coagulation factor IX , low density lipoprotein receptor)を測定し単層培養後単一肝細胞と比較した。肝細胞スフェロイドの mRNA 発現量(アルブミン, ApoE, alpha-1-antitrypsin, otc, coagulation factor VII, coagulation factor IX ,low density lipoprotein receptor)は単層培養後単一肝細胞と比べて有意に高値であり、g6p の発現量は有意差はないものの単層培養後単一肝細胞より肝細胞スフェロイドで高値であった(図 13)。


アルブミン
Relative expression
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
単離直後
単一肝細胞
肝細胞
スフェロイド
Apolipoprotein E
5
4
3
2
1
0
*
単離直後
単一肝細胞
肝細胞
スフェロイド
Alpha1-antitrypsin
Relative expression
15
10
5
0
**
単離直後
単一肝細胞
肝細胞
スフェロイド
Glucose 6 phosphatase
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
単離直後
単一肝細胞
肝細胞
スフェロイド
Ornithine transcarbamylase
Relative expression
25
20
15
10
5
0
**
単離直後
単一肝細胞
肝細胞
スフェロイド
Coagulation factor VII
8
6
4
2
0
***
単離直後
単一肝細胞
肝細胞
スフェロイド

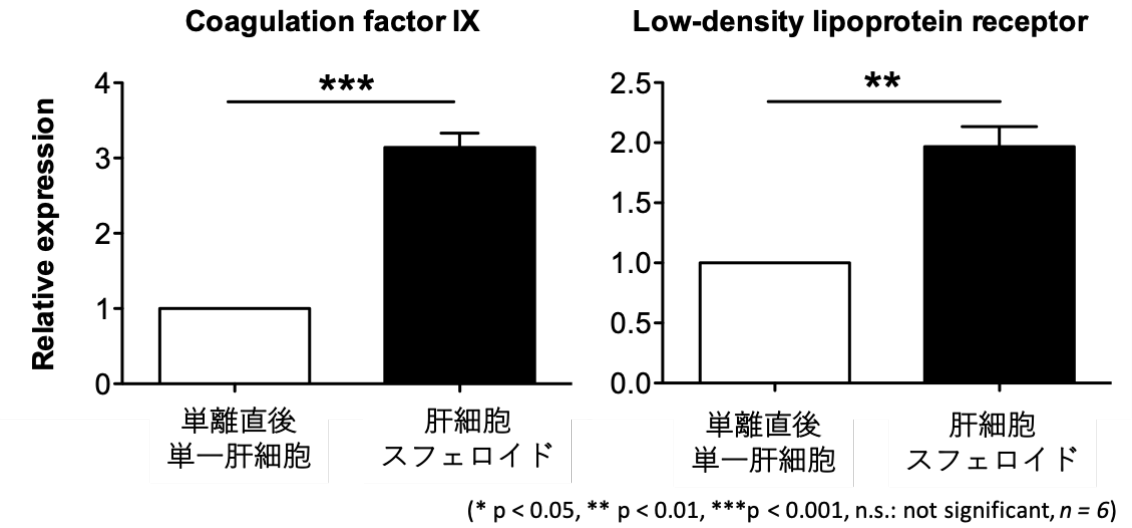


図 13　肝細胞スフェロイドと単層培養後単一肝細胞の肝特異的 mRNA の発現量の比較

肝細胞スフェロイドの肝特異的 mRNA の発現量（アルブミン（1.91 ± 0.76, p = 0.032)、ApoE (3.34 ± 1.81, p = 0.025)、alpha-1-antitrypsin (8.97 ± 4.39, p = 0.006)、otc(16.5 ± 8.28, p = 0.005)、coagulation factor VII(6.20 ± 1.68, p = 0.0006)、coagulation factor IX (3.14 ± 0.46, p < 0.0001)、low density lipoprotein receptor (1.96 ± 0.41, p = 0.002)）は単層培養後単一肝細胞より有意に高値であった。

さらに、実際に肝細胞中で合成されているタンパク質量を評価するため、培養上清中のアルブミン、尿素、ApoE 各濃度を測定し、肝細胞スフェロイドと単層培養後単一肝細胞を比較した。上清中のアルブミン、尿素は有意に肝細胞スフェロイドで高値であり、ApoE も有意差はないものの、肝細胞スフェロイドで高値であった（図 14)。

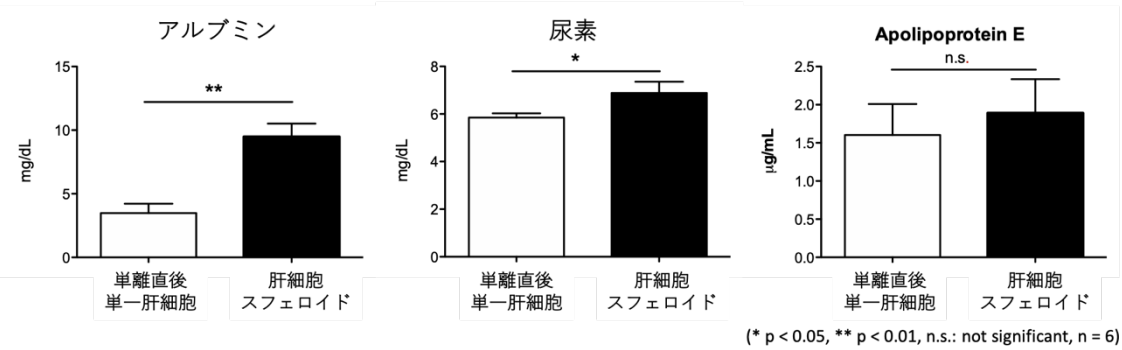


図 14　肝細胞スフェロイドと単層培養後単一肝細胞の培養上清中のアルブミン、尿素、Apolipoprotein E 濃度の比較

アルブミン濃度は単層培養後単一肝細胞（3.5 ± 1.8 μg/dL）と比べて肝細胞スフェロイド（9.5 ± 2.5 μg/dL, $p = 0.006$)で有意に高値であり、尿素濃度も単層培養後単一肝細胞で 5.9 ± 0.43 μg/dL、肝細胞スフェロイドで 6.9 ± 1.22 μg/dL、$p = 0.022$ であり有意に肝細胞スフェロイドで高値であった。ApoE 濃度は 2 群間に有意差はなかった(単層培養後単一肝細胞 : 1.60 ± 0.99 μg/mL, 肝細胞スフェロイド: 1.89 ± 1.09 μg/mL, $p = 0.455$)。

4-3．肝細胞スフェロイドの組織学的評価

肝細胞スフェロイドを H.E.、アルブミン、ApoE、cytokeratin-18 でそれぞれ染色し、組織学的評価を行なった。H.E.染色ではスフェロイドを構成する肝細胞 1 つ 1 つが細胞構造を保持していることが確認できた(図 15A)。細胞質はアルブミン、ApoE で染色され、細胞内でアルブミン、ApoE が合成されていることが確認された(図 15B, C)。cytokeratin-18 はスフェロイドを構成する細胞間に染色され、スフェロイド全体として構造的に強固であることが示唆された(図 15D)。

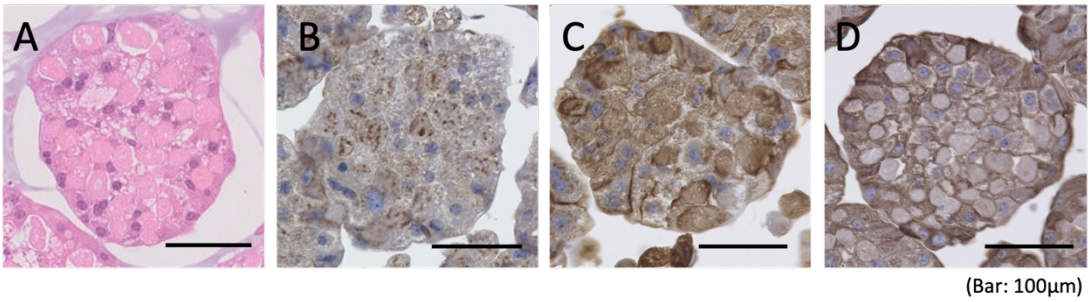


図 15　肝細胞スフェロイドの組織学的評価

A：H.E.染色、B：アルブミン蛍光染色、C：ApoE 蛍光染色、D：cytokeratin-18 蛍光染色

4-4．単離直後単一肝細胞と肝細胞スフェロイドの生存率、細胞機能の経時的評価

これまでの結果より、肝細胞スフェロイドは肝特異的機能を維持していることが示され、肝細胞移植に応用できると判断した。移植への応用にあたり、生成後の肝細胞スフェロイドの生存率、細胞機能の経時的変化を評価するとともに、臨床肝細胞移植で使用されている単離直後単一肝細胞と比較した。肝細胞スフェロイドは生成過程終了後、2mL のチューブに培養液とともに回収し、常温で静置した。単離直後の単離直後単一肝細胞も 2 mL のチューブに培養液とともに回収し、常温で静置した。それぞれ、静置直後、静置 3 時間後、静置 6 時間後に生存率、アルブミン mRNA 発現量を測定した。肝細胞スフェロイドの生存率、アルブミン mRNA 発現量は回収直後から静置 6 時間後までほぼ変わらず維持さ

れていた(図 16A, B)。このことから、肝細胞スフェロイドの生存率や細胞機能は生成過程終了後から移植までの間も保持されることが示され、肝細胞移植への応用が期待できた。

