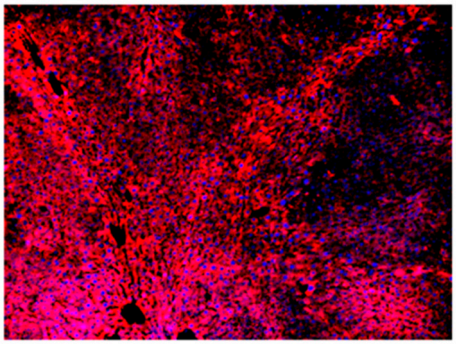
52　生体肝移植における革新的グラフト機能評価方法の探索	吉住　朋晴

【目的】肝硬変の終末期である非代償性肝硬変の唯一の治療法は肝移植であるが本邦では脳死ドナーが不足しており健康なドナーから肝臓の一部を切離し供与する生体肝移植が主に行われている。生体ドナーへの侵襲は可能な限り小さくする必要があり、ドナーへのリスクを低減するには可能な限り摘出する肝臓を小さくすることが望ましいが、ドナーから摘出される肝臓（グラフト）が小さくなると肝臓の移植を受けるレシピエントは肝不全をきたし、生存率が低下する。肝臓の質的指標としてはドナーの年齢の他に我々は LRRN2 の遺伝子発現を測定することで術後肝不全の発症を予測できることを報告してきたが現時点で LRRN2 の評価には肝生検を必要とする。肝生検は出血等のリスクを伴う侵襲的な検査である。ドナーの安全性を担保した非侵襲的なグラフトの質的評価方法が求められるため、我々は末梢血単核球（PBMC）に着目した。PBMC を用いてヒト肝臓の生物学的老化やグラフトの質を安全に予測する研究を立案し、さらに治療として iPS 由来 Hepatocyte の移植を検討し、iPS 由来肝細胞を肝不全マウスモデルに投与し生着・機能することを確認した。事前にグラフト機能を予測することができれば、質が悪く、移植後肝不全を起こす可能性が高い症例では事前に患者由来の iPS 細胞から肝細胞を誘導し、肝不全時には投与し肝不全による死亡を予防できる。本研究は生体肝移植において予測から治療までを網羅する非常に重要な研究となりえる。

【方法】1. PBMC を用いたグラフト不全予測遺伝子の絞り込みに向けた PBMC 収集方法の確立：生体肝移植ドナー患者より術前に採血を施行し PBMC を生成した。従来の方法では採取された PBMC の生存率は約 30%と不良であり、新規 PBMC 生成方法を確立し生存率向上を測った。2. ヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を用いたヒト iPS 由来肝細胞（i-Heps）の増殖：ヒト iPS 細胞より i-Stes と i-Heps を分化誘導した。i-Stes とヒト星細胞細胞株 LX-2 から収集した上清を i-Heps に投与し、i-Heps への増殖の影響を検討した。3. 肝不全モデルラットを用いた i-Heps の治療応用：免疫不全ラットに対し 70%肝切除を施行し肝不全モデルラットを作製した。肝不全モデルラットに対し経門脈的に i-Heps を投与した。投与後 2・4・8 週目に血液検査を施行しラット血清中のヒトアルブミン濃度を測定した。移植後 90 日目に肝臓をラットより摘出し、ラット肝での i-Heps の生着を確認した。

【結果】1. PBMC を用いたグラフト不全予測遺伝子の絞り込み：ドナー患者の術前血液を採取し、PBMC を採取する、従来の PBMC 採取の方法では収集細胞の生存率が約 30%ほどであったが、新規採取方法を確立し収集細胞生存率を約 80%にまで引き上げた。2. ヒト iPS 由来星細胞 (i-Stes) を用いたヒト iPS 由来肝細胞 (i-Heps) の増殖：i-Stes の上清は LX-2 の上清と比較して有意に i-Heps の増殖を促した。3. 肝不全モデルラットを用いた iPS 由来肝細胞の治療応用：i-Heps 投与後施行したラットの血液検査ではいずれの観察期間においてもヒトアルブミンの発現を認め、移植された i-Heps が機能していることを示唆していた。術後 90 日目に i-Heps 移植ラットの肝臓を摘出しヒトアルブミンの発現を蛍光免疫染色で染色しラット肝にヒトアルブミンが発現していることを確認した。

