

厚生科学研究費補助金
高度先端医療研究事業

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

ハイブリッド人工肝の実験的治療効果評価に
基づいた総合的・基盤的研究

1999年度

平成12年3月

主任研究者 雨宮 浩
(国立小児病院小児医療研究センター)

分担研究者 櫻川 宣男
児玉 亮
菅 健一
松村外志張

ハイブリッド人工肝の実験的治療効果評価に基づいた総合的・基盤的研究
主任研究者 雨宮 浩 国立小児病院小児医療研究センター センター長

研究要旨：本年度は3年計画の最終年度であり主にブタ肝不全モデルを用いたハイブリッド人工肝の機能評価を行った。また平行してハイブリッド人工肝の改良のための基盤的研究を行った。主要成果を以下に挙げる。1) 外科的阻血性肝不全モデルを基本とした再現性の高いハイブリッド人工肝機能評価系を確立した。2) 上記実験的病態モデルに対し回流型培養装置を体外循環系に接続して生存時間と各種生理的指標を測定し、有効生存時間の有意な延長、脳圧上昇の抑制、血液凝固能の改善、が見られた。3) 培地、細胞、血漿の3相の組合せ可能な体外循環型ハイブリッド人工肝プロトタイプを、新規超微細繊維膜を用いて作成、細胞培養を試行した。4) ヒト羊膜細胞をハイブリッド人工肝リアクター細胞へ応用すべく、増殖環境、凍結保存法、不死化細胞株の取得、を行った。5) ブタ肝細胞培養基質としてポリウレタン-アミノ酸共重合体が、培地添加物として高濃度アスコルビン酸2リン酸が、それぞれ機能維持面で優れることがわかった。6) 正常肝細胞の約1/7のアンモニア除去活性を有するHepG2株を得た。この細胞リアクターはアンモニア以外の酵素反応必要物を細胞自身が供給する点、固定化酵素リアクターに優れることがわかった。

A. 研究目的

機能が損なわれた臓器に対する臓器置換治療として、臓器移植、人工臓器、ハイブリッド人工臓器が挙げられる。この中で、ハイブリッド人工臓器は、供給、品質の安定性において移植に勝り、物質代謝の選択性、効率性においては人工臓器より優れると期待されている。本研究は以下の2要素から構成される。すなわち、1) 体外循環型ハイブリッド人工肝モジュールの開発、2) バイオリアクター細胞の改良、である。

モジュールとして多くの研究者が用いる中空系型は基本的に体外循環装置を流用したものであり、細胞の培養環境としては優れるものと言いきれない。そこで我々は物質生産用として実績のある回流式培養装置を基礎に新規なモジュールを開発している。他方、バイオリアクター細胞の改良では、本研究の特長として幹細胞様性質を示すブタ未熟肝細胞やヒト羊膜細胞の応用を検討している。また、生理機能を遺伝子工学的に細胞に組み込み、特定機能を付加・強化した細胞を開発している。最近、ブタにおいて、ヒトに感染能力のあるレトロウィルスが存在するとの報告があり、ブタ細胞のヒトへの応用が懸念されている。当グループがめざす人工細胞はハイブリッド人工肝に適する安全なリアクターになると期待される。

ハイブリッド人工肝は既に欧米で臨床治験の報告がなされている。しかしながら、それらの報告では現代の最新医療技術より本当に優れているかという観点からの評価が欠如し、新医療技術としての有効性は未知である。本研究では、まず、標準化された評価法を確立し、ハイブリッド人工肝の未知の可能性を明確にする。人工材料の発達は近年めざましく、一方、肝細胞の生理、病理についても非常に多くの知識の集積がなされている。この好機に、正確な動物実験からのフィードバックを得て、医療におけるハイブリッド人工肝の位置付けを明確にしたいと考えている。

B. 研究方法

1) ハイブリッド人工肝機能評価系の確立

実験プロトコルとして、外科的阻血性肝不全モデル（門脈、肝動脈遮断、遠心性血液ポンプ（バイオポンプ）による門脈血の右心への返血）を用い、ハイブリッド人工肝機能評価の最適時期、人工肝回路への血流量の確保、等を検討した。