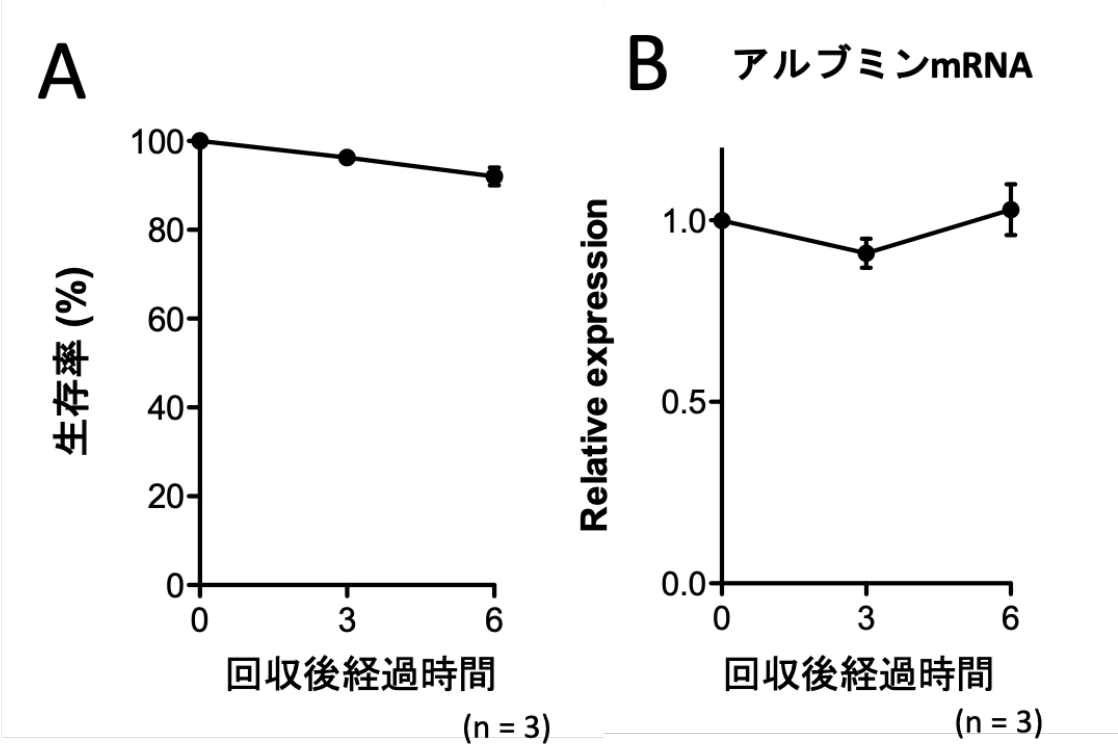
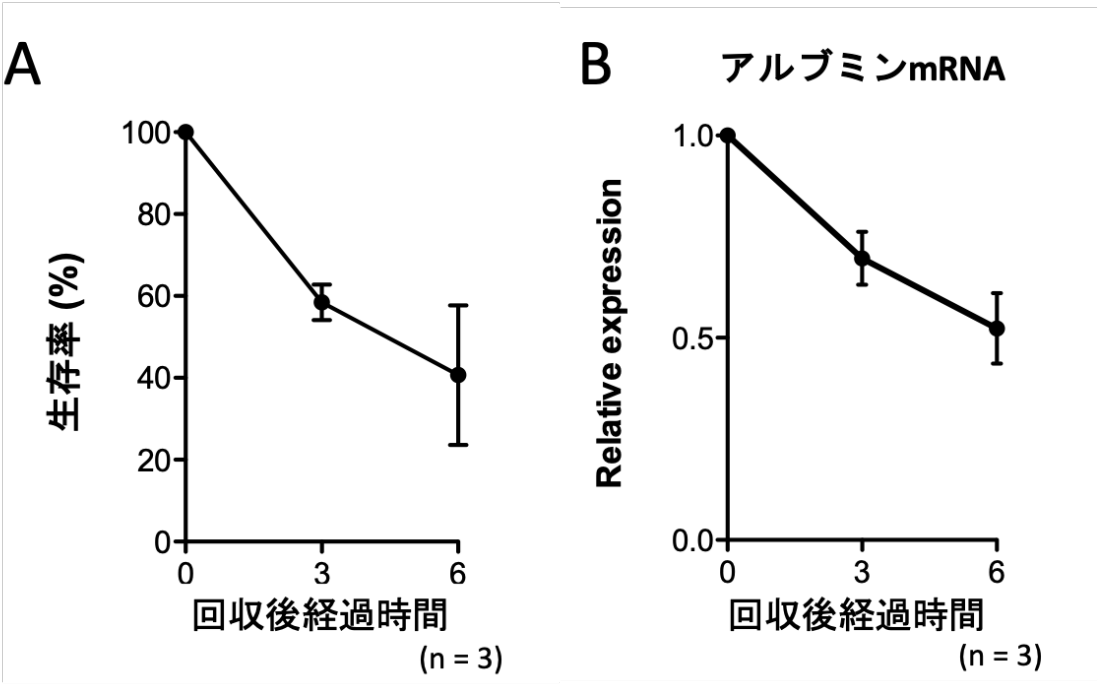


図 16　肝細胞スフェロイドの生存率、アルブミン mRNA の経時的変化
A：生存率は生成 3 時間後 96.3 ± 1.8%、生成 6 時間後 92.0 ± 2.8%と維持されていた。
B：アルブミン mRNA は生成後 3 時間 0.91 ± 0.0、生成後 6 時間 1.03 ± 0.09 と維持されていた。

単離直後の単離直後単一肝細胞の生存率、アルブミン mRNA 発現量は、単離後から 3 時間後、6 時間後と経時的に低下し、単離から移植されるまでの時間で単離直後単一肝細胞の機能は失われていると考えられ、単離直後単一肝細胞の問題点が明らかになった(図 17A, B)。

図 17　単離直後単一肝細胞の生存率、アルブミン mRNA の経時的変化
A：生存率は単離 3 時間後 58.4 ± 4.3%、単離 6 時間後 40.1 ± 17.0%と経時的に低下していた。
B：アルブミン mRNA は単離後 3 時間 0.69 ± 0.06、単離後 6 時間 0.52 ± 0.09 と経時的に低下していた。



5．Apolipoprotein E KO マウスを用いた肝細胞スフェロイド移植モデルの解析

これまでの結果から、我々が生成した肝細胞スフェロイドは移植に応用できると判断し、マウスへの移植を行なった。移植には野生型雄 C57BL/6J マウス肝細胞から細胞濃度 0.3×10^6 個/mL で生成した肝細胞スフェロイドを使用し、雄 ApoE KO マウスに経門脈的に肝臓内に移植した。移植細胞量は Hanging drop 法で使用した MPc350(クラレ) 6 ウェル中の 3 ウェル分が移植可能量の限界であったため、3 ウェル分（3.6×10^6 個)とし、単離直後単一肝細胞も同量の細胞数（3.6×10^6 個)を同様の方法で移植し比較した。移植動物として選択した ApoE KO マウスは ApoE 遺伝子の欠損により ApoE が肝臓で合成されないため、高脂血症を発症し長期的には動脈硬化を引き起こす代謝性肝疾患モデルである。本実験では野生型マウスの肝細胞を移植するため、移植細胞の機能評価を血清 ApoE 濃度測定、ApoE 染色による組織学的評価で可能となる。

5 - 1．肝細胞移植後肝臓の組織学的評価

マウス肝細胞移植モデルの手技的安定性を検証するため、肝細胞移植後のマウスの肝臓を組織学的に評価した。この検討では野生型マウスを使用した。肝細胞スフェロイド移植後 24 時間の肝臓の組織学的評価では、門脈内に肝細胞スフェロイドが確認でき、肝細胞スフェロイド移植が経門脈的に肝臓内に移植可能であり、移植直後にはその細胞形態が保たれていることを確認した(図 18)。

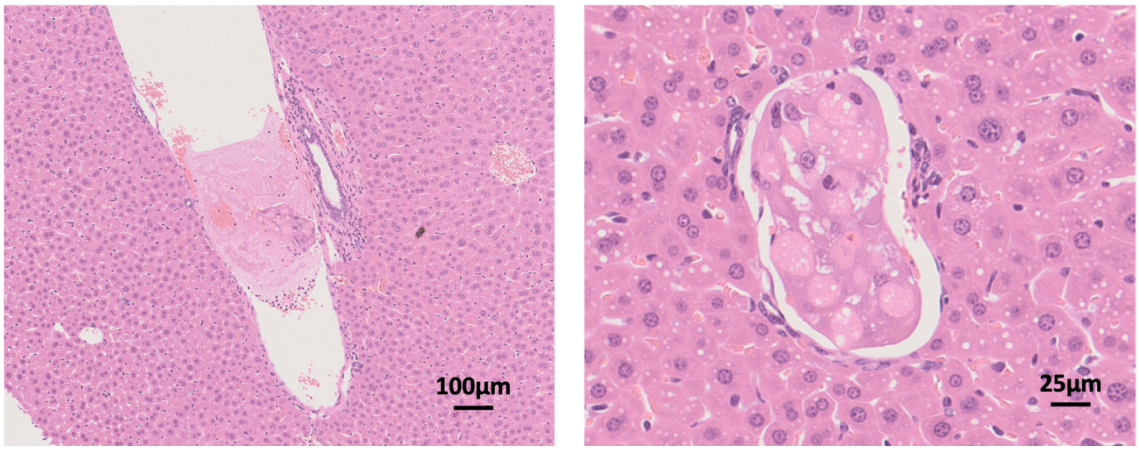


図 18　経門脈的肝細胞スフェロイド移植後 24 時間の肝臓の組織学的評価
門脈内に肝細胞スフェロイドが確認された。

経門脈的肝細胞スフェロイド移植が技術的に可能であることが確認されたため、代謝性肝疾患モデルである ApoE KO マウスへの移植を施行し、肝臓の組織学的評価を行なった。