免疫不全ラットへのヒト iPS 由来肝細胞移植



52. 生体肝移植における革新的グラフト機能評価方法の探索

吉住　朋晴

九州大学 大学院医学研究院 消化器・総合外科

Key words：生体肝移植，肝不全，iPS 細胞由来肝細，Graft quality

緒　言

肝硬変の終末期である非代償性肝硬変の唯一の治療法は肝移植である。本邦では欧米諸国と比較して脳死による臓器提出が少ないため、健康なドナー肝臓の一部を切離し供与する生体肝移植が主に行われている。本来健康で医療の必要がない生体ドナーへの侵襲は可能な限り小さくする必要があり、ドナーの生命が脅かされることは決してあってはならないが、本邦においてもドナーの術後肝不全による死亡例（1 例）が報告されている。ドナーへのリスクを低減するには可能な限り摘出する肝臓を小さくすることが望ましいが、一方でドナーから摘出される肝臓（グラフト）が小さくなるほど移植を受けるレシピエントが肝不全をきたす比率は上がり、結果として生存率が低下する。従ってレシピエントの救命には移植される肝臓が移植後十分な代謝能や蛋白産生能を有する必要があり、移植される肝臓の大きさ（Graft volume）と質（Graft quality：単位体積あたりの肝機能）が重要である。Graft volume が小さい場合には Graft quality の高いグラフトが必要であり、Graft quality が低いことが予想される場合には大きなグラフトを採取することで Graft quality を補う必要がある。一般にグラフトの質を予測する指標はドナーの年齢のみであり、若年ドナーと比較して高齢ドナー由来グラフトは Graft quality が低下している場合が多く、若年者から採取した同等の大きさのグラフトを移植した場合と比較して、移植後のグラフト生存率や代謝能・蛋白生成能が低下していることが報告されている。高齢ドナーの肝臓ではグラフトが小さい場合、有意にグラフト生存率が低下するが、一方で高齢ドナーの肝臓を用いた場合でも救命可能な症例は存在する。高齢ドナーでもどのようなドナーで質が低下するかはこれまで謎に包まれていた。本邦では人口構造の高齢化に伴い、ドナーの高齢化が進み、高齢ドナーのグラフトを使用する頻度が増えている。そのため、高齢者のグラフトを使用するためには若年者と比較し大きなグラフトを採取せざるを得なかった。しかし肝移植ドナーは、本来は治療を受ける必要がない所謂健常人であり、肝臓の供与が必要なレシピエントに対して無償で自身の臓器を授与する立場にあるため、倫理的にもドナーへの侵襲や危険性を最小化する方法が求められる。高齢ドナーにおいては若年者と比較しより侵襲を小さくすべきであるにもかかわらず、大きなグラフトを採取せざるを得ない現状は喫急に解決すべき課題であった。Graft quality を正確に評価することができれば、必要以上の大きさのグラフトを採取することを防ぎ、ドナーとレシピエントのリスクをともに低減することが可能であり、本研究は今後、高齢化していく本邦において必要不可欠な研究といえる。我々はこれまでの肝臓の老化研究において、加齢に伴う肝臓での器質的変化、すなわち遺伝子発現や蛋白発現に変化が起こっているのではないかと推察した。その結果、老年群カニクイザルの肝臓では 468 遺伝子が若年群と比較し有意に発現が変化していた（図 1）。