2) 実験的病態モデルに対する治療効果の評価とフィードバック

人工材料と生物材料の最良の組合せによる治療法を病態との関連を含め体系化する。平成10年度半ばより回流型培養装置をブタの体外循環系に接続しており、本年度はさらに個々の実験のばらつきを抑えるため種々の改良を加えた。

3) 体外循環型ハイブリッド人工肝プロトタイプの開発

物質生産用の回流式培養装置の特性が、従来の人工肝リアクターとして研究されてきた各種装置の難点の多くを解決するものであることに注目し、回流式培養装置を人工肝の中心部となる肝細胞リアクターに改変するため、プロトタイプを作成した。細胞に適した環境と生体に適した環境は一概に一致しない。例えば培地のアミノ酸組成と体液のアミノ酸組成は異なる。これを無理に同一の条件で接触させると、細胞が本来の機能を発揮できなくなったりあるいは生体が細胞を養うといった逆転現象が起こりかねない。この点を克服するために患者血漿、細胞、培地の3相を調和させたモデルを設計、作成した。

4) ヒト羊膜細胞のリアクター細胞への応用の基礎検討

ヒト羊膜上皮細胞は帝王切開により得られる胎盤1つより約10⁷細胞程度しか得られない。使用できる細胞数を増加させるために、増殖因子を利用した細胞増殖、凍結保存、不死化羊膜上皮細胞株の作成という3点を検討した。

5) 培養接着基質と培地の改良による高機能肝細胞長期培養法の確立

肝実質細胞及び肝上皮幹細胞の培養、機能維持に優れる環境を作り出すための研究で、接着基質としては人工血管に用いられているePTFE、培地については添加物の効果を検討した。

6) 遺伝子工学による特定機能を付加・強化した細胞株の取得

株化肝細胞で失活した薬物代謝系や尿素回路を遺伝子工学的な修飾により、これらの機能を付加、強化した細胞を作り出した。既に我々は本来アンモニアを代謝する能力を有しないCHO細胞にグルタミン合成酵素を導入し、細胞外のアンモニアを消去する系を確立しており、その機能も遺伝子増幅操作により上昇した。この手法を用い、アンモニア除去能を有するヒト肝細胞株HepG2を作成したが、さらに、薬物代謝酵素（Cytochrome P-450、ヒト由来3A4遺伝子）、を付加すべく、導入遺伝子のプラスミド構築を行った。

C. 研究結果・考察

1) ハイブリッド人工肝機能評価系の標準化

世界的に十指に余るグループがハイブリッド人工肝を開発し

ているが、各々が独自の評価系を有している。当グループではそれぞれを検討し、また臨床的な指標を加味し、仔ブタ (LWD系、25kg) における再現性の高い虚血性肝不全モデルを作成した。基本的には門脈、肝動脈を結紮遮断し、門脈血は体外シャントにて頸静脈に流した。実験中、50mg/dl以下の低血糖に対してはグルコース補充を行ったが昇圧剤投与は一切しなかった。無処置経過観察における生存時間は心停止までで 8.18 ± 2.45 時間 (平均 \pm SD、 $n=8$)、脳循環量の確保が困難となる最大動脈圧50mmHgを切る時点までの時間は 7.63 ± 2.58 時間であった。以下、前者を粗生存時間、後者を有効生存時間と呼ぶ。人工肝の適用は肝阻血完了後3時間から行った。

2) 実験的病態モデルに対する治療効果の評価

回流式培養装置にGS-HepG2を播種したハイブリッド人工肝を病態モデル治療に適用し生存時間及び各種指標を対照群と比較した。条件は計5群で、括弧内に有効生存時間を記した。GS-HepG2群 (15.34 ± 4.07 、 $n=5$)、野生株HepG2群 (10.05 ± 4.26 、 $n=6$)、無細胞人工肝群 (8.50 ± 1.67 、 $n=7$)、血漿交換+血液濾過透析群 (7.90 ± 3.83 、 $n=6$)、無治療群 (7.63 ± 2.58 、 $n=8$)。GS-HepG2人工肝による治療は野生株HepG2群以外の対照群に対し有意に有効生存時間を延長した。測定した種々の指標ではアンモニアの上昇が抑制傾向にあったほか、血液凝固系の各指標に改善が認められた。後者については凝固因子の補充というよりむしろ肝不全個体内における内因性の凝固因子消費が抑制されている可能性が考えられた。現在の血液浄化法を模した群に対してもGS-HepG2群は有意な有効生存時間が得られた。

