

学位論文

「三次元高密度培養法を用いた肝組織の再構成」

DM06033 細谷 智

北里大学・大学院・医療系研究科・医学専攻博士課程・臨床医科学群 外科学

指導教授 渡邊 昌彦
北里大学大学院医療系研究科
医学専攻博士課程
臨床医科学群 外科学

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 旨

目的：高密度コラーゲン細線維モデル組織間に培養ヒト肝癌由来細胞(HepG2)を包埋して肝組織（高密度サンドイッチ型包埋肝組織）の再構成を試みた。

方法：アテロ I 型コラーゲン(0.5mg/ml)を含む氷冷した DMEM 液 45ml を環流した。環流開始 1 時間後に包皮由来線維芽細胞(HFO; 1.0×10^7)懸濁液 5ml をリザーバーボトルに投入して環流を継続した。環流開始 5 時間後に DMEM 液 45ml に交換してヒト肝癌由来細胞(HepG2; 3.0×10^7) 懸濁液 5ml をリアクターチャンバー上流から 5 分間かけて投入した。環流開始 8 時間後には氷冷したアテロ I 型コラーゲン(0.25mg/ml)を含む DMEM 液 50ml に交換して環流を継続した。環流開始 11 時間後に再構成した高密度サンドイッチ型包埋肝組織を PLA シートとともに新しいステンレス鋼製シリンダーに移し、DMEM 液 50ml にて 3 日間環流した。

高密度サンドイッチ型包埋肝組織は定法に従って固定、脱水、包埋、薄切、染色して走査あるいは透過電顕的、光顕的に観察した。

結果：高密度サンドイッチ型包埋肝組織は白色で光沢のある直径 17mm 厚さ 0.5-1.0mm の円盤状組織を構成していた。高密度サンドイッチ型包埋肝組織は 2 枚の高密度コラーゲン細線維層（厚さ 0.1-0.3mm）をそれに挟まれた細胞層（厚さ 0.2-0.3mm）から構成されていた。透過電顕で観察したところ球状ないし卵円状の HepG2 細胞内には多くの粗面小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置が観察された。細胞間には毛細胆管が観察された。

結論：高密度培養システムを用いることにより 11 時間で HepG2 細胞($2.0-3.0 \times 10^7$)を再構成した高密度コラーゲン組織内に包埋することが出来た。本研究により 11 時間で人工肝組織を再構成することができ、実験動物の代替組織や部分肝移植などに応用可能と思われる。

目次

	頁
1. 序論	
1-1. 肝細胞外マトリックス	1
1-2. コラーゲンの細線維形成	1
1-3. 人工肝臓	1
2. 方法	
2-1. 概略	2
2-2. 細胞培養	2
2-3. 高密度培養システム	3
2-4. 高密度組織の作成	3
2-5. 形態学的解析	3
2-6. ヒトアルブミン定量	4
3. 結果	
3-1. 単層培養した HepG2 細胞の形態	4
3-2. 人工肝組織および HepG2 細胞の形態	4
3-3. アルブミン産生能	4
4. 考察	
4-1. 再構成肝組織の形態	5
4-2. HepG2 細胞の極性発現	5
4-3. 足場材料としてのコラーゲン細線維網	5
4-4. アルブミン産生	6
5. 総括	6
6. 今後の課題	
6-1. 実験動物への移植	6
6-2. 肝以外の人工組織	6
6-3. 大型人工組織の作成	6
7. 謝辞	7
8. 引用文献	7

9. 業績目録	8
10. 図表	9

1. 序論

1-1. 肝細胞外マトリックス

ヒト成人の肝臓の重量は 1.0-1.5kg あり、肝臓の機能を担う肝実質細胞、Kupffer 細胞、Ito 細胞、血管内細胞、樹状細胞及びナチュラルキラー細胞など複数の細胞から構成されている。肝実質細胞を一辺 10 μ m の立方体とすると、およそ 1.5 $\times 10^{12}$ 個(1.5 兆個)の細胞から構成されている (Ham & Cormack 1979, 図 1)。