老年群で発現が上昇した遺伝子のうち、ヒト肝臓での発現が見られる分子のスクリーニングを行い、LRRN2、ATP1A1、ZYX、LTBP4、PCRD1B、FOSB の 6 遺伝子を候補遺伝子として同定した。これらの 6 遺伝子についてヒトドナー肝での発現を調べた結果、LRRN2 発現が上昇している群では有意に肝移植後グラフト生存率が低下していた（図 2）。さらに LRRN2 高発現かつ 50 歳以上のドナーのグラフトを用いた場合、グラフト生存率は著明に低下することがわかり、Graft quality 評価マーカーを世界で初めて報告した［1］。我々のグラフト予後予測マーカーに関する研究は、これまで実年齢で漠然としか予測できなかった Graft quality を、より正確に評価

することを可能にしただけでなく、肝臓の生物学的老化に関する研究の礎となることも期待される。しかし現時点では、これらのグラフトマーカーによる評価には肝組織が必要であり、組織を得るための肝生検には出血のリスクがあるため、ドナーには追加のリスクを強いなくてはならない。そこで我々は可能な限り非侵襲的な検査でグラフトの質的評価が行える方法を確立し、さらにはリスクが高い患者に対しては術後の肝不全を抑制するための、iPS 細胞由来の肝組織による肝細胞移植を用いた支持療法を開発することを目指し本研究を立案した。

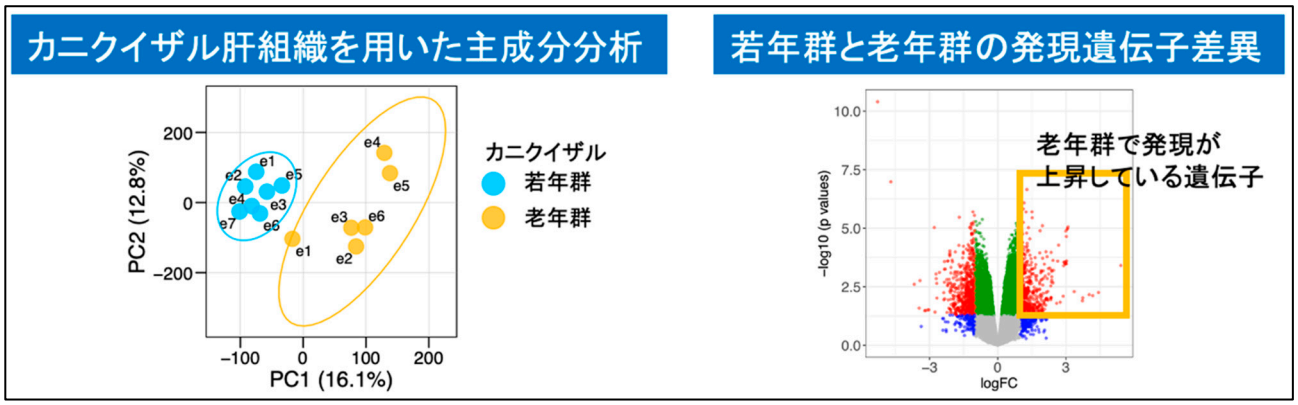


図 1. 老年・若年カニクイザル肝組織の遺伝子発現変化
若年カニクイザル (5〜9 歳) と老年カニクイザル (26〜27 歳) の遺伝子発現を比較した。
若年カニクイザルと老年カニクイザルでは肝組織の遺伝子発現が大きく異なっていた。