肝細胞スフェロイド、もしくは単離直後単一肝細胞を同様の方法で経門脈的に肝臓内に移植した。肝細胞スフェロイド移植後 4 日目では、門脈内に ApoE 陽性細胞塊が確認された(図 19A)。移植後 7 日目には ApoE 陽性細胞塊は平坦な形状に変化し門脈内壁に張り付くように存在しており、さらに ApoE 陽性細胞は肝実質内にも確認された(図 19B)。移植後 28 日目でも、ApoE 陽性細胞が確認された(図 19C)。

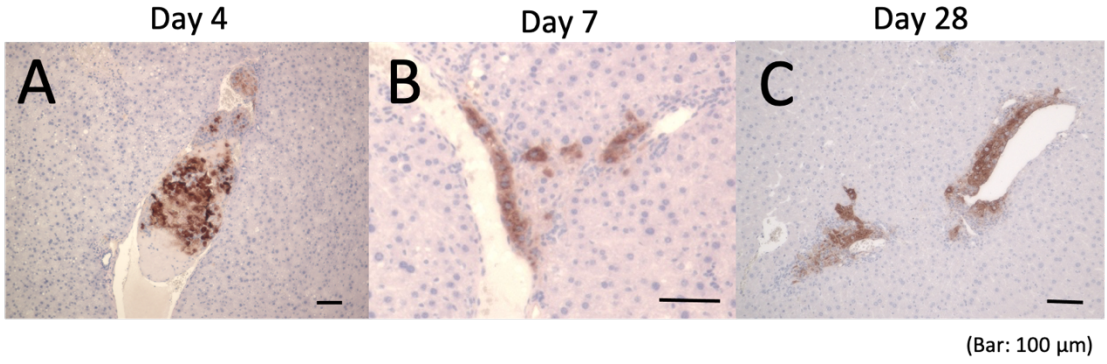


図 19　経門脈的肝細胞スフェロイド移植後４、７、２８日目の肝臓の ApoE 染色による組織学的評価
A：移植後 4 日目、B：移植後 7 日目、C：移植後 28 日目

さらに移植後 28 日目の肝組織を Elastica-Masson 染色し、移植された ApoE 陽性細胞について組織学的に詳細な検討を行なった。門脈域の H.E.染色(図 20A)、Elastica-Masson 染色(図 20B)、ApoE 染色(図 20C)を比較した。ApoE で染色される平坦に変形した肝細胞スフェロイドは、Elastica-Masson で黒色に染色された門脈内皮の弾性繊維の門脈内腔側に存在していた。さらに、肝細胞スフェロイドの表面も Elastica-Masson で黒色に染色され、門脈内皮が覆っていると考えられた(図 20B)。ApoE 染色では門脈内皮を超えて ApoE 陽性細胞が肝実質内に存在していることが示された(図 20C)。

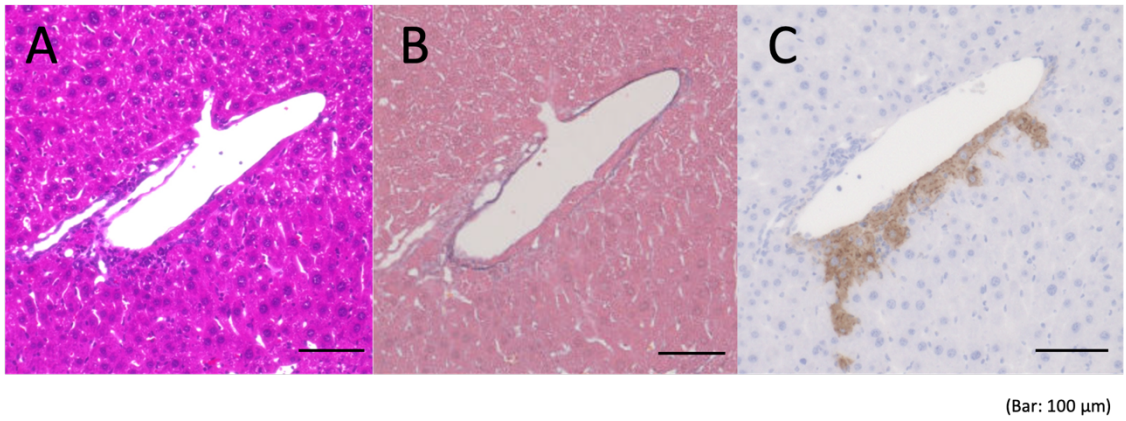


図 20　肝細胞スフェロイド移植後 28 日目の H.E.染色、Elastica-Masson 染色、ApoE 染色の比較による組織学的評価
A: H.E.染色、B：Elastica-Masson 染色、C：ApoE 染色

一方、単離直後単一肝細胞移植後の組織学的評価では、移植後 4 日目に ApoE 陽性細胞が肝実質内に孤立性に散見されたが、門脈内には認めなかった(図 21A)。この所見は移植後 7 日目、28 日目でも同様であった(図 21B, C)。

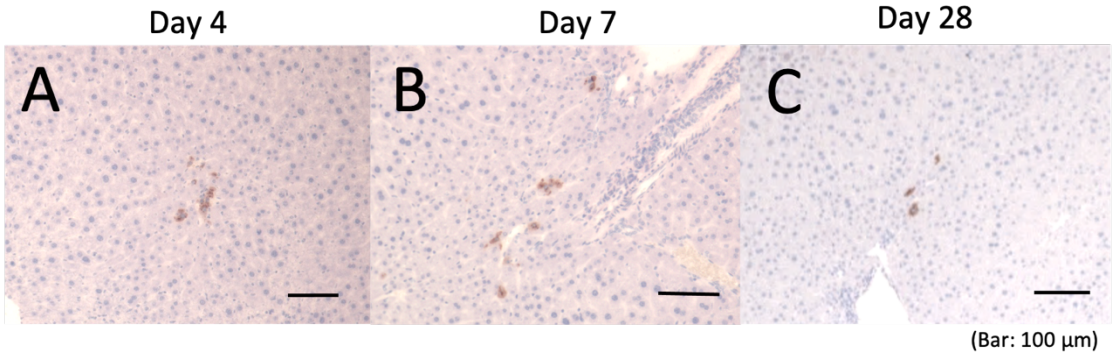


図 21　経門脈的単離直後単一肝細胞移植後 4、7、28 日目の肝臓の ApoE 染色による組織学的評価
A：移植後 4 日目、B：移植後 7 日目、C：移植後 28 日目

5-2．マウス肝細胞移植後の移植細胞の機能評価

組織学的評価から、移植後の移植細胞が肝臓内に存在していることが示された。次に、移植細胞の機能評価として血清 ApoE 濃度を測定した。移植後 1 週目、2 週目、4 週目に採取された血清を用いて ApoE 濃度を測定し、肝細胞スフェロイド移植群と単離直後単一肝細胞移植群の比較を行なった。また、移植直前の肝細胞スフェロイド、単離直後単一肝細胞の ApoE mRNA の発現量を測定し、移植後の血清 ApoE 濃度と比較した。

移植直前の単離直後単一肝細胞の ApoE mRNA の発現量は肝細胞スフェロイドと比較して有意に高値であった(図 22A)。肝細胞移植後の血清 ApoE は、単離直後単一肝細胞移植群、肝細胞スフェロイド移植群、両群とも術後 4 週目でも検出され、移植された細胞が機能していることが示された。両群を比較すると、有意差はないものの肝細胞スフェロイド移植群で高値であった(図 22B)。この結果から、肝細胞スフェロイドは経門脈的な肝臓内への肝細胞移植において、機能的に単離直後単一肝細胞に劣らない細胞形態であることが示された。

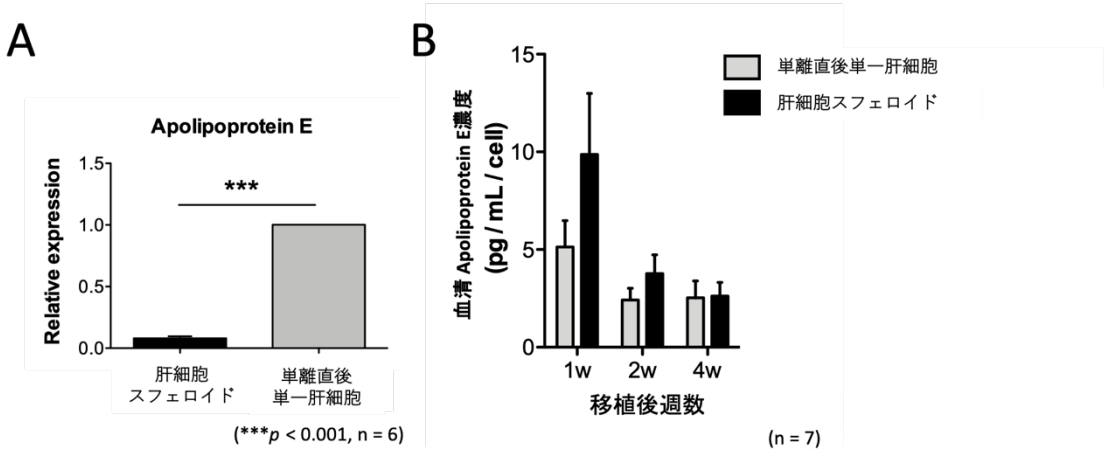


図 22　移植直前、移植後の移植細胞（単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイド)の機能評価

