

京都大学	博士（医学）	氏名	畑 俊 行
論文題目	Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold (同系肝細胞および異種動物スカフォールドにより作成した人工キメラ肝臓を用いた肝臓移植の検討)		
(論文内容の要旨) <p>【背景】肝不全に対して、肝臓移植は現在最も有効な治療法であるが、世界的な臓器不足が問題となっている。再生医療を用いた人工肝臓が期待されているが、臓器としての再生は未だ困難である。近年、生体内臓器を再生の足場（スカフォールド）に用いることで人工臓器を作成する報告があり、遺伝子組換えブタ等の異種動物の肝臓構造をスカフォールドに用い、ヒト由来の肝細胞などを再生させた人工キメラ肝臓の開発および移植グラフトとしての利用が期待される。当研究では、ラット由来肝細胞と生体マウス内の肝臓構造をスカフォールドに用いたキメラ肝臓を作成し、それを肝臓グラフトとしてラット・レシピエントに移植し、肝臓グラフトとしての可否を検討した。</p> <p>【方法】 luciferase 遺伝子トランスジェニック・ラットおよび luciferase/LacZ 遺伝子トランスジェニック・ラットから分離した肝細胞を、urokinase-type plasminogen activator/SCID (uPA/SCID) マウスに移植し、同マウス生体内でラット由来肝細胞とマウス由来非実質組織で構成される人工キメラ肝臓を作成した。更に、作成したキメラ肝臓をマウスより摘出し、Lewis ラットおよびナガセ無アルブミン・ラットに対して、肝動脈および肝静脈の血行再建付きの異所性移植を行った。移植したキメラ肝臓の肝実質はレシピエントに対して同種組織となるが、胆管や血管などのマウス由来非実質組織は異種組織となることから、術前後でタクロリムス単剤もしくは同剤とシクロホスファミドを用いた免疫抑制プロトコルを適用し、その効果を評価した。キメラ肝臓の肝細胞中の luciferase 遺伝子の活性を in vivo バイオイメージング装置で経時的に計測し、uPA/SCID マウスおよびレシピエント・ラット内でのキメラ肝臓の状態を評価した。また、ドップラー・エコーを用いて移植後キメラ肝臓における血流評価を行った。キメラ肝臓の機能評価として、ナガセ無アルブミン・ラット中での血中ラット・アルブミン値の測定を術後4ヶ月間行った。組織学的評価として、ヘマトキシリン・エオジン染色での形態評価とKi67免疫染色による増殖能評価を行った。</p> <p>【結果】 uPA/SCID マウス内に移植したラット肝細胞は、マウス自己肝細胞が uPA 蓄積に伴って脱落した部分を置換し、ラット由来肝細胞と胆管や血管などのマウス由来非実質組織で構成されたキメラ肝臓が作成された。キメラ肝臓のラットへの異所性移植後は、二種の免疫抑制プロトコル共に、免疫抑制なしと比較して有意にグラフト生存期間を延長し、更に組織学的にも拒絶反応の軽</p>			

減が認められた。また、ナガセ無アルブミン・ラットへの移植後、血中ラット・アルブミンも術後4ヶ月にわたり確認された。ドップラー・エコーにより、移植後6ヶ月にわたり移植グラフトへの血流維持が認められた。Ki67免疫染色による評価では、レシピエントの自己肝臓を部分切除することにより、自己残肝のみならず移植されたキメラ肝臓の肝細胞も増殖が促進されることを確認した。一方で、マウス由来の肝非実質組織に対する拒絶反応を完全に抑制することは出来なかった。

【結論】ラット由来肝細胞およびマウス由来非実質組織で構成されたキメラ肝臓を作成し、ラット・レシピエントに異所性移植した。異種成分に対する拒絶反応は継続するが、免疫抑制プロトコルを用いることで、術後長期にわたりグラフト生存と機能の維持を認め、人工キメラ肝臓の肝移植グラフトとしての可能性を示した。

(論文審査の結果の要旨)

肝臓移植は肝不全治療において現在最も効果的であるが、それに用いるグラフトの不足は深刻である。申請者は、再生医療を用いた代替肝臓移植の可能性を検討するために、再生の足場（scaffold）に着目したアプローチを用いた。トランスジェニック・ラット由来分離肝細胞と uPA/SCID マウスの肝臓 scaffold を用いたキメラ肝臓を作成し、それをレシピエント・ラットに異所性移植して、その移植後グラフトの評価を行った。

キメラ肝臓のラット由来肝細胞に導入された luciferase 遺伝子や LacZ 遺伝子を利用し、in vivo imaging や組織学的評価で、マウス内での安定したキメラ肝臓の作成を確認した。続いてキメラ肝臓を顕微鏡手術下にラットへ移植し、その生着を確認した。更に、キメラ肝臓マウス成分に対する拒絶反応を抑制する目的で免疫抑制剤を用い、移植後のグラフト生存の改善を示した。また、移植後の機能評価をする目的で、アルブミン無産生ラットをレシピエントにした移植を行い、キメラ肝臓からのラット・アルブミン産生機能が長期に維持されることを確認した。これらの結果より、人工キメラ肝臓の代替肝臓グラフトとしての可能性を示した。

以上の研究は人工キメラ肝臓を用いた肝臓移植の可能性の解明に貢献し臓器移植医療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成24年9月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降