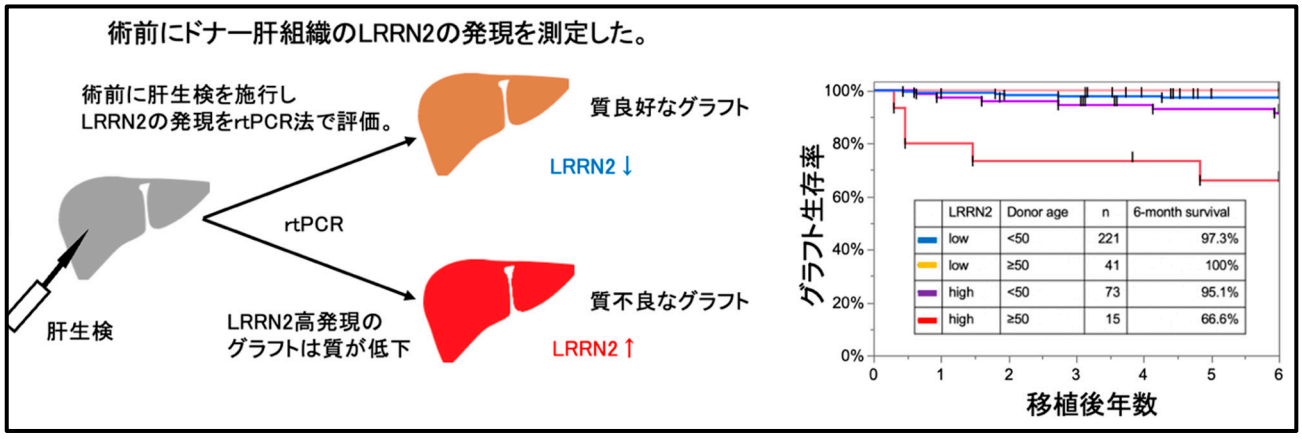


図 2. ドナー肝生検によるグラフトロスリスク評価法の開発
LRRN2 の発現が上昇しているグラフトを用いた場合、有意にグラフトロスのリスクが上昇し、ドナー年齢に LRRN2 の発現評価を加えることでグラフトロスのリスクを階層化することに成功した。

方　法

1. PBMC を用いたグラフト不全予測遺伝子の絞り込みに向けた PBMC の収集

生体肝移植ドナーより術前に末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell : PBMC) を採取した。PBMC の採取方法の改良を図った。PBMC を生体肝移植グラフトの予後予測マーカーとして評価していく際に PBMC 細胞分画や細胞表面抗原の評価が必要となるが、従来の濃度勾配遠心分離を用いた方法では死細胞が多いので採取方法の改善を行った。

2. ヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を用いたヒト iPS 由来肝細胞（i-Heps）の増殖

ヒト線維芽細胞より中胚葉を経由しヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を、また、内胚葉を経由し iPS 由来肝細胞（i-Heps）を分化させた。i-Stes もしくはヒト星細胞細胞株（LX-2）より分離した上清を含む Conditioned Medium を i-Heps へふりかけ、i-Heps の増殖の程度を Cell TiterGlo Assay で評価した。i-Ste と LX-2 より採取した上清をサイトカインアレイで評価し、分泌蛋白を比較した。

3. 肝不全モデルラットを用いた i-Heps の治療応用

免疫不全ラットに 7 割の肝切除を施行し、肝不全モデルラットを作製した。肝不全モデルラットに方法 2 で分化させた i-Heps を経門脈的に投与した。生着した i-Heps が機能を維持しているかを評価するため、i-Heps 移植後のラットより術後 2、4、8 週目に採血を施行し、血中のヒトアルブミンの濃度を The Enzyme-linked Immunosorbent Assay（ELISA）により測定した。また、術後 90 日目にラットより肝臓を摘出し、蛍光免疫染色でヒトアルブミンを染色し、i-Heps の生着を評価した。

結果および考察

1. PBMC を用いたグラフト不全予測遺伝子の絞り込みに向けた PBMC の収集

従来の採取方法（従来法）と新規の採取方法（新規法）で採取後の PBMC の生存率を比較した。新規法では従来法と比較し有意差を持って生存率が向上した（従来／新規：39%／83%、$p<0.0001$）。この生存率の向上は元々の PBMC の細胞分画や発現抗原への影響を低減できることが予想され、より詳細な解析が期待できる。今後は新規法により採取した PBMC をマルチフローサイトメトリーで評価し、PBMC の細胞分画や発現抗体とグラフトの質との関連性を評価していく。

2. ヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を用いたヒト iPS 由来肝細胞（i-Heps）の増殖

ヒト線維芽細胞より中胚葉を経由しヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を、また、内胚葉を経由し iPS 由来肝細胞（i-Heps）を分化させた（図 3a）。i-Stes と LX-2 より採取した Conditioned Medium を i-Heps にふりかけ 24 時間後に細胞増加率を評価し、i-Stes では LX-2 や Control（上清無し）と比較し有意に i-Heps を増加させた（図 3b）。i-Stes の増殖効果に起因する原因蛋白を同定するため、サイトカインアレイを施行し、i-Stes の上清では有意に Hepatocyte growth factor（HGF）の濃度が上昇していた。これら i-Stes の増殖効果は HGF blocker により打ち消され、i-Stes の i-Heps に対する増殖効果は HGF に起因することが分かった。肝細胞は *in vitro* では増殖しがたく、肝細胞移植では大量の肝細胞を必要とするが、移植に必要な肝細胞を直接培養する場合、約 9 億円の費用がかかるとされ、可能な限り安価で効率的な肝細胞増殖方法の確立が求められている。星細胞は通常、非活性化した状態で肝細胞に対し増殖を促す働きをするが、星細胞株は活性化しやすく、活性化により HGF などの肝増殖因子の分泌が低下し易いことが報告されている［2］。より高濃度の HGF を分泌し肝細胞の増殖を促す i-Stes は、*in vitro* での i-Heps の大量増殖効果をもたらすことが期待できる。

3. 肝不全モデルラットを用いた i-Heps の治療応用

免疫不全ラットに 7 割の肝切除を施行した肝不全モデルラットに対し、i-Heps を経門脈的に投与した。第 2、4、8 週目でラットの尾静脈より血液を採取し、血中ヒトアルブミンの濃度を測定した。すべての観察点においてラットの血中ではヒトアルブミンの発現が認められた（図 4a）。術後 90 日目に移植ラットより肝組織を摘出してヒトアルブミンを蛍光免疫染色で染色し、ラットの肝臓に i-Heps が生着していることを確認した（図 4b）。本検討により、今後、グラフトの質や容積が不十分な生体肝移植レシピエントで肝移植後に肝不全が生じた場合には、ヒト由来 i-Heps を投与することでレシピエントが必要とする肝機能を補填し、レシピエントの生存率を向上できることが期待できる。

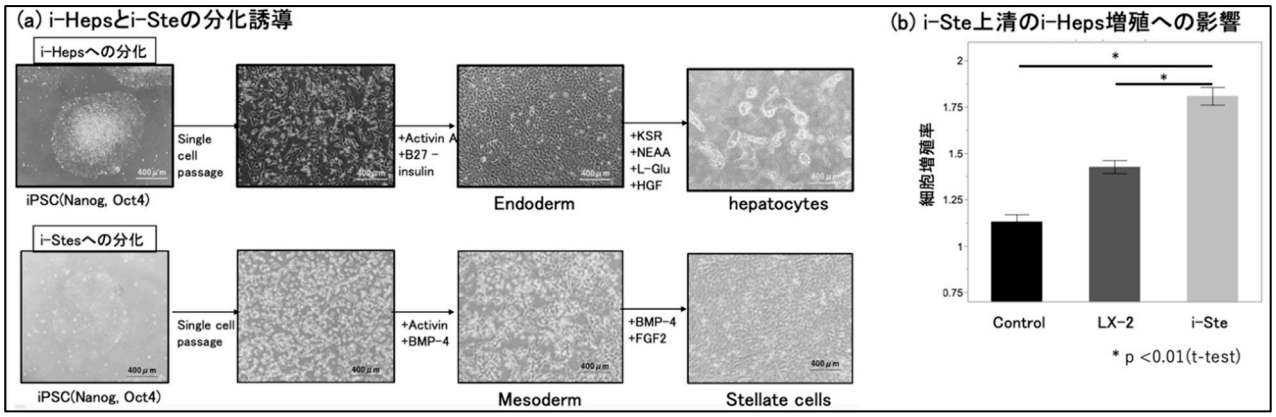


図 3. ヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を用いたヒト iPS 由来肝細胞（i-Heps）の増殖