肝臓を光学顕微鏡的に観察すると幅 1mm、長さ 2mm 程度の組織塊 (肝小葉) が多数集合して肝臓を構成している事がわかる。肝小葉は周囲を小葉間結合組織と呼ばれる結合組織によって囲まれ、その集合体を結合組織と腹膜からなる被膜によって被包されている (図 2)。肝臓は細胞外マトリックス(ECM)が少ない臓器であるが、それでも湿重量当たり 5.5mg/g 程度のコラーゲンを持っている (Roykind M, Ponce-Noyola 1982)。肝臓を鍍銀法によって染色すると肝小葉内には黒色の細網線維が観察され、このわずかな ECM が肝小葉内の肝細胞索と類洞と呼ばれる毛細血管の間にあたかも骨格を成すように分布している (図 3)。細網線維は類洞と平行する線維と輪状に取り巻いている線維から構成され、III 型および V 型コラーゲンから構成されている (Adachi et al., 1991, 図 4)。このような肝細胞外マトリックスを再構成することは困難であることから、界面活性剤などにより細胞を取り除いた肝細胞外マトリックスを用いた臓器再生が試みられている。しかしながら正常な肝臓を犠牲にしなければならないこと、病原微生物が残存する可能性などからいまだ実験段階にとどまっている。

このように肝細胞外マトリックスにおいてもコラーゲン細線維がその重要な役割を担っている。肝臓に分布するコラーゲンの中で I 型コラーゲンが最も多く 2.0mg/g 程度であり、主に小葉間結合組織と肝被膜に多く分布している (Roykind M, Ponce-Noyola 1982)。

1-2. コラーゲンの細線維形成

コラーゲンはグリシンを多く含み、三つのサブユニットからなる長さ 300nm、太さ 1.5nm の棒状タンパク質である。コラーゲンはプレプロコラーゲンとして合成され、プロセッシング過程を経てトロポコラーゲンとなる (図 5)。トロポコラーゲンは重合して細線維を形成するが、この重合過程は溶液の pH と温度によって影響を受ける。コラーゲン細線維が形成されると溶液が白濁することから、濁度の変化を持って細線維形成の進行を測定することが出来る。その重合過程は I 型コラーゲン細線維の場合 15 分程度の lag phase と細線維が伸長する growth phase を経て 24 時間程度で濁度変化が停止し (equilibrium phase) 線維形成過程が終了する (図 6)。

コラーゲン細線維の形成過程を暗視野顕微鏡下に観察するとその初期においては鋭端と鈍端のことなった形態の終端を持っている。細線維は鋭端側に伸長するが、遅れて鈍端側にも小型の鋭端が出現して両方向に伸長する (安達 他 2000, 図 7)。すなわちコラーゲン溶液を pH7.4, 37 $^{\circ}$ C に保つことにより細線維が形成される。本研究では細胞が生存可能な条件で線維形成が行われることを利用して細胞を播種した高密度コラーゲン組織の作成を行った。

1-3. 人工肝臓

Dunn ら(1989, 1992)は培養肝細胞を 2 層の I 型コラーゲン細線維のモデル組織間に封入すること (サンドイッチ型包埋肝組織) によって毛細胆管を再構成し、42 日間アルブミン合成能が維持

されることを報告している。これらのことから I 型コラーゲン細線維から構成されるモデル組織には肝細胞の生存と機能発現を維持する作用があると言える。Dunn らの用いたモデル組織はコラーゲン濃度 1.1mg/ml の培養液から作成されていることからコラーゲン濃度も同程度であると考えられる。一方、真皮のコラーゲン濃度は 200mg/ml 程度(Shuster et al., 1975)であるから Dunn らの用いたモデル組織は肝臓の結合組織に比べてコラーゲン細線維密度の低く、低密度サンドイッチ型包埋肝組織と言える。

本学の細胞組織再生医学研究室において開発した高密度培養システムを用いて 200mg/ml 程度の高密度コラーゲン組織を再構成する方法(安達 他 2011)が開発された。そこで高密度コラーゲン細線維モデル組織間に培養ヒト肝癌由来細胞(HepG2)を包埋して肝組織(高密度サンドイッチ型包埋肝組織)の再構成を試みた。高密度サンドイッチ型包埋肝組織はより肝臓に近い組織として包埋細胞の生存性や特異機能が維持され、また機械的強度が充分であることから移植手術などに際して取り扱いが容易と期待される。

2. 方法

2-1. 概略

ラジアルフロー型リアクター; (BKR05 ABLE Biott JPN)を用いて、PLA シートを支持体とし、肝癌細胞樹立株 (HepG2)、線維芽細胞樹立株 (HFO)を I 型コラーゲン含有培養液 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM) と共に循環して人工肝組織を再構成した。アテロ I 型コラーゲン (0.5mg/ml) を添加した 50ml の DMEM 液で 6 時間環流中に HFO 細胞を閉鎖循環回路内に投入する。新調した 50ml の DMEM 液にて 2 時間環流中に HepG2 細胞あるいは HepG2 細胞と HFO 細胞を投入して先に作成したコラーゲン細線維と HFO 細胞からなる人工結合組織上に細胞層を形成させる。最後にアテロ I 型コラーゲン (0.5mg/ml) を添加した 50ml の DMEM 液に交換して細胞層上にコラーゲン細線維層を形成させた。環流液交換毎に残存する細胞数を計測したところ、投入した細胞の 80-90%は人工肝組織に取り込まれていた(表 1)。計 11 時間環流した後 PLA シート上に作成された人工肝組織を新たに用意したリアクター内で 3 日間環流培養した。12 時間毎に環流液を採取して ELISA キットにてアルブミンを定量した。環流培養 3 日にて人工肝組織を固定し形態学的に解析した。

