

第12回杏林医学会研究奨励賞受賞報告

蓮 井 宣 宏

杏林大学医学部消化器・一般外科学教室

この度は杏林医学会研究奨励賞を賜り、大変光栄に存じます。御選考いただきました選考委員の先生方ならびに杏林医学会の先生方、事務局の方に厚く御礼申し上げます。また、本研究にあたりご指導を賜りました清水達也教授（東京女子医科大学先端生命医科学研究所）、坂口勝久准教授（早稲田大学先進創造理工学部）、阪本良弘教授ならびにご助力頂きました先生方に深く感謝申し上げます。

受賞対象論文である『In vitro ballooned hepatocytes can be produced by primary human hepatocytes and hepatic stellate cell sheets In vitro ballooned hepatocytes can be produced by primary human hepatocytes and hepatic stellate cell sheets. Sci rep. 2022 Mar ; 12 : 5341.』はヒト非アルコール性脂肪肝炎症候群（Nonalcoholic steatohepatitis : NASH）における特徴的な所見である肝細胞の風船様変性（Ballooned hepatocyte : BH）を in vitroでの再現を試みた報告です。

NASHはメタボリックシンドロームの肝臓における表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD）が進行した状況であり、最終的に肝硬変や肝がんへ至ります。肥満人口の増加とともにNASHの罹患人口も増加傾向ですが、現時点で治療薬は存在していません¹⁾。

NASHにおいて創薬を目的とした研究は動物実験が主流ですが、ヒトNASHを十分に模したモデルは存在しません²⁾。そこで近年ヒト由来の細胞でスフェロイドやオルガノイドなどを形成するTissue engineeringの技術を用いて創薬を目的とした in vitroモデルの作成も提案されています。これらのモデルは肝細胞の脂肪化や炎症細胞の浸潤、組織の線維化など、部分的にヒトNASHを表現できていますが、ヒトNASHに特徴的であるBHは表現できていません³⁾。

BHの数はNASHにおける重症度と相関関係にある所見であり、組織診断の上で重要な所見です。さらにBH自身

も肝障害に対して様々な因子を分泌し、炎症や線維化を誘導し、肝線維症を引き起こします⁴⁾。このことからBHは治療のターゲットになりえ、BHを表現したin vitroモデルの作成は有意義と考えられます。

細胞シート工学はTissue engineeringの一分野であり、この技術を応用した肝細胞シート作成し、高血糖環境で培養したところ、肝細胞の腫大を認めました⁵⁾。そこで本研究はより生理的なNASHの環境に近づけるために、肝星細胞と共培養した細胞シートを作成し、高血糖および脂肪負荷環境で培養を行いました。その結果誘導された腫大した肝細胞（induced Ballooned hepatocyte : iBH）とヒトNASHにおけるBHとの異同を検証しました。

方法はまず、初代ヒト肝細胞とヒト肝星細胞を温度応答性培養に播種、共培養し、細胞シートを作製しました。その後細胞シートを生理的環境・糖毒性環境・脂肪毒性環境・糖脂肪毒性環境にそれぞれ曝露し、組織学的解析を行いました。機能解析としては、ヒトNASHにおいて変化が認められるSonic hedgehog・TGF- β ・炎症性サイトカイン・酸化ストレス・オートファジーマーカーの測定を行い、ヒトNASHにおけるBHとの異同を検証しました。

その結果生理的環境では肝細胞の腫大は観察できませんでしたがその他の環境では肝細胞の腫大を認めました。特に糖脂肪毒性環境下では脂肪滴の形成、サイトケラチンの配列異常、マロリー体およびオルガネラの異常も観察され、ヒトNASHのBHに類似していました。機能解析では糖脂肪毒性環境においてSonic hedgehog、TGF- β およびp62の上昇を認めた（生理的環境 vs 糖脂肪毒性環境 Sonic hedgehog : $p < 0.0001$, TGF- β : $p < 0.01$, p62 : $p < 0.0001$ ）一方で、炎症性サイトカインおよび酸化ストレスの有意な変化は認めませんでした。

本研究の結果から初代肝細胞および星細胞から、細胞シート工学にて形成されるiBHとヒトNASHにおけるBHが類似することが示唆され、BHを伴う新たなタイプのin

vitro NASHモデルとなる可能性を見出しました。今後、実際の薬剤試験を行い創剤モデルとしての有用性を示せば、NASHに対する治療薬開発に大きく貢献すると考えます。一方でこのモデルではBHを表現したに過ぎず、炎症や酸化ストレスなどヒトNASHの病態を十分に表現はできていません。よりよくヒトNASHを再現するためにKupffer細胞や血管内皮細胞なども加えたmultiple cultureシートの作製およびその培養を行なっていければと考えています。

参考文献

- 1) Younossi, ZM. ; Koenig, AB. ; Abdelatif, D. ; Fazel, Y. ; Henry, L. ; Wymer, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64 : 73-84, 2016.
- 2) Kanuri, G. ; Bergheim, I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci*, 14: 11963-11980, 2013.
- 3) Müller, FA. ; Sturla, SJ. Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Opin Toxicol*, 16: 9-16, 2019.
- 4) Ibrahim, SH. ; Hirsova, P. ; Gores, GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis : sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut*, 67: 963-972, 2018.
- 5) Gao, B. ; Sakaguchi, K. ; Matsuura, K. ; Ogawa, T. ; Kagawa, Y. ; Kubo, H. ; Shimizu, T. In vitro production of human ballooned hepatocytes in a cell sheet-based three-dimensional model. *Termis part A*, 26: 93-101, 2020.