A：移植直前の単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイドの細胞内 ApoE mRNA の発現量の比較

B:肝細胞移植後の経時的な血清 ApoE 濃度(単離直後単一肝細胞移植群 1w: 33.4 ± 13.0 ng/mL, 2 w: 13.1 ± 8.0 ng/mL, 4w: 13.7 ± 9.6 ng/mL, 肝細胞スフェロイド移植群 1w: 63.1 ± 56.7 ng/mL, 2w: 24.1 ± 16.5 ng/mL, 4w: 17.0 ± 10.9 ng/mL)

5-3．肝細胞移植後炎症反応の評価

これまでの解析で移植された細胞が肝臓内に生着することが組織学的、機能的に示された。移植細胞の生着には移植後早期の移植細胞の喪失(early graft loss)が問題となるが、この early graft loss の原因と考えられているのが移植後生体内

で起こる炎症反応である。さらなる移植細胞の生着率の上昇、移植後の細胞機能の維持による治療効果の長期化を目指すには、炎症反応を軽減する戦略が必要である。肝細胞移植後の肝臓内の炎症反応を評価した。

単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイド移植後の 6 時間後の肝臓を摘出し肝臓内の炎症性サイトカイン（IL-6, IL-1β, TNF-α, MCP-1, MIP-1β）の発現量を測定し正常肝と比較した。単離直後単一肝細胞移植群、肝細胞スフェロイド移植群の移植後の炎症性サイトカインは正常肝と比較して有意に上昇を認めたが、単離直後単一肝細胞移植群、肝細胞スフェロイド移植群との間では有意差は認めなかった(図 23)。

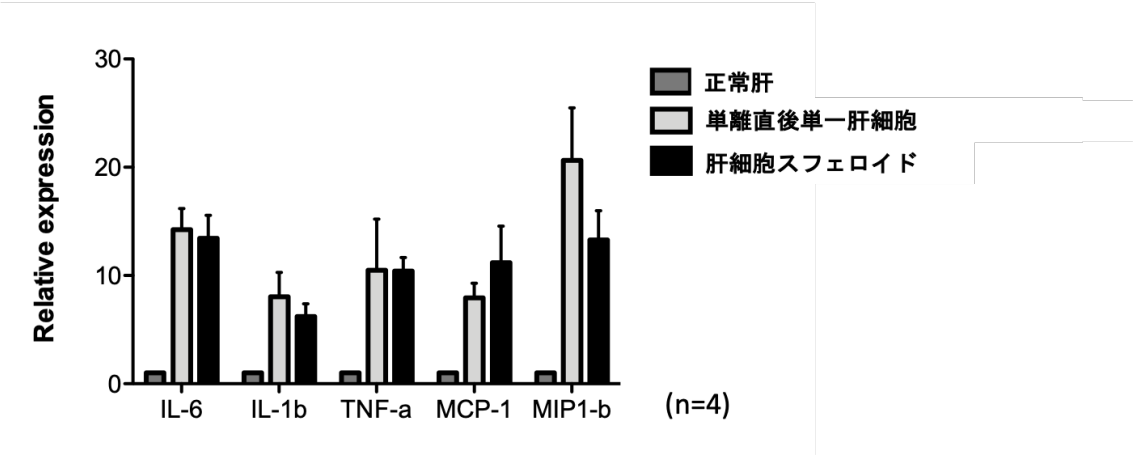


図 23　移植 6 時間後の肝臓内の炎症性サイトカイン発現

細胞移植 6 時間後の炎症性サイトカイン（IL-6、IL-1β、TNF-α、MCP-1、MIP-1β）発現は正常肝より有意な上昇を認めたが、単離直後単一肝細胞移植群、肝細胞スフェロイド移植群の間では有意差は認めなかった。

5-4．肝細胞スフェロイドの腎皮膜下、皮下への異所性肝細胞移植

血管内で起こる移植後の炎症反応は血管内に細胞を移植することで惹起される。この反応を回避する方法として、肝細胞スフェロイドの腎皮膜下や皮下への異所性肝細胞移植への応用の可能性を検討した。また、経門脈的な肝臓内への移植では移植可能な細胞量に限界があるが、腎皮膜下、皮下移植では移植可能な空間を広く確保することができ、より多くの細胞を移植することが可能であるという利点も考慮した。

3.6×10^6 個の単離直後単一肝細胞と同数から生成した肝細胞スフェロイドを ApoE KO マウスの腎皮膜下に移植し、移植後 1 ヶ月の腎臓を摘出し組織学的に検討した。肝細胞スフェロイド移植後の腎皮膜下には ApoE 陽性の肝細胞が確認され、腎皮膜下への移植細胞の生着を確認できた(図 24A, B)。一方、単離直後単一肝細胞移植後の腎皮膜下には肝細胞、ApoE 陽性細胞は認めなかった(図 24C, D)。このことから、肝細胞スフェロイドは単離直後単一肝細胞に比べて腎皮膜下での生着が良好であり、肝臓外での生存も可能であることが示された。

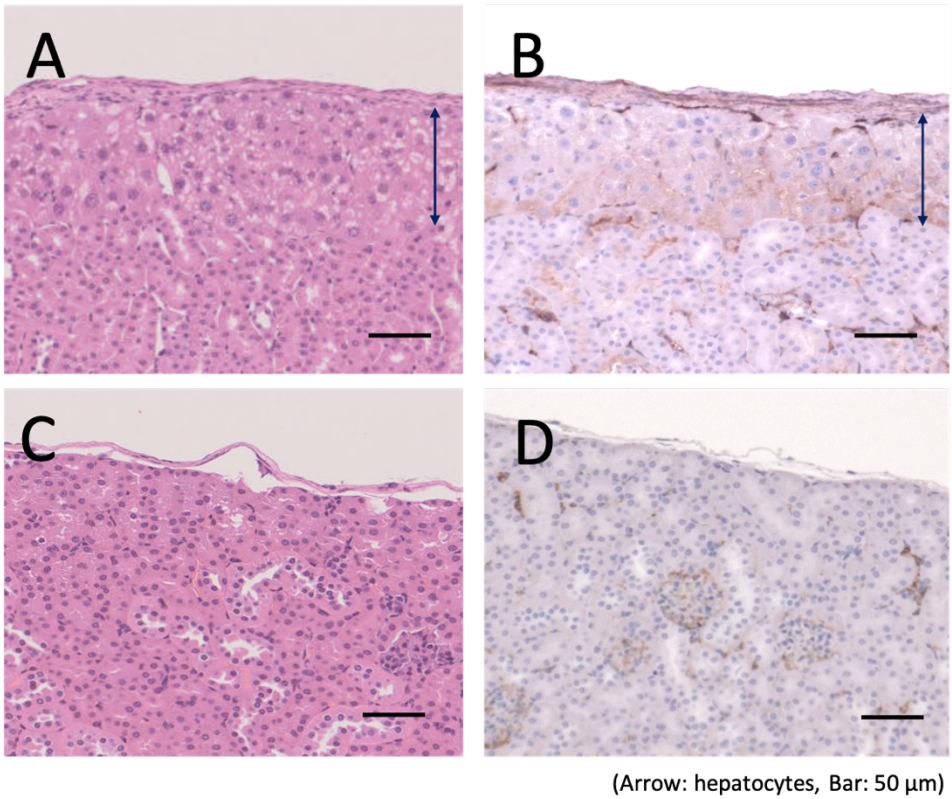


図 24　肝細胞スフェロイド、単離直後単一肝細胞の腎皮膜下移植 1 ヶ月後の組織学的評価

A：肝細胞スフェロイド移植後 H.E.染色、B：肝細胞スフェロイド移植後 ApoE 染色、C：単離直後単一肝細胞移植後 H.E.染色、D：単離直後単一肝細胞移植後 ApoE 染色、矢印：肝細胞
肝細胞スフェロイド移植１ヶ月後の腎皮膜下には ApoE 陽性肝細胞を認めたが(A、B)、単離直後単一肝細胞移植１ヶ月後の腎皮膜下に肝細胞は認めなかった(C、D)。

皮下への移植も同様に施行した。3.6×10^6 個の単離直後単一肝細胞と同数から生成した肝細胞スフェロイドを ApoE KO マウスの皮下に移植し、移植 1 ヶ月後に組織学的に検討した。肝細胞スフェロイド移植後の皮下には H.E.染色で肝細胞を認め、それらは ApoE で染色された(図 25A, B）。一方、単離直後単一肝細胞移植後の皮下には ApoE 陽性細胞は認めなかった(図 25C, D)。また、両群ともに移植 1 ヶ月後の血清 ApoE は検出されなかった。