a）当科独自のプロトコールを用いて i-Heps と i-Stes を誘導した（スケールバー：400 μ m）。

b）i-Stes と LX-2 の上清を i-Heps へふりかけ、i-Heps の増殖への影響を検討した。i-Stes では 2 倍近い i-Heps の増殖効果を示した。

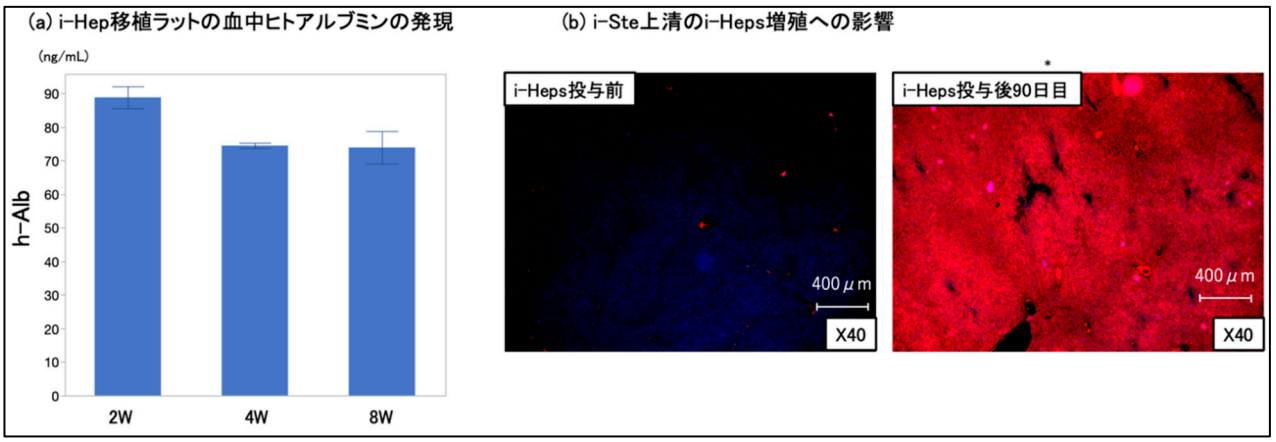


図 4. ヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を用いたヒト iPS 由来肝細胞（i-Heps）の増殖

a） 肝不全モデルラットに i-Heps を投与し投与後 2 週、4 週、8 週目に血中のヒトアルブミン濃度を ELISA 法にて測定した。すべての観察点でヒトアルブミンの発現を認めた。

b） 術後 90 日目に iPS 由来肝細胞移植ラットより肝臓を摘出し蛍光免疫染色によりヒトアルブミンの発現を評価し iPS 由来肝細胞の生着を確認した（スケールバー：400 μ m）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所プレシジョン免疫プロジェクトのプロジェクトリーダー山本拓也教授である。

文　献

1） Tomiyama T, Yamamoto T, Takahama S, Toshima T, Itoh S, Yoshizumi T, et al. Up‐regulated LRRN2 expression as a marker for graft quality in living donor liver transplantation. Hepatology Commun 2022;6:2836–49. PMID: 35890759 DOI: https://doi.org/10.1002/hep4.2033.

2） Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DYR. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. J. Clin. Investig. 2013;123:1902–1910. PMID: 23635788, DOI: 10.1172/JCI66369.