一方、臨床的な実用化を念頭において、遠隔地で準備した細胞リアクターを輸送して臨床の現場に持ち込む場合の問題点を検討した。リアクターの準備ならびに待機を小田原に所在する明治乳業(株)細胞工学センターにおいて行い、ブタを用いる治療実験を東京都世田谷区の国立小児病院において準備し、小田原から世田谷までを自動車で低温輸送する実験を2回にわたって行い。どちらの場合にも安全な輸送ならびにリアクター機能の維持を確認することにより、本リアクターが有している長期安定して細胞機能を維持する特性を活かして、緊急時にそなえて待機させておき、緊急時には輸送して医療に供することが可能であることを証明した。

3) 体外型ハイブリッド人工肝プロトタイプの開発

現在まで回流式培養装置の細胞固定化基質としてはガラス繊維を用いたが、ガラス繊維にはさまざまな特長がある一方で、微細なガラス片が飛散する可能性があるなどの欠点を有している。この素材に代わる素材として、多孔質ポリテトラフルオロエチレン素材が使用できることを確認しているが、コスト等の面で、必ずしも満足できない。並行して進行している研究課題(鈴木班)における固定化素材探索の必要性和合わせて、これら欠点を補う新素材の探索を進めた結果、ナイロンならびにポリエステル混紡の微細繊維織布が細胞固定化材として使用可能であることが明かとなった。回流式培養装置にこの固定化材を装填し、HepG2細胞を固定化して回流式培養装置では、トランスフェリン生産能のみその機能性はガラス繊維を固定化素材とした場合と比較して、50%程度の向上を認めた。これらの結果は本素材の細胞固定化素材としての有用性を示すものであり特許出願した。また、本材料をチューブ状に加工し細胞を播種し前述の培地、血漿、細胞の3相型モジュールのプロトタイプを作成し細胞培養に用いた。

4) ヒト羊膜上皮細胞のリアクター細胞への応用の基礎検討

ヒト羊膜上皮細胞の培養条件検討では、EGF (5ng/ml)、HGF (60ng/ml) を添加すると1週間当たりで対照(成長因

子無添加)のほぼ2倍の増殖効果が得られた。凍結は通常の凍結・融解操作によく耐え、保存が可能であり一時的に大量使用ができることがわかった。またSV40large T抗原導入により不死化羊膜細胞株が得られた。その他、遺伝的にリポプロテインレセプターを欠如したモデル動物(Watanabe rabbit)への遺伝子補充療法のキャリア細胞として有効性が見出された。

5) 培養接着基質と培地の改良による高機能肝細胞長期培養法の確立

肝細胞をコーゲンコートシャーレ及びPTFE不織布上で静地培養し、アンモニア代謝速度を比較した。コーゲンコートシャーレ及び未処理のPTFE不織布上では急激な代謝速度の減少が見られ、培養5日目には代謝活性がほとんど見られなかった。これに対し、ポリウレタン-アミノ酸共重合体

(PAU)をコートしたPTFE不織布上では代謝速度の減少は緩やかであり、培養5日目においても代謝活性が見られた。培養6日目において、SEMによる観察を行ったところ、PAUをコートしたPTFE不織布上には大量の細胞が接着し、凝集塊を形成していることがわかった。以上より、PTFE不織布は肝細胞を固定化する有望な担体であることが示された。