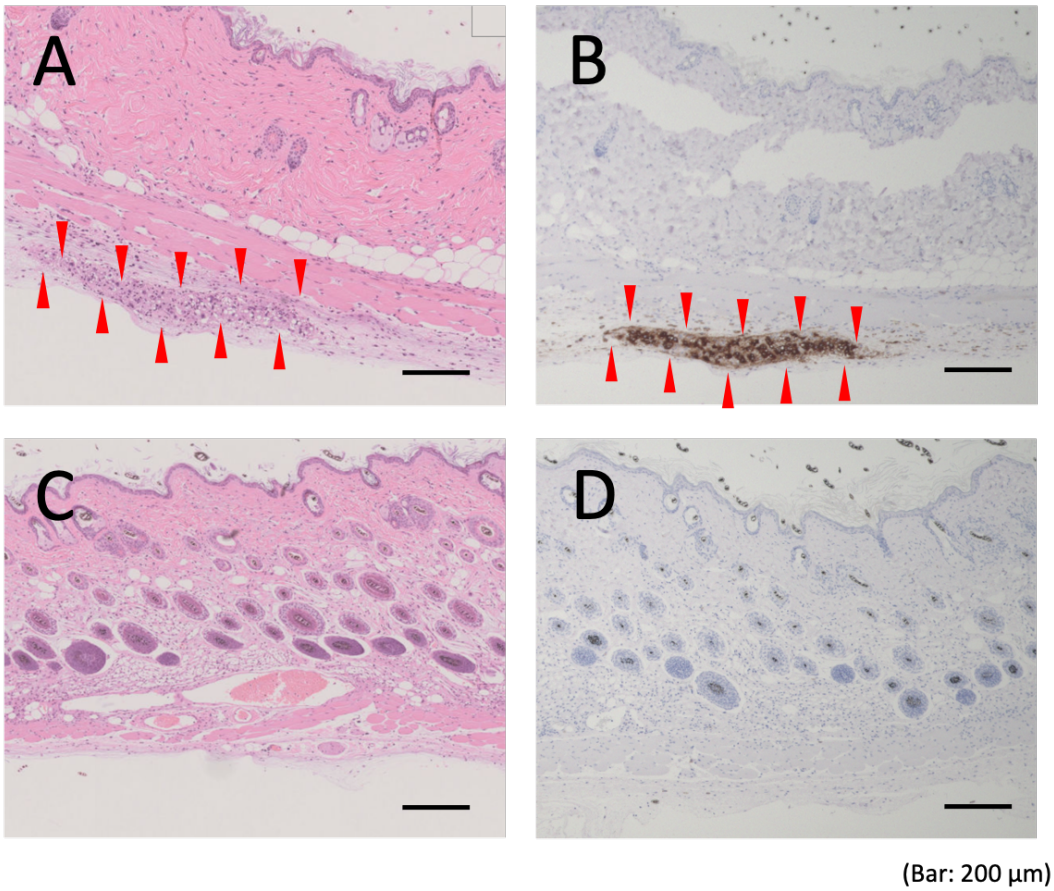


図 25　肝細胞スフェロイド、単離直後単一肝細胞の皮下移植 1 ヶ月後の組織学的評価

A：肝細胞スフェロイド移植後 H.E.染色、B： 肝細胞スフェロイド移植後 ApoE 染色、C：単離直後単一肝細胞移植後 H.E.染色、D：単離直後単一肝細胞移植後 ApoE 染色、矢頭：肝細胞
肝細胞スフェロイド移植１ヶ月後の皮下には ApoE 陽性肝細胞を認めたが(A、B)、単離直後単一肝細胞移植１ヶ月後の皮下に肝細胞は認めなかった(C、D)。

6．急性肝不全に対する肝細胞スフェロイドの有用性の評価

代謝性肝疾患である ApoE KO マウスを用いた肝細胞スフェロイド移植では、移植細胞の生着を確認でき、肝細胞スフェロイドが代謝性肝疾患に対する肝細胞移植において有用である可能性が示された。次に急性肝不全に対する肝細胞スフェロイドの有用性を示すため、マウス大量肝切除モデルを作成し、急性肝不全に対する肝細胞移植の有用性を検討した。

6-1．肝切除モデルの作成

70%肝切除モデルの生存率は術後 24 時間で約 50%になり長期的には 14 個体中 3 個体(21%)が生存した。生存曲線から肝切除後 12 時間時点で治療介入点があると判断し、急性肝不全モデルとして使用した(図 26)。80%肝切除モデルマウスでは術後 12 時間以内に全てのマウスが死亡(4 個体)しモデルとして不適切と判断した。

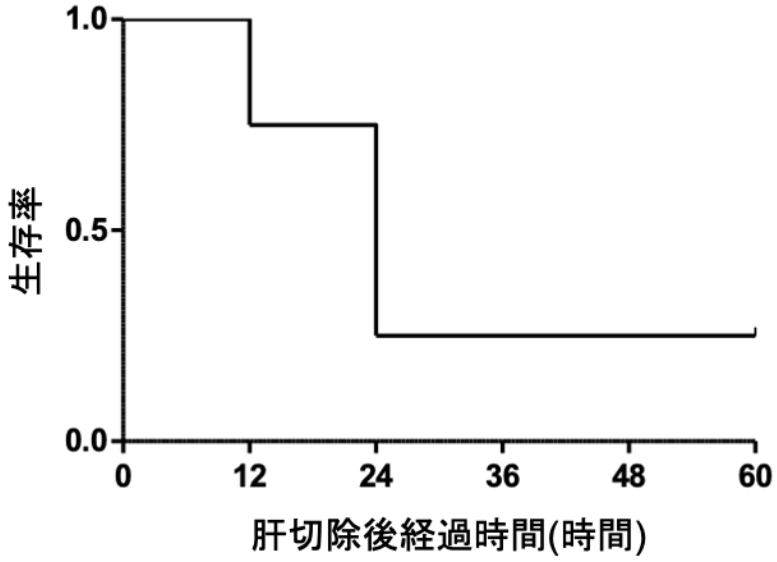


図 26　マウス 70%肝切除後の予後

6-2．70%肝切除モデルマウスを用いた肝細胞移植

70%肝切除モデルマウスを用いて肝切除後 12 時間時点で経門脈的に肝細胞移植を行なった。8 個体に単離直後単一肝細胞を 1.0×10^{6} 個/10 μL 門脈内に注入したが、全ての個体で注入後即死した。急性肝不全モデルとしての肝切除モデルは細胞移植にあたり移植床が減少するために細胞移植が困難となり、不適切であることがわかった。

考察

肝細胞の単離、培養の歴史は古く(Berry and Friend, 1969)、基本的な単離方法、培養方法は確立されているものの、文献には詳細な記述がなされていないこともあり、安定した肝細胞の単離、培養の確立にはある程度の修練が必要である。本実験では肝細胞スフェロイドの移植への応用を検討するにあたり、まず安定したマウス肝細胞の単離、培養方法、および肝細胞スフェロイドの生成法の確立を目指すこととした。肝細胞の単離では、単離直後の生存率はほぼ 100%であり、単離が成功したように見えても、培養してみるとスフェロイドが生成されないこともあるため、単離・培養過程における問題点を明らかにして実験プロトコルを改定していけなければならない。本研究では単離 50 回中、1 回のみでしかスフェロイドの生成に成功しなかったため、単離、培養中の問題点を抽出しそれぞれ解決していった。結果で示したように、単離、培養過程において実験者側が制御可能な可変因子を列挙し、細胞へのダメージが最小となるように整え、安定してスフェロイドを生成することが可能となった。問題点を明らかにし 1 つ 1 つ解決していくことで今回の単離、培養、スフェロイド生成のプロトコルを確立できた。

Hanging drop 法で作成可能になったスフェロイドは 3 次元環境により細胞 1 つ 1 つが広く、強固な接着をしているため、細胞間シグナルが強化され(Chitcholtan et al., 2013; Pontes Soares et al., 2012)、単層培養された細胞とは対照的に、高い生存率、細胞機能が維持され、タンパク質合成が増加する(Kurano et al., 2011; Lauschke et al., 2019)。これらの報告と同様に本実験でも肝細胞スフェロイドの mRNA 発現量（アルブミン, ApoE, otc, g6p, alpha-1-antitrypsin, coagulation factor VII, coagulation factor IX , low density lipoprotein receptor）、アルブミン、尿素産生量は単層培養後単一肝細胞と比べて有意に高値であり、我々が生成した肝細胞スフェロイドが良好に機能しているとともに、単層培養下の単層培養後単一肝細胞と比べて優れていること、その機能が生成後も維持されることを示した。本研究における肝細胞スフェロイドの otc、alpha-1-antitrypsin、凝固因子の mRNA の増強は、尿素サイクル異常症(Horslen et al., 2003)、α 1 アンチトリプシン欠損症(Torres-Duran et al., 2018)、ヘモフィリア(Tatsumi et al., 2008)などの代謝性肝疾患に対して、欠損している酵素、タンパク質を補うことができることを示唆しており、肝細胞スフェロイドの臨床肝細胞移植への応用の可能性が示された。

肝細胞移植の効果は移植肝細胞の生着率に依存するが、門脈内移植後に起こる血小板の凝集、補体・凝固系の活性化と、それらに引き続いて起こる自然免疫反応は細胞移植の生着率に大きく関わっている(Kuraya et al., 2013; Watanabe et al., 2016a)。この IBMIR と呼ばれる生体反応は肝細胞移植においても報告され

