

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名 ( 本 籍 )   | イシノ ナオアキ<br>石野 直明(京都府)                 |
| 学 位 の 種 類     | 博士(工学)                                 |
| 学 位 記 番 号     | 工博甲第67号                                |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当者                          |
| 学位授与の年月日      | 平成 27 年 9 月 24 日                       |
| 学 位 論 文 題 目   | 臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究        |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)教 授 藤里 俊哉<br>教 授 松村 潔<br>教 授 川原 幸一 |

学位申請者氏名 石野 直明

論文題目 臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究

## 論文の内容の要旨

ある臓器が病気や事故によって、重度の機能不全に陥った場合、臓器移植は有効な治療方法の一つである。ヒトへの臓器移植は、ヒトからヒトへの同種移植と異種動物からヒトへの異種移植の2通りの方法が知られている。しかし、未処理の異種臓器のヒトへの移植は、超急性拒絶反応が誘起され、レシピエントに生着することは皆無である。よって、臓器移植といえば、ヒトからヒトへの同種移植が一般的である。

本邦において、臓器移植は、1997年に施行された「臓器移植法」により、脳死後の心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、小腸などの提供が行われるようになった。その後、2010年に「改正臓器移植法」が全面施行された。このような背景のもと、臓器提供を受ける患者数は年々増加し、臓器移植を希望する患者数はドナー件数を大きく上回っている。その結果、多くの患者は、臓器移植までの待機を強いられる。生体臓器移植の代替手段として、人工臓器は、精力的に研究・開発が進められている。しかし、ヒトの臓器の機能を完全に模倣した人工臓器は未だ存在しない。近年、iPS細胞などの幹細胞研究が盛んに行なわれ、臓器移植への応用が期待されている。しかし、ヒトへの移植を想定した立体的な臓器を構築することは容易ではなく、実用化には至っていない。

最近、生体組織の複雑な立体構造と機能を完全に模倣した人工臓器を作製する一つの戦略として、ヒトあるいは異種組織から拒絶反応の原因となる細胞成分を除去した脱細胞化組織の研究が精力的に進められている。脱細胞化組織は、海外では、2000年頃から臨床使用が開始されている。本邦では、2014年に第一例目の脱細胞化心臓弁の移植が実施され、その成果が期待されている。脱細胞化組織は、界面活性剤や酵素を組み合わせた洗浄液によって作製する方法が一般的である。しかし、界面活性剤は移植後にレシピエント細胞に毒性を示し、脱細胞化組織の利点である自己組織化を妨げると報告されていることから、脱細胞化組織の作製法は検討の余地が残されている。そこで、本研究では、新たな脱細胞組織作製のための一つの可能性として、レシピエントから採取した血清を用いた脱細胞化組織の作製に取組み、その有効性を検証した。

本論文は、六章で構成される。

第一章では、臓器移植の現状の問題点、本研究を始めるに至った動機、および血清を用いた脱細胞化組織作製に関する二つの先行研究を紹介し、本研究の目的を明確にした。そして、本研究の目的が達成された際の期待される成果についてまとめた。

第二章では、ヒト血清を用いた脱細胞化組織作製のための処理条件を検討した。通常のヒト血清は、脱細胞化能に乏しいが、血清を濃縮することで脱細胞化能を改善することができた。更に、脱細胞化に寄与すると考えられる補体活性を高めることで、血清の脱細胞化能が顕著に向上した。そして、ヒト血清による異種組織の脱細胞化処理条件の最適化を図った。20%CO<sub>2</sub>雰囲気下にて、マグネシウムイオン濃度を 20mM に調整した血清にブタ頸動脈を浸漬させたところ、5 日間の処理で、組織に残存する DNA 含量は、約 2%まで減少した。

第三章では、ヒト血清の脱細胞化能を既存法である SDS 処理法と比較した。残存 DNA 定量および TEM による細胞残渣の観察によって、血清の脱細胞化能は、SDS 処理法には劣るものの、脱細胞化組織作製に有効であることを確認した。血清は、基底膜を除く全ての細胞成分を除去する能力を有していた。SEM および TEM による ECM 構造の観察によって、血清を用いた脱細胞化処理は、組織の ECM 構造を比較的温存することができ、脱細胞化組織作製に有利であることを示した。