ブタ肝細胞培養系に高濃度(2mmol/l)のアスコルビン酸二リン酸(Asc2-P)を培地に加えて成熟ブタ肝組織から分離した肝実質細胞画分をプラスチック培養皿上で培養すると増殖し、肝実質細胞に近い形状を呈する細胞で埋まるようになることを見出した。機能では、培養皿当たりのアンモニア代謝能が培養日数に応じていったん低下した後、回復してさらに初期値を上回ることがわかった。

6) 遺伝子工学による特定機能を付加・強化した細胞株の取得

CHO細胞同様に肝由来のHepG2に関して、GS阻害剤MSX濃度を順次上昇させた培地に馴化させることで、遺伝子増幅した細胞を得ることができた。そこで、得られた細胞株のアンモニア代謝能を様々な初発アンモニア条件下で検討した結果、初発アンモニア濃度1mM条件下で 1.4×10^{-14} mol/cell/hの値となった。このアンモニア代謝速度は初代肝の約1/7の値であった。さらにアンモニア代謝能を上昇させるために、細胞へのエネルギー供給の面からグルコース濃度を高め、GSの基質であるグルタミン酸濃度を上昇させ、さらに、グルタミン合成酵素の正のエフェクターである亜鉛強化について検討した結果、グルタミン酸を7.4mmol/lに上昇させることにより、初発アンモニア濃度1mmol/lの場合は1.5倍、0.1mmol/lの場合には3倍にアンモニア代謝能を強化できた。

従来の研究でグルタミン合成酵素固定化カラムではアンモニア除去活性の発現には酵素反応の基質(グルタミン酸)、ATP、Mg²⁺イオンの供給が不可欠であった。しかしながら今回作成したGS-HepG2ではグルタミン酸入り培地で培養した後、数時間はグルタミン酸非存在下でアンモニア除去活性を有することがわかった。また、ATP、Mg²⁺は供給する必要がなかった。これは細胞内にこれら必要分子のプールが存在するためであろうと考えられ、固定化酵素にはない細胞リアクターとしての特性と考えられた。

D. 研究発表

[学会発表]

1. Enosawa S, Sakuragawa N, Mitani T, Li XK, Tamura A, Suzuki S, Amemiyah H.

A novel cell population which shows hepatocyte-like differentiation markers in human amniotic epithelial cells-A possible gene carrier for cell therapy.

The Cell Transplant Society, Fourth International Congress. Montreux, Switzerland, March 21-24, 1999.

2. 絵野沢 伸, 宮下 智之, 田村 明彦, 李 小康, 鈴木 盛一, 雨宮 浩, 高村 政範, 松村 外志張, 大政 健史, 山中 貢, 菅 健一

ハイブリッド人工肝構築を目的としたアンモニア代謝能付加 HepG2細胞の回流培養装置 (キグナス) による大量持続培養.

第7回細胞療法研究会, 東京, 4月23日, 1999.

3. Miyasita T, Enosawa S, Tamura A, Li X-K, Suzuki S, Amemiya H, Matsumura T, Omasa T, Yamanaka M, Hiramatsu S, Suga K, Aoki T, Koyanagi Y.

Development of bioartificial liver with glutamine synthetase-transfected recombinant human hepatoblastoma cell line, HEP-G2.

The 6th Congress of the Asian Society of Transplantation, Singapore, September 20-24, 1999.

4. 絵野沢 伸, 宮下 智之, 田村 明彦, 鈴木 盛一, 雨宮 浩, 大政 健史, 菅 健一, 高村 政範, 松村 外志張
グルタミン合成酵素導入HepD2細胞をリアクターとしたハイブリッド人工肝の機能と効果.

第37回日本人工臓器学会, 名古屋, 10月14-16日, 1999.

5. 絵野沢 伸, 中島達也, 三谷 匡, 李 小康, 鈴木盛一, 奥山虎之, 桜川宣男

羊膜上皮細胞において肝実質細胞様性質を示す細胞集団—Ex vivo遺伝子療法のキャリア細胞としての可能性—.

第22回日本分子生物学会, 福岡, 12月7-10日, 1999.