ており、移植後早期の移植細胞の喪失に深く関わっている(Gustafson et al., 2011)。本実験では肝細胞移植後、肝臓内での炎症性サイトカイン（IL-6, IL-1β, TNF-α, MCP-1, MIP-1β)の発現量の増加を認め、移植後に強い炎症反応が惹起されていることが確認され、生着率の向上にはこれらIBMIRを制御する必要性が示された。一方で、単離直後単一肝細胞移植群と肝細胞スフェロイド移植群の移植後の炎症反応は有意差を認めなかったが、炎症反応が同程度であるならば、炎症を受ける側である移植細胞の耐性が問題となるが、移植後肝臓の組織学的評価では、単離直後単一肝細胞は移植後門脈内に移植細胞が確認されず、免疫反応によって排除されたと考えられたこととは対照的に、肝細胞スフェロイドは移植後門脈内に長期にわたってその存在を確認でき、さらに門脈内腔側は内皮細胞に覆われていた。これは炎症期を乗り越えた肝細胞スフェロイドが長期生着するための過程であると推察される。移植細胞が門脈内を広く覆うと、その部分は内皮が欠損するため、血中の血小板が活性化され、内皮細胞の誘導、補充が行われる。これにより移植細胞が血管内の炎症反応に曝されなくなり、さらに、同種異型移植におけるドナー特異的免疫反応を回避できる可能性もある。肝細胞スフェロイド移植後の組織学的評価の結果・考察から、肝細胞スフェロイドは移植後早期の自然免疫反応に対して耐性を有する可能性が考えられ、肝細胞スフェロイドの移植片としての形態そのものが生着率の向上に有用である可能性が示唆される。IBMIRに対する他の治療法の併用としては、抗凝固薬の併用(Jorns et al., 2013)やマクロファージの除去(Andres et al., 2005)、NF-κBの抑制(Kuraya et al., 2013)、内因性修飾受容体の活用(Watanabe et al., 2016a)などの動物実験レベルの報告があり肝細胞スフェロイド移植においても、これらの治療法を併用することで、さらなる移植成績の向上が期待できる。

単離直後単一肝細胞移植後や肝細胞スフェロイド移植後に肝実質内に確認されたApoE陽性細胞は、門脈内から類洞を通って実質内に入り込んだと考えられる。門脈内に移植された細胞は類洞にトラップされ(Rajvanshi et al., 1996; Slehria et al., 2002)、生着に至るには門脈内皮細胞を超えて肝実質内に移動する必要がある(Sanjeev Gupta, 1999)が、門脈内皮細胞は移植された細胞が類洞から実質内に入るにあたり強力なバリアになっている(Malhi et al., 2002)ため、門脈内皮細胞を超え易くするための方法が必要である。血管拡張薬や(Slehria et al., 2002)、門脈内皮に傷害を与えるシクロフォスファミド(Malhi et al., 2002)、放射線療法(Yamanouchi et al., 2009)も、肝細胞移植後の初期段階での肝実質内への移植細胞の生着を促進する方法として報告されており、このような技術も肝細胞スフェロイド移植で併用できる可能性がある。

本実験において移植直前の単離直後単一肝細胞は肝細胞スフェロイドと比べて著明に優れた肝細胞機能を有していたにも関わらず、肝細胞移植後の血清

ApoE 濃度は単離直後単一肝細胞移植群と肝細胞スフェロイド移植群の 2 群間で有意差はなく、むしろ肝細胞スフェロイド移植群で高い傾向が示された。この移植前後の単離直後単一肝細胞、肝細胞スフェロイドの機能の違いはいくつかの仮説で説明できる。一つはスフェロイドは生成初期に一部の遺伝子が抑制され、数日後に回復するという報告があり、移植前に抑制されていた細胞機能が移植後に回復したことで ApoE 産生が増加し血中濃度が上昇した可能性がある(Oliva-Vilarnau et al., 2020)。二つめは、図 16、17 で示したように、単離された単離直後単一肝細胞の生存率や細胞機能は単離直後から急速に減少するため、移植時にはすでに細胞機能が低下している可能性がある(Elaut et al., 2006)。また、前項で述べたように、移植された細胞は宿主免疫による移植早期の細胞傷害を生き残り、実質内に入り込まなければならない。組織学的に示したように、肝細胞スフェロイドは細胞骨格である cytokeratin-18 が陽性であり(Török et al., 2011)構造的な強さが示唆され、少なくとも中心部はクッパー細胞や巨核球などの攻撃に対して耐性を有し、より多くの肝細胞の生着に寄与している可能性がある。

肝細胞スフェロイド移植は臨床的にもメリットを有する。一つ目は、スフェロイド生成中に細胞機能や生存率を測定することができ、単離段階で傷害された細胞を排除できる。単離直後単一肝細胞の場合、単離直後に真の質を見極めるのは困難である(Knobeloch et al., 2012)。二つ目は本実験でも示したように肝細胞スフェロイドの生存率や細胞機能は生成後も保たれることである。肝細胞移植にあたり、単離した単離直後単一肝細胞や生成した肝細胞スフェロイドは実験室からベッドサイドまで運搬する必要があり、さらに移植中の時間にも細胞が失われていく。この工程でも、肝細胞スフェロイドは単離直後単一肝細胞と比べて細胞喪失量が少ないと考えられる。三つ目はドナー発生から肝細胞の単離、スフェロイドの生成という工程に要する時間は、レシピエント選択や移植準備の時間として有効に使える可能性がある。

肝細胞移植モデルに使用した ApoE KO マウスは、代謝性肝疾患のモデルとして使用したが、急性肝不全モデルとして大量肝切除モデルは有用である(Cataldegirmen et al., 2005; Myronovych et al., 2008)。急性肝不全のモデルモデルとしては生存率が低いこと、かつ、死亡例でも治療介入の期間があるモデルが適している。これにより、治療介入ができ、生存率の向上が期待できる疾患モデルを作成することができる。本実験での 80%肝切除モデルでは死亡率が 100%となり治療介入期間もなかったためモデルとして不適切であったが、70%肝切除モデルでは生存率約 20%であり、生存曲線をみると肝切除後 12 時間付近から急激に生存率が下がるため、肝切除 12 時間後までに治療介入する必要があると判断した。しかし、実際に細胞移植すると全例死亡という結果であった。肝切

除後のため移植床が減少していることから、移植細胞量が減ってしまうこと、また、門脈圧が上がりやすくなり門脈が破綻し下大静脈に細胞が一気に流れ込むことによって起こる急性心不全が原因と考えられた。他の肝不全モデルとしては薬剤性肝不全モデルがある(Milosavljevic et al., 2017; Tan et al., 2013)。このモデルでは肝臓の量を減らすことなく肝不全を誘導することができるため、移植床は確保することができる。しかし、肝臓に起こる炎症、線維化によって門脈圧亢進状態になるため移植手技は困難が予想されること、治療効果の判定を何にするかなど条件設定の問題はあるが、急性肝不全モデルに対する肝細胞スフェロイド移植の治療効果を評価できる可能性がある。

我々は本研究において、肝細胞スフェロイドが現行の肝細胞移植に用いられている単離直後単一肝細胞に変わりうる有望な移植片形態であり、肝細胞移植に応用可能であることを示した。さらなる生着率の向上、治療効果の長期化を検証するためには、他の技術の併用や大動物を用いた肝細胞移植モデルでの検証が必要である。

結論

１. 本研究から得られた知見

・Hanging drop 法で生成した肝細胞スフェロイドは肝細胞特有の機能を維持していた。

・肝細胞スフェロイドはマウスに経門脈的に肝臓内へ移植された後も、その機能を維持し、その成績は単離直後単一肝細胞移植に劣らないものであった。

・腎皮膜下、皮下への異所性移植において、肝細胞スフェロイドは単離直後単一肝細胞と比べて長期間生着した。

２.本研究で得られた知見の意義

肝細胞スフェロイドは肝細胞移植において移植細胞生着の向上が期待できる単一肝細胞に代わりうる有望な移植片形態である。

３.本研究で得られた知見からどのような研究が展開されうるか

本研究は、細胞移植において従来行われてきた単一細胞の移植ではなく、細胞塊の移植の可能性を示した研究である。近年急速に研究が進んでいる多能性幹細胞から作られる人工臓器やオルガノイドは、今のところ生体内に戻す有効な方法がない。本研究は、これらの優れた機能を持つ人工臓器を生体内に戻すにあたっての基礎的研究になりうる。

４.今後の課題

本研究は肝細胞スフェロイドの臨床応用に向けての基礎的な実験にとどまっている。今後は同種異型移植モデルや大動物を用いた生着率、移植後免疫反応、移植細胞機能の評価が必要である。

謝　辞

この場を借りて、指導的な立場で本研究の遂行に多大なる貢献をしていただいた、消化器外科学教室Ⅰ　武冨　紹信　教授および北海道大学病院移植外科　渡辺　正明　特任講師に感謝を申し上げます。

また、本研究において実験動物の繁殖、維持管理をして頂いた動物実験施設の土佐　紀子先生および職員の方々、実験において技術的な補助をしてくださった消化器外科学教室の皆様に感謝を申し上げます。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費(17K10501)の助成を受け行われたものです。

利　益　相　反

本研究に開示すべき利益相反状態はない

引用文献

Allen, K.J., Mifsud, N.A., Williamson, R., Bertolino, P., and Hardikar, W. (2008). Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. Liver Transpl. *14*, 688-694.