2-2. 細胞培養

肝細胞癌樹立細胞株(HepG2)

原発性肝芽細胞種より、1975 年に Aden らにより樹立された細胞株をヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSRRB)より購入した。225cm²プラスチックフラスコ内に 5×10⁵ 個を播種。培地は 10%FBS 含有 DMEM を用いて 37°C,5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った。

正常線維芽細胞株(HFO)

ヒト正常皮膚より樹立された細胞株を資生堂研究所の天野博士より分与を受けた。225cm²プラスチックフラスコ内に 5×10⁵ 個を播種。培地は 10%FBS 含有 DMEM を用いて 37°C,5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った。

2-3. 高密度培養システム

本研究で用いた高密度培養システムは環流培養装置でありリザーバーボトル、定量送液ポンプ、リアクターチャンバーとそれぞれを連結するチューブから構成されている(Iwashiro et al., 2011, Tamai et al., 2013)。高密度培養システムは細胞培養用インキュベーター内に置いて使用し、アテロ I 型コラーゲン(0.5mg/ml)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)を環流してコラーゲン細線維や細胞を PLA シート上に集簇させることが出来る。リアクターチャンバーは直径 20mm、高さ 17mm で内部にステンレス鋼製シリンダーを配している。ステンレス鋼製シリンダー内縁には幅 2mm のリブがありその下部には 3 か所の環流用ウィンドウが開けられている。リブ上にはポリ乳酸系製のメッシュシート (PLA シート) を制流部材として配し、コラーゲン細線維と細胞が凝集して高密度サンドイッチ型包埋肝組織が形成される構造である。

2-4. 高密度組織の作成

アテロ I 型コラーゲン(0.5mg/ml)を含む氷冷した DMEM 液 45ml を環流した。環流開始 1 時間後に包皮由来線維芽細胞(HFO; 1.0×10^7)懸濁液 5ml をリザーバーボトルに投入して環流を継続した。環流開始 5 時間後に DMEM 液 45ml に交換してヒト肝癌由来細胞(HepG2; 3.0×10^7)と線維芽細胞(HFO; 3.0×10^6)あるいはヒト肝癌由来細胞(HepG2; 3.0×10^7)の懸濁液 5ml をリアクターチャンバー上流から 5 分間かけて投入した。環流開始 8 時間後には氷冷したアテロ I 型コラーゲン(0.25mg/ml)を含む DMEM 液 50ml に交換して環流を継続した。環流開始 11 時間後に再構成した高密度サンドイッチ型包埋肝組織を PLA シートとともに新しいステンレス鋼製シリンダーに移し、DMEM 液 50ml にて 3 日間環流した。(図 8)

2-5. 形態学的解析

高密度コラーゲンゲル包埋人工肝組織は Zamboni 液(0.2%picric acid, 4%paraformaldehyde, 0.5%glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer)で固定した。顕微鏡観察には、MilliQ 水で洗浄、パラフィン包埋し、約 8 μ m 厚の薄切標本を作製した。標本はキシレンによる脱パラフィンをし、100~50%エタノール下降系列に浸漬させ親水化をした。カラッチのヘマトキシリンにて核染色をし、水洗後エオジンにて対比染色をおこなった。

走査型電子顕微鏡観察には単層培養した HepG2 細胞または高密度培養装置にて 3 日間環流培養した人工肝組織を Zamboni 固定液にて 6 時間浸漬し、0.1MPB(pH7.4)で洗浄後、人工肝組織中央部を短冊状に細切し、2%OsO₄, 0.1MPB にて 1 時間後固定し、臨界点乾燥、白金コーティングを施した。人工肝組織は内部を観察するため、25%、50%DMSO に、それぞれ一晩浸漬させ、液体窒素中にて凍結切断を行った。その後、50%~90%EtOH にて脱水し、t-ブチルアルコールに置換後、凍結乾燥機 (Eiko IP-2 型) を用いて凍結乾燥した。凍結切断面を表面にして試料台に固定した後、白金コーティングを施し、走査電子顕微鏡 (JEOL JSM6360) にて観察した。