[論文発表]

1. Enosawa S, Miyashita T, Suzuki S, Li XK, Tsunoda M, Amemiya H, Yamanaka M, Hiramatsu S, Tanimura N, Omasa T, Suga K, Matsumura T. Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for development for a bioartificial liver. Cell Transplantation in press.

2. Miyashita T, Enosawa S, Suzuki S, Tamura A, Tanaka H, Amemiya H, Matsumura T, Omasa T, Suga K, Aoki T, Koyanagi Y. Development of Bioartificial Liver with Glutamine Synthetase Transduced Recombinant Human Hepatoblastoma Cell Line, HepG2. Transplant Proc in press.

3. 絵野沢 伸, 宮下智之, 田村明彦, 鈴木盛一, 雨宮 浩, 大政 健史, 菅 健一, 高村政範, 松村外志張. グルタミン合成酵素 導入HepG2細胞をリアクターとしたハイブリッド人工肝の機 能と効果. 肝臓 41(3): 237-238, 2000.

19990409

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system
Takashi Ishii, Keiko Ohsugi, Shun Nakamura, Kahei Sato, Mitsuhiro Hashimoto, Katsuhiko Mikoshiba, Norio Sakuragawa
Neuroscience Letters. 268: 131-134, 1999

Removal of digoxin and doxorubicin by multidrug resistance protein-overexpressed cell culture in hollow fiber
Shuichi Tsuruoka, Koh-ichi Sugimoto, Kazumitsu Ueda, Makoto Suzuki, Masashi Imai, and Aakio Fujimura
Kidney International. Vol. 56 : 154-163, 1999

Cell Transplantation, in press. Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for the development for a bioartificial liver.	2000	Pergamon Press	Enosawa, Miyashita, Suzuki, et al.
Transplant Proc, in press. Development of bioartificial liver with glutamine synthetase transfected recombinant human hepatoblastoma cell line, HepG2.	2000	Elsevier Sci Inc.	Miyashita, Enosawa Suzuki, et al.
肝臓 41(3): 237-238. グルタミン合成酵素導入HepG2細胞をリアクターとしたハイブリッド人工肝の機能と効果.	2000	日本肝臓学会	絵野沢、宮下、田村他.
J Hum Genet 45: 171-176. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver.	2000	Springer-Verlag	Sakuragawa, Enosawa, Ishii, et al.

J Hum Genet 45: 1-5. Enzymatic corrections for cells derived from Fabry disease patients by a recombinant adenovirus vector.	2000	Springer-Verlag	Ohsugi, Kobayashi, Itoh, et al.
Neurosci Lett 279: 37-40. Characterization of [3H]-mazindol binding sites in cultured monkey amniotic epithelial cells.	2000	Elsevier	Elwan, Sakuragawa
J Neurosci Res 56: 316-322. Detection of dopamine D2 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells.	1999	Wily-Liss Inc.	Elwan, Ishii, Sakuragawa.
Neurosci Lett 262: 9-12. Evidence for the presence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells.	1999	Elsevier	Elwan, Ishii, Ono, Sakuragawa
New Era of Biochemical Engineering and Biotechnology. CD-ROM publish Expression and amplification of glutaminyl synthetase gene for constructing ammonia-metabolizing cell lines in hybrid artificial liver support system.	1999	Jinda Electronics Pub	Omasa, Yamanaka, Hiramatsu, et al.
ケミカル・エンジニアリング 1月号 33-39. ハイブリッド人工肝臓に適したアンモニア代謝細胞の開発。	2000	化学工業社	大政健史
Progress in Molecular and Cellular Subcellular Biology 24: 103-119 Cellular genealogy of in vitro senescence and immortalization.	1999	Springer-Verlag	Matumura.
Cytotechnology 31: 53-60. A recombinant bait region mutant of human α 2-macroglobulin exhibiting an altered proteinase-inhibiting spectrum.	1999	Kluwer Academic Pub	Ikai, Ookata, Shimizu, et al.
Nucleic Acids Symposium Series 42: 87-88. A possible function of DNA curvature in a vector system that allows efficient expression of heterogeneous proteins in CHO cells.	1999	Oxford Univ Press	Hirota, Maeda, Yan, et al.