Andres, A., Toso, C., Morel, P., Bosco, D., Bucher, P., Oberholzer, J., Mathe, Z., Mai, G., Wekerle, T., Berney, T.*, et al.* (2005). Phylogenetic disparity influences the predominance of direct over indirect pathway of antigen presentation in islet xenotransplantation. Transplant Proc. *37*, 463-465.

Arias, I.M., Gartner, L.M., Cohen, M., Ezzer, J.B., and Levi, A.J. (1969). Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. Am J Med. *47*, 395-409.

Baze, A., Parmentier, C., Hendriks, D.F.G., Hurrell, T., Heyd, B., Bachellier, P., Schuster, C., Ingelman-Sundberg, M., and Richert, L. (2018). Three-Dimensional Spheroid Primary Human Hepatocytes in Monoculture and Coculture with Nonparenchymal Cells. Tissue Eng Part C Methods. *24*, 534-545.

Berry, M.N., and Friend, D.S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J Cell Biol. *43*, 506-520.

Bhang, S.H., Lee, S., Shin, J.Y., Lee, T.J., and Kim, B.S. (2012). Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. Tissue Eng. Part A *18*, 2138-2147.

Bhogal, R.H., Hodson, J., Bartlett, D.C., Weston, C.J., Curbishley, S.M., Haughton, E., Williams, K.T., Reynolds, G.M., Newsome, P.N., Adams, D.H.*, et al.* (2011). Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. PLoS One *6*, e18222.

Cataldegirmen, G., Zeng, S., Feirt, N., Ippagunta, N., Dun, H., Qu, W., Lu, Y., Rong, L.L., Hofmann, M.A., Kislinger, T.*, et al.* (2005). RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF-alpha and NF-kappaB. J Exp Med. *201*, 473-484.

Chitcholtan, K., Asselin, E., Parent, S., Sykes, P.H., and Evans, J.J. (2013). Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. Exp Cell Res. *319*, 75-87.

Dhawan, A., Puppi, J., Hughes, R.D., and Mitry, R.R. (2010). Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. *7*, 288-298.
Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2006). Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. Curr Drug Metab. *7*, 629-660.
Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. J Vis Exp.
Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V., and Strom, S.C. (1998). Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. N Engl J Med. *338*, 1422-1426.
Francoise N. Smets, Y.C., Ling-Jia Wang, andHumberto E.Soriano (2002). Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. Mol Genet Metab. *75*, 344-352.
Griffith, L.G., and Naughton, G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. Science *295*, 1009-1014.
Gustafson, E.K., Elgue, G., Hughes, R.D., Mitry, R.R., Sanchez, J., Haglund, U., Meurling, S., Dhawan, A., Korsgren, O., and Nilsson, B. (2011). The instant blood-mediated inflammatory reaction characterized in hepatocyte transplantation. Transplantation *91*, 632-638.
Haberle, J., Boddaert, N., Burlina, A., Chakrapani, A., Dixon, M., Huemer, M., Karall, D., Martinelli, D., Crespo, P.S., Santer, R.*, et al.* (2012). Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. Orphanet J Rare Dis. *7*, 32.
Horslen, S.P., McCowan, T.C., Goertzen, T.C., Warkentin, P.I., Cai, H.B., Strom, S.C., and Fox, I.J. (2003). Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. Pediatrics *111*, 1262-1267.
Hughes, R.D., Mitry, R.R., and Dhawan, A. (2005). Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. J R Soc Med. *98*, 341-345.
Iansante, V., Mitry, R.R., Filippi, C., Fitzpatrick, E., and Dhawan, A. (2018). Human hepatocyte transplantation for liver disease: current status and future perspectives. Pediatr Res. *83*, 232-240.
Ishigami, M., Honda, T., Okumura, A., Ishikawa, T., Kobayashi, M., Katano, Y., Fujimoto, Y., Kiuchi, T., and Goto, H. (2008). Use of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score to predict 1-year survival of Japanese patients with

cirrhosis and to determine who will benefit from living donor liver transplantation. J Gastroenterol. *43*, 363-368.
J. Landry, D.B., C. Ouellet, R. Goyette, and N. Marceau (1985). Spheroidal Aggregate Culture of Rat Liver Cells: Histotypic Reorganization, Biomatrix Deposition, and Maintenance of Functional Activities. J cell biol. *101*, 914-923.
Jorns, C., Ellis, E.C., Nowak, G., Fischler, B., Nemeth, A., Strom, S.C., and Ericzon, B.G. (2012). Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver. J Intern Med. *272*, 201-223.
Jorns, C., Nowak, G., Nemeth, A., Zemack, H., Mork, L.M., Johansson, H., Gramignoli, R., Watanabe, M., Karadagi, A., Alheim, M.*, et al.* (2016). De Novo Donor-Specific HLA Antibody Formation in Two Patients With Crigler-Najjar Syndrome Type I Following Human Hepatocyte Transplantation With Partial Hepatectomy Preconditioning. Am J Transplant. *16*, 1021-1030.
Jorns, C., Takahashi, T., Callaghan, E., Zemack, H., Larsson, L., Nowak, G., Parini, P., Ericzon, B.G., and Ellis, E. (2013). Serum apolipoprotein E as a marker to monitor graft function after hepatocyte transplantation in a clinically relevant mouse model. Transplant Proc. *45*, 1780-1786.
Kita, S., Yasuchika, K., Ishii, T., Katayama, H., Yoshitoshi, E.Y., Ogiso, S., Kawai, T., Yasuda, K., Fukumitsu, K., Mizumoto, M.*, et al.* (2016). The Protective Effect of Transplanting Liver Cells into the Mesentery on the Rescue of Acute Liver Failure after Massive Hepatectomy. Cell Transplant. *25*, 1547-1559.
Knobeloch, D., Ehnert, S., Schyschka, L., Buchler, P., Schoenberg, M., Kleeff, J., Thasler, W.E., Nussler, N.C., Godoy, P., Hengstler, J.*, et al.* (2012). Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. Methods Mol Biol. *806*, 99-120.
Kurano, M., Iso, O.N., Hara, M., Ishizaka, N., Moriya, K., Koike, K., and Tsukamoto, K. (2011). LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. Lipids Health Dis. *10*, 134.
Kuraya, D., Watanabe, M., Koshizuka, Y., Ogura, M., Yoshida, T., Asahi, Y., Kamachi, H., Nakamura, T., Harashima, H., Ozaki, M.*, et al.* (2013). Efficacy of DHMEQ, a NF-κB Inhibitor, in Islet Transplantation. Transplantat Journal. *96*, 445-453.
Lauschke, V.M., Shafagh, R.Z., Hendriks, D.F.G., and Ingelman-Sundberg, M. (2019). 3D Primary Hepatocyte Culture Systems for Analyses of Liver Diseases,

Drug Metabolism, and Toxicity: Emerging Culture Paradigms and Applications. Biotechnol J. *14*, e1800347.
Lee, C.A., Dhawan, A., Smith, R.A., Mitry, R.R., and Fitzpatrick, E. (2016). Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in Hepatocyte Transplantation: Current Status and Future Perspectives. Cell Transplant. *25*, 1227-1236.
Li, Y., Chen, H.S., Shaheen, M., Joo, D.J., Amiot, B.P., Rinaldo, P., and Nyberg, S.L. (2019). Cold storage of porcine hepatocyte spheroids for spheroid bioartificial liver. Xenotransplantation *26*, e12512.
Lorenzo Piemonti, B.E.L., Rita Nano, Alessandra Saccani, Paolo Monti, Paola Maffi, Giancarlo Bianchi, Antonio Sica, Giuseppe Peri, Raffaella Melzi, Luca Aldrighetti, Antonio Secchi, Valerio Di Carlo, Paola Allavena, and Federico Bertuzzi1 (2002). Human Pancreatic Islets Produce and Secrete MCP-1/CCL2: Relevance in Human Islet Transplantation. Diabetes *51*, 55-65.
Luebke-Wheeler, J.L., Nedredal, G., Yee, L., Amiot, B.P., and Nyberg, S.L. (2009). E-Cadherin Protects Primary Hepatocyte Spheroids from Cell Death by a Caspase-Independent Mechanism. Cell Transplant. *18*, 1281-1287.
Lysy, P.A., Najimi, M., Stephenne, X., Bourgois, A., Smets, F., and Sokal, E.M. (2008). Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: update and perspectives. World J Gastroenterol. *14*, 3464-3470.
Macedo, F.I., Eid, J.J., Decker, M., Herschman, B., Negussie, E., and Mittal, V.K. (2018). Autogenous hepatic tissue transplantation into the omentum in a novel ectopic liver regeneration murine model. Journal of Surgical Research *223*, 215-223.
Malhi, H., Annamaneni, P., Slehria, S., Joseph, B., Bhargava, K.K., Palestro, C.J., Novikoff, P.M., and Gupta, S. (2002). Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. Hepatology *36*, 112-121.
Matas, A.J., Sutherland, D.E., Steffes, M.W., Mauer, S.M., Sowe, A., Simmons, R.L., and Najarian, J.S. (1976). Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasms bilirubin in Gunn rats. Science *192*, 892-894.
Matsumoto, S., Haberle, J., Kido, J., Mitsubuchi, H., Endo, F., and Nakamura, K. (2019). Urea cycle disorders-update. J Hum Genet. *64*, 833-847.
Merion, R.M., Schaubel, D.E., Dykstra, D.M., Freeman, R.B., Port, F.K., and Wolfe, R.A. (2005). The survival benefit of liver transplantation. Am J Transplant. *5*, 307-313.

