

## 82. 三次元ヒト肝臓モデルによる肝癌の浸潤・転移の解明

山下 洋市

\*国立病院機構 九州がんセンター 肝胆膵外科

Key words : 脱細胞鋳型肝臓, 三次元ヒト肝臓モデル, 肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma: HCC), 浸潤・転移

### 緒言

癌の浸潤・転移に関する研究は、培養細胞を用いた *in vitro* の実験や、マウス担癌モデルなどを用いた *in vivo* の実験が主に行われ一定の成果を挙げてきたが、その詳細なメカニズムの解明には、臓器の中にある癌を経時的にトレースおよびサンプリングする必要がある。

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma: HCC) は、病理組織学的に vp (門脈侵襲) を見る頻度が多いため、『経門脈で転移する』ことが周知の事実となっている。しかし、肝血流に逆行したこの浸潤・転移形式は物理学的に理解しがたく、それを裏づける分子生物学的エビデンスは皆無である。我々は、HCC の転移形式は、血流に順行した『類洞⇒肝静脈⇒全身循環⇒肝内転移』であると考えている。しかし、常識を覆すような本機序を現在の *in vivo* 実験系で証明することは、膨大な数のマウスを必要とするため不可能である。

上記のような問題を解決するために、本研究ではラット脱細胞鋳型肝臓にヒト由来細胞を播種して『三次元ヒト肝臓モデル』を創り、そこにヒト HCC 株を播種して腫瘍を形成させ、浸潤・転移過程を経時的にサンプリングしながらトレースすることで、その浸潤・転移機序を分子生物学的に解明することを目的とする。

### 方法

Triton X をラット肝右葉の門脈に還流してラット脱細胞鋳型肝臓を作製する<sup>1)</sup>。この脱細胞鋳型肝臓を scaffold として、ヒト由来肝細胞を播種・培養して三次元ヒト肝臓モデルを創成する。このモデルに、GFP 遺伝子などを導入したヒト HCC 細胞株 (HLE など) を播種して担癌モデルとし、GFP 蛍光 *in vivo* リアルタイムイメージングや経時的なサンプリングによる病理組織学的検討にて、三次元ヒト肝臓モデル内の腫瘍から周囲脈管へどのように癌が浸潤していくのか、また転移していくのは経門脈か経肝静脈か、転移細胞は単一細胞かスフェロイド構造細胞か、などを評価していく。

### 結果

ラット脱細胞鋳型肝臓を安定して作製することが可能となった (図 1)。

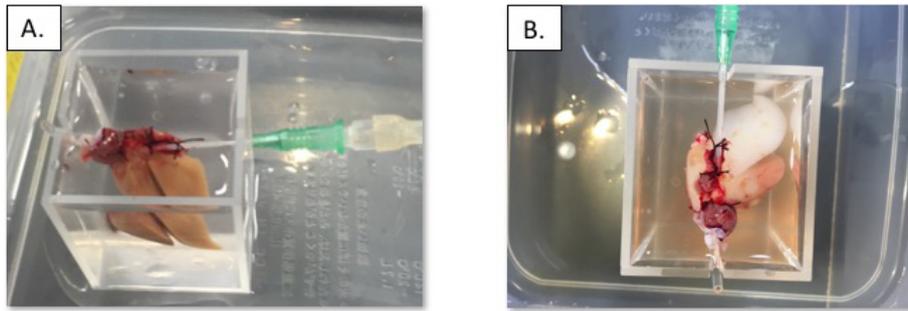


図1. ラット脱細胞鋳型肝臓

A) 摘出したラット肝右葉、B) ラット脱細胞鋳型肝右葉。

三次元ヒト肝臓モデルを *ex vivo* で作製するには、長期還流培養モデルを作製する必要がある。要旨に概念図を示したが、今回、人工肺による酸素供給を可能にした長期還流培養システムを新しく構築することに成功した (図2)。