透過型電子顕微鏡観察にはコラーゲンゲルを、Zamboni 固定液に 24 時間浸漬し、0.1MPB で洗浄後、細切した。その後、2%OsO₄, 0.1MPB にて 1 時間後固定を行い、1%タンニン酸に 1 時間浸漬、50%~100%EtOH にて脱水の後、プロピオンオキサイドに置換し、プロピオンオキサイドと Epon 樹脂の等量混合液に 6 時間浸透させた。組織を Epon 樹脂に包埋し、45℃で 24 時間、60℃で 3 日間と樹脂を重合させた。樹脂の厚切り切片を作製し、0.1%トルイジンブルー、1%ホウ

酸ナトリウム溶液にて染色した。超薄ミクロトームで薄切後、4%酢酸ウランと Reynolds'クエン酸鉛で二重染色した。その後、カーボンコーティング (EDWARDS CC-40F) を施し、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1230 型) にて観察した。

2-6. ヒトアルブミン定量

人工肝組織を3日間環流培養したのちアルブミンを定量するため環流液を4ml採取した。採取した環流液は上澄みはヒトアルブミン濃度定量まで -65°C で保存した。比較対象として培養皿上でコンフルエントに達した HepG2 細胞を3日間培養し、その培養液を4ml採取した。試料を採取後トリプシン-EDTA 処理をして HepG2 細胞を剥離して細胞数を計測した。採取した試料はサンドイッチ酵素結合抗体免疫測定法 (ELIZA) キット (Abnova 社、台北、台湾) を用いて定量した。アルブミンの分泌量は HepG2 細胞数(10^6)あたりに換算した。

3. 結果

3-1. 単層培養した HepG2 細胞の形態

HepG2 細胞を培養するとその底面で広くプラスチック皿表面に接着して伸転し $20\text{-}30\mu\text{m}$ の多角形をしており、2-3 本の細胞突起を有していた。HepG2 細胞の自由表面には長さ $1.5\mu\text{m}$ 程度の微絨毛が多数観察された。細胞の基底面には接着斑などの構造は観察されなかった。細胞内には楕円形の核、少数の小胞体、ミトコンドリアおよびゴルジ装置が観察された。HepG2 細胞間には糸状偽足による嵌合が観察されるも、接着帯などの細胞間結合装置は観察されなかった (図9)。

3-2. 人工肝組織および HepG2 細胞の形態

高密度サンドイッチ型包埋肝組織は白色で光沢のある直径 17mm 厚さ $0.5\text{-}1.0\text{mm}$ の円盤状組織を構成していた (図10)。光顕観察の結果、高密度サンドイッチ型包埋肝組織は2枚の高密度コラーゲン細線維層 (厚さ $0.1\text{-}0.3\text{mm}$) とそれに挟まれた細胞層 (厚さ $0.2\text{-}0.3\text{mm}$) から構成されていた (図11)。走査電顕による検索ではコラーゲン細線維層においては直径 200nm 程度のコラーゲン細線維が分枝、会合を繰り返す線維網が観察され、細胞層においては直径 $15\text{-}20\mu\text{m}$ の球形ないし卵円形の HepG2 細胞が凝集していた (図12)。

高密度サンドイッチ型包埋肝組織を透過電顕で観察したところ球状ないし卵円状の HepG2 細胞内には粗面小胞体が $10\text{-}20$ 層重なり、 $0.2\text{-}0.6\mu\text{m}$ のミトコンドリア、5-6 枚の槽から構成されるゴルジ装置が観察された。細胞間にはところどころ径 $0.2\text{-}0.6\mu\text{m}$ の毛細胆管が観察された。毛細胆管内腔には数本の微絨毛が、その隣接部には接着結合 (adherent junction) が観察されたが密着結合 (tight junction) は認められなかった。また HepG2 細胞の自由表面には周期性横紋を持ったコラーゲン細線維が近接して走行していた (図13)。

3-3. アルブミン産生能

HepG2 細胞の3日間培養液中のアルブミン濃度を ELISA 法にて測定した。単層培養した HepG2 細胞は 10^6 個あたりおよそ 190mg であった。一方、HFO 細胞を播種したコラーゲン細線維網の共存下で培養した場合、 10^6 個あたりおよそ $1.4\text{-}1.6\text{mg}$ であった。培養開始直後の培養液からはアルブミンを検出することが出来なかった (表2)。