Meyburg, J., Das, A.M., Hoerster, F., Lindner, M., Kriegbaum, H., Engelmann, G., Schmidt, J., Ott, M., Pettenazzo, A., Luecke, T., *et al.* (2009). One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. Transplantation *87*, 636-641.
Miki, T. (2019). Clinical hepatocyte transplantation. Gastroenterol Hepatol. *42*, 202-208.
Milosavljevic, N., Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Arsenijevic, A., Nurkovic, J., Dolicanin, Z., Djonov, V., Lukic, M.L., and Volarevic, V. (2017). Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells. Liver Transpl. *23*, 1040-1050.
Miner, J.H., and Yurchenco, P.D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. *20*, 255-284.
Mito, M., Kusano, M., and Kawaura, Y. (1992). Hepatocyte transplantation in man. Transplant Proc. *24*, 3052-3053.
Mitteregger, R., Vogt, G., Rossmanith, E., and Falkenhagen, D. (1999). Rotary cell culture system (RCCS): a new method for cultivating hepatocytes on microcarriers. Int J Artif Organs. *22*, 816-822.
Mittler, F., Obeid, P., Rulina, A.V., Haguet, V., Gidrol, X., and Balakirev, M.Y. (2017). High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. Front Oncol. *7*, 293.
Moscona, A. (1961). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. Exp Cell Res. *22*, 455-475.
Mueller, D., Kramer, L., Hoffmann, E., Klein, S., and Noor, F. (2014). 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies. Toxicol In Vitro. *28*, 104-112.
Mylotte, L.A., Duffy, A.M., Murphy, M., O'Brien, T., Samali, A., Barry, F., and Szegezdi, E. (2008). Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. Stem Cells *26*, 1325-1336.
Myronovych, A., Murata, S., Chiba, M., Matsuo, R., Ikeda, O., Watanabe, M., Hisakura, K., Nakano, Y., Kohno, K., Kawasaki, T., *et al.* (2008). Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. J Hepatol. *49*, 363-372.
Napolitano, A.P., Chai, P., Dean, D.M., and Morgan, J.R. (2007). Dynamics of the Self-Assembly of Complex Cellular Aggregates on Micromolded Nonadhesive Hydrogels. Tissue Eng. *13*, 2087-2094.

Nicolas, C.T., Hickey, R.D., Allen, K.L., Du, Z., Guthman, R.M., Kaiser, R.A., Amiot, B., Bansal, A., Pandey, M.K., Suksanpaisan, L.*, et al.* (2018). Hepatocyte spheroids as an alternative to single cells for transplantation after ex vivo gene therapy in mice and pig models. Surgery *164*, 473-481.
Ohashi, K., Waugh, J.M., Dake, M.D., Yokoyama, T., Kuge, H., Nakajima, Y., Yamanouchi, M., Naka, H., Yoshioka, A., and Kay, M.A. (2005). Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. Hepatology *41*, 132-140.
Oliva-Vilarnau, N., Vorrink, S.U., Ingelman-Sundberg, M., and Lauschke, V.M. (2020). A 3D Cell Culture Model Identifies Wnt/beta-Catenin Mediated Inhibition of p53 as a Critical Step during Human Hepatocyte Regeneration. Adv Sci. (Weinh) *7*, 2000248.
Park, K.-H., and Song, S.C. (2006). Morphology of spheroidal hepatocytes within injectable, biodegradable, and thermosensitive poly(organophosphazene) hydrogel as cell delivery vehicle. J Biosci. *101*, 238-242.
Pontes Soares, C., Midlej, V., de Oliveira, M.E., Benchimol, M., Costa, M.L., and Mermelstein, C. (2012). 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. PLoS One *7*, e38147.
Puppi, J., Tan, N., Mitry, R.R., Hughes, R.D., Lehec, S., Mieli-Vergani, G., Karani, J., Champion, M.P., Heaton, N., Mohamed, R.*, et al.* (2008). Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. Am J Transplant. *8*, 452-457.
Rajvanshi, P., Kerr, A., Bhargava, K.K., Burk, R.D., and Gupta, S. (1996). Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule. Hepatology *23*, 482-496.
Rolver, M.G., Elingaard-Larsen, L.O., and Pedersen, S.F. (2019). Assessing Cell Viability and Death in 3D Spheroid Cultures of Cancer Cells. J Vis Exp.
Sanjeev Gupta, P.R., Rana Sokhi, Sanjeev Slehria, Ana Yam, Andrew Kerr, and Phyllis M. Novikoff (1999). Entry and Integration of Transplanted Hepatocytes in Rat Liver Plates Occur by Disruption of Hepatic Sinusoidal Endothelium. Hepatology *29*, 509-519.
Satoh, M., Yasunami, Y., Matsuoka, N., Nakano, M., Itoh, T., Nitta, T., Anzai, K., Ono, J., Taniguchi, M., and Ikeda, S. (2007). Successful Islet Transplantation to

Two Recipients From a Single Donor by Targeting Proinflammatory Cytokines in Mice. Transplantation *83*, 1085-1092.
Sharma, P., Schaubel, D.E., Guidinger, M.K., and Merion, R.M. (2009). Effect of pretransplant serum creatinine on the survival benefit of liver transplantation. Liver Transpl. *15*, 1808-1813.
Shigeta, K., Datta, M., Hato, T., Kitahara, S., Chen, I.X., Matsui, A., Kikuchi, H., Mamessier, E., Aoki, S., Ramjiawan, R.R.*, et al.* (2020). Dual Programmed Death Receptor-1 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Blockade Promotes Vascular Normalization and Enhances Antitumor Immune Responses in Hepatocellular Carcinoma. Hepatology *71*, 1247-1261.
Slehria, S., Rajvanshi, P., Ito, Y., Sokhi, R.P., Bhargava, K.K., Palestro, C.J., McCuskey, R.S., and Gupta, S. (2002). Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver. Hepatology *35*, 1320-1328.
Strom, S.C., Fisher, R.A., Rubinstein, W.S., Barranger, J.A., Towbin, R.B., Charron, M., Mieles, L., Pisarov, L.A., Dorko, K., Thompson, M.T.*, et al.* (1997). Transplantation of human hepatocytes. Transplant Proc *29*, 2103-2106.
Sutherland, R.M., McCredie, J.A., and Inch, W.R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J Natl Cancer Inst. *46*, 113-120.
Tan, Z., Qian, X., Jiang, R., Liu, Q., Wang, Y., Chen, C., Wang, X., Ryffel, B., and Sun, B. (2013). IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. J Immunol. *191*, 1835-1844.
Tatsumi, K., Ohashi, K., Shima, M., Nakajima, Y., Okano, T., and Yoshioka, A. (2008). Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. Transpl. *86*, 167-170.
Török, E., Lutgehetmann, M., Bierwolf, J., Melbeck, S., Düllmann, J., Nashan, B., Ma, P.X., and Pollok, J.M. (2011). Primary human hepatocytes on biodegradable poly(l-lactic acid) matrices: A promising model for improving transplantation efficiency with tissue engineering. Liver Transpl. *17*, 104-114.
Torres-Duran, M., Lopez-Campos, J.L., Barrecheguren, M., Miravitlles, M., Martinez-Delgado, B., Castillo, S., Escribano, A., Baloira, A., Navarro-Garcia, M.M., Pellicer, D.*, et al.* (2018). Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions. Orphanet J Rare Dis. *13*, 114.
Tsochatzis, E.A., Bosch, J., and Burroughs, A.K. (2014). Liver cirrhosis. Lancet *383*, 1749-1761.

Watanabe, M., Lundgren, T., Saito, Y., Cerami, A., Brines, M., Östenson, C.-G., and Kumagai-Braesch, M. (2016a). A Nonhematopoietic Erythropoietin Analogue, ARA 290, Inhibits Macrophage Activation and Prevents Damage to Transplanted Islets. Transplantation *100*, 554-562.
Watanabe, M., Zemack, H., Johansson, H., Hagbard, L., Jorns, C., Li, M., and Ellis, E. (2016b). Maintenance of Hepatic Functions in Primary Human Hepatocytes Cultured on Xeno-Free and Chemical Defined Human Recombinant Laminins. PLoS One *11*, e0161383.
William Bennet, B.S., Carl-Gustav Groth, Mathias D. Brendel, Daniel Brandhorst,, and Heide Brandhorst, R.G.B., Graciela Elgue, Rolf Larsson, Bo Nilsson, and Olle Korsgren (1999). Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans. Diabetes *48*, 1907-1914.
Yamanouchi, K., Zhou, H., Roy-Chowdhury, N., Macaluso, F., Liu, L., Yamamoto, T., Yannam, G.R., Enke, C., Solberg, T.D., Adelson, A.B.*, et al.* (2009). Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. Hepatology *49*, 258-267.
Zhang, J., Zhang, Y., Cheng, L., Li, C., Dai, L., Zhang, H., Yan, F., Shi, H., Dong, G., Ning, Z.*, et al.* (2018). Enrichment and characterization of cancer stem-like cells in ultra-low concentration of serum and non-adhesive culture system. Am J Transl Res. *10*, 1552-1561.
厚生労働省. 令和元年人口動態統計.