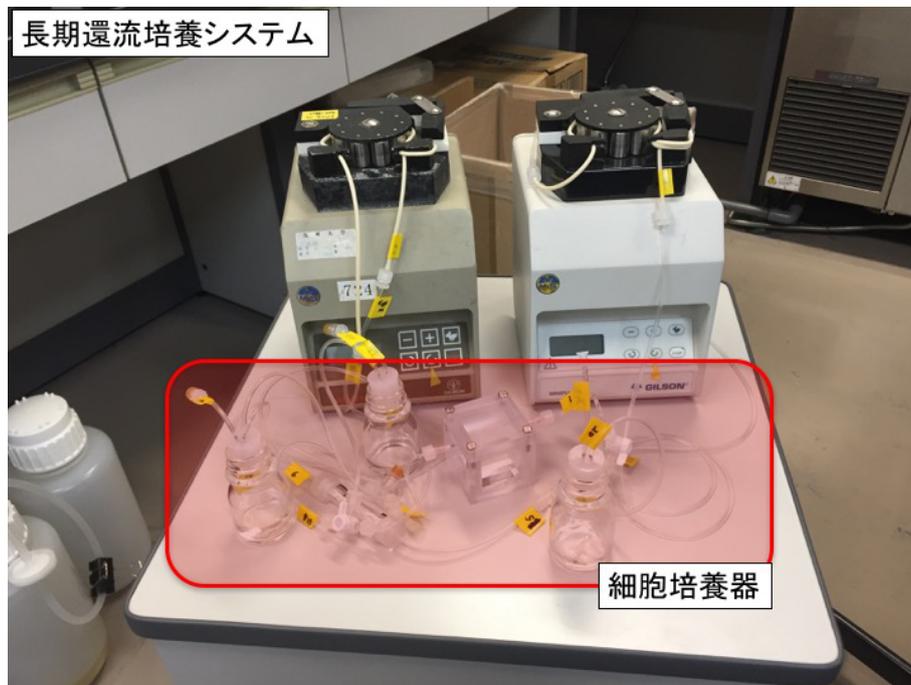


図2. 長期還流培養システム

三次元ヒト肝臓モデルは細胞培養器内で培養する。

三次元ヒト肝臓モデルを作るシステム整備は完了したと言える。

次に、三次元ヒト肝臓モデルを作製する「細胞源」が課題となるが、我々が既に確立しているプロトコル<sup>2)</sup>をもとに、熊本大学医学部附属病院倫理委員会の承認のもと、患者からインフォームド・コンセントを取得した上で、肝切除症例からヒト初代培養肝細胞を80%以上の viability を維持して採取することに成功した。また、ヒト初代培養肝細胞にレンチウイルスベクターに *E6/E7* & *hTERT* 遺伝子や *SV40* 遺伝子を挿入して、ヒト初代培養肝細胞に遺伝子導入することで、ヒト初代培養肝細胞の不死化に成功した (図3)。

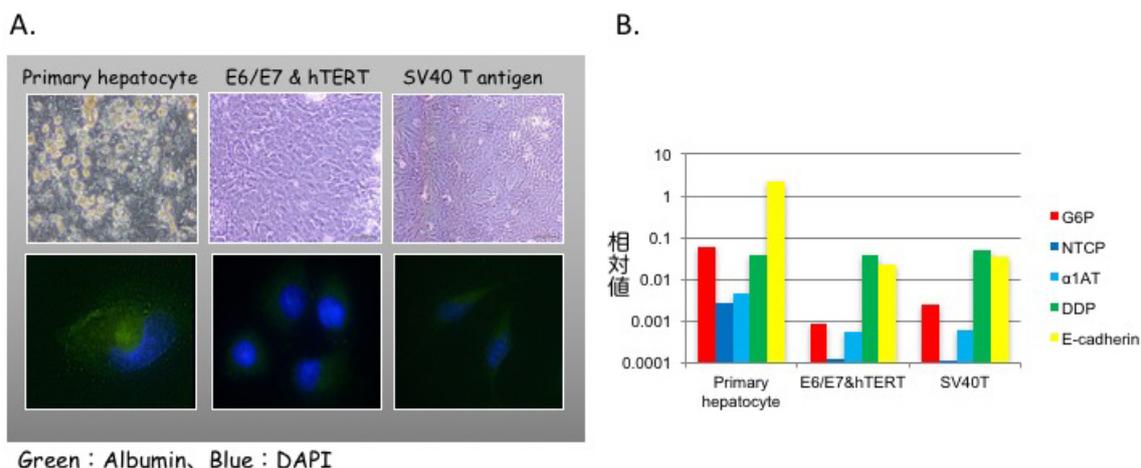


図3. 不死化ヒト初代培養肝細胞

- A) hTERT 遺伝子や SV40 遺伝子を導入して不死化。  
 B) 肝特異機能は著しく喪失。

*G6P*、*NCTP*、*α1AT*、*DDP*などの肝特異遺伝子の発現や、上皮系マーカーの *E-cadherin* の発現を定量的 RT-PCR で評価したところ、不死化により、多くがその発現を 1/10 以下に減弱していた。不死化に伴い肝特異機能は著しく低下しているものと考ええる。

## 考 察

この度、人工肺を回路に組み込み、長期還流培養システムを開発したが、これまでの経験から予測される三次元ヒト肝臓モデルの作製に必要な酸素消費量を考慮すると、まだ数日の還流培養にしか耐えられないと考えている。従って、もっと高い酸素供給能力を持つ人工肺を組み込むことが必要となる。また、レンチウイルスベクターに *hTERT* 遺伝子や *SV40* 遺伝子を挿入して遺伝子導入することで、ヒト初代培養肝細胞の不死化に成功したが、アルブミン mRNA の発現は、初代培養肝細胞の 1/10 以下と低下しており、不死化に伴い肝特異機能を喪失しているようである。この機能のロスが、播種した HCC の浸潤・転移へ与える影響が危惧される。この肝特異機能のロスを最小限にする工夫が必要と考える。

昨年 4 月 14 日と 4 月 16 日に発生した熊本地震により、幸い研究者の人的被害はなかったものの、研究環境は壊滅的ダメージを受け、本研究の進捗にも少なからず影響を与えた。しかし、三次元ヒト肝臓モデルの作製は目の前となり、HCC の浸潤・転移課程を分子生物学的に明らかにするまで、今後も本研究を継続していく予定である。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院工学研究院化学工学部門井嶋博之教授、同白木奈菜助教、熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科学宮田辰徳大学院生、および山尾宣暢大学院生である。

## 文 献

- 1) Shirakigawa N, Ijima H, Takei T. Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2012 Nov;114(5):546-51. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.05.022. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22717723.
- 2) Yamashita Y, Shimada M, Tsujita E, Shirabe K, Ijima H, Nakazawa K, Sakiyama R, Fukuda J, Funatsu K, Sugimachi K. High metabolic function of primary human and porcine hepatocytes in a polyurethane foam/spheroid culture system in plasma from patients with fulminant hepatic failure. *Cell Transplant.* 2002;11(4): 379-84. PMID: 12162378.