第四章では、レシピエント血清で処理した脱細胞化組織の生体適合性評価を行った。近交系ラットへの皮下移植試験の結果、血清処理後の組織は重度の石灰化を誘起する可能性が示された。一方、SDS を用いて脱細胞化処理した組織と比較して、血清処理後の組織は、移植後の免疫拒絶反応が軽減された。

第五章では、新たにルシフェリンの発光現象を利用した、人工臓器のための抗血栓性評価法の開発に取り組んだ。血小板凝集に伴うルシフェリンの発光強度は、生体材料表面で形成される血栓重量と強い相関を認めた。血清処理や SDS 処理によって作製した脱細胞化人工血管の抗血栓性評価に応用したところ、人工血管の血栓形成性を短時間で評価することができ、抗血栓性評価法としての有効性を示した。

第六章は、本研究の総括である。本研究は、レシピエントから採取可能な成分として、血清の脱細胞化能を検証した。ヒトやラットの血清は、処理条件を最適化することで、比較的短期間で異種組織を脱細胞化できることを示した。血清を用いた脱細胞化処理法は、石灰化の抑制や、抗血栓性の改善など、多くの解決すべき課題が浮き彫りになった。しかし、ラット皮下移植試験の結果において、レシピエント血清で処理した脱細胞化組織は、SDS 処理法と比較して、移植後の拒絶反応を抑制する効果を示した。今後、上記問題点の改善に向け、検討を重ねる必要があるが、本研究は、生体適合性に優れた人工臓器の開発において、一定の成果を示した。

学位申請者氏名 石野 直明

論文題目 臓器移植のための脱細胞化組織の作製とその生体適合性に関する研究

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、レシピエントから採取した自己由来の血清を用いて異種組織を脱細胞化处理し、その有効性を検証した研究である。また、ルシフェリンの発光現象を利用した、独自の抗血栓性評価装置を作製し、血清を用いて作製した脱細胞化組織の生体適合性を評価している。

ヒトあるいは異種組織から拒絶反応の原因となる細胞成分を除去した脱細胞化組織は、生体組織の複雑な 3D 構造と機能を完全に模倣した人工臓器を作製する一つの戦略として注目されている。脱細胞化組織は、界面活性剤や酵素を組み合わせた洗浄液によって作製する方法が一般的である。しかし、界面活性剤は移植後にレシピエント細胞に毒性を示し、脱細胞化組織の利点である自己組織化を妨げると報告されていることから、脱細胞化組織の作製法は、検討の余地が残されている。レシピエント由来成分を用いた脱細胞化組織の作製は、これまでにない新たな試みである。

得られた主な研究成果は以下の通りである。

- (1) 血清を用いた異種組織の脱細胞化处理条件を明確にした。血清の脱細胞化能は、血清濃度に依存することを示し、異物認識機構を有する補体系の活性化が異種組織の脱細胞化に寄与することを示した。
- (2) 血清は、既存の脱細胞化处理液と同様に、異種組織から基底膜を除く全ての細胞成分を除去する能力を有していることを明らかにした。
- (3) 血清を用いて脱細胞化した組織は、一般的な SDS を用いて脱細胞化した組織と比較して、細胞外マトリクス構造の変性が軽微であることを確認した。血清を用いた脱細胞化法は、心臓や肺などの複雑な構造を有する臓器への応用に有利であることを示した。

- (4) 血清を用いて脱細胞化した組織は、一般的な SDS を用いて脱細胞化した組織と比較して、移植後の免疫拒絶反応を抑制し、生体内で長期間形態を維持することを示した。
- (5) ルシフェリンの発光現象を利用し、血小板凝集を定量することで、人工臓器の抗血栓性評価に応用可能であることを示した。ルシフェリンの発光現象を利用した抗血栓性評価法は、人工臓器の抗血栓性を短時間で評価できる可能性を示し、動物実験の代替法としての有効性を示した。

以上、本論文は、血清を用いた脱細胞化組織作製法の開発および人工臓器の抗血栓性評価法の開発を行い、いずれの研究成果も、実用化に向けては更なる検証が必要であるが、再生医療の発展に寄与する有意義なものであると判断できる。従って、本論文は、博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。