4. 考察

4-1. 再構成肝組織の形態

本研究により直径 17mm、厚さ 0.5-1.0mm の再構成組織内に HepG2 細胞($2.3-2.6 \times 10^7$)と HFO 細胞($6.0-12.0 \times 10^6$)を 11 時間以内に集積出来ることが示された (図 14)。細胞組織再生医学の開発した高密度集積装置を用いると多数の細胞が 2 層のコラーゲン細線維網間に挟まれた組織となり、肝小葉の様な多角円柱体とは異なっている。しかしながら HepG2 細胞塊がコラーゲン細線維網によって被包されているところから、小葉間結合組織によって被包された肝小葉の基本構造は再現出来ているのではないかと考えられる。生体にある様な肝組織を再構成する目的で生体の肝臓を Sodium Dodecylsulphate (SDS)などの界面活性剤に浸漬して細胞成分を溶解し、肝臓の形状をした肝細胞外マトリックスを播種細胞の足場材料として利用する方法が導入された (Sugimoto et al., 2005; Uygun et al., 2010)。このような脱細胞化 ECM を用いることにより小葉構造を持った肝組織を再構成することが出来る。しかしながら脱細胞化肝 ECM には微量の DNA が残存することから、ウイルスなどの病原体や抗原が再構成組織に導入される可能性がある。脱細胞化 ECM を用いて再構成した組織を移植するに当たってはこれらの問題を解決することが求められる。一方、本研究に用いた高密度培養装置では精製したコラーゲン分子から細線維網を構成するので、病原性 DNA や抗原による汚染を除外することが出来る。

4-2. HepG2 細胞の極性発現

HepG2 細胞は肝癌細胞から樹立された細胞株であり培養が容易でアルブミンを産生することから、発癌研究や肝臓毒性試験に用いられてきた。HepG2 細胞は初代培養肝細胞と同様に細胞同士で凝集してスフェロイドを形成する。高密度培養装置を用いて作成した HepG2 細胞塊においては細胞形態が伸展した状態から球形ないし卵円形に変化した。細胞内には多数の小胞体とミトコンドリア、ゴルジ装置が観察された。一方、培養皿上に播種した HepG2 細胞は底面に接着して伸展するが細胞間には細胞接着構造は観察されなかった、しかし高密度に集積した HepG2 細胞間には毛細胆管が観察されその両端には接着結合が観察されたことから HepG2 細胞はコラーゲン細線維に面した基底側と毛細胆管側が分化して細胞極性が発現したと考えられる。すなわち形態学的には正常肝細胞の特徴を発現したと言える。

4-3. 足場材料としてのコラーゲン細線維網

コラーゲン細線維網は 1-3mg/ml の I 型コラーゲンを含む細胞培養液を 37 °C、30 分インキュベートすることによってゲル状のコラーゲン細線維網を再構成することが出来る。この方法によるコラーゲングルは本研究で用いた高密度培養システムの作成するそれに比して 1/100 程度のコラーゲン密度である。そのような低密度コラーゲングル上あるいは 2 層のコラーゲングルで挟むことにより、生体の肝組織を再現することが知られている。すなわちアルブミン、 $\alpha 1$ -antitrypsin、生体異物を代謝するシトクロム P450 3A4 (CYP3A4)などのメッセージ発現が上昇する (Hamilton et al., 2001; Ambrosino et al., 2005; Tamai et al., 2013)、あるいは細胞が索状に会合して細胞間に毛細胆管が発現すること (Ambrosino et al., 2005) などが報告されている。本研究においても HepG2 細胞塊において毛細胆管が発現していたことから、高密度コラーゲン細線維網(200-300mg/g)は癌化によって失われた正常肝細胞の特性を部分的であるにせよ発現させる作

用を持っていると考えられる。

正常肝細胞、iPS 細胞あるいは ES 細胞を HepG2 細胞に替えて人工肝組織を再構成することにより、移植可能な肝組織を再構成できる可能性が示された。

4.4. アルブミン産生

本研究に用いた HepG2 細胞を培養皿上で培養したところヒト型アルブミンを産生していた。人工肝組織に再構成すると HepG2 細胞 10^6 個当たりの産生量は 1/100 以下に減少していた。再構成肝組織では HFO 細胞を同時に播種しており HFO 細胞が HepG2 細胞の産生するアルブミンを消費した可能性がある。また再構成肝組織内では播種した細胞がコラーゲン細線維網内にあるため皿上培養と比較して低酸素環境にあると推察される。その結果再構成肝組織内の HepG2 細胞が壊死して細胞数が減ったなどの原因が考えられる。これらの可能性を検討するために HFO 細胞を播種しない再構成肝組織を用いてアルブミン産生量を検討する必要がある。

5. 総括

高密度培養システムを用いることにより 11 時間で HepG2 細胞($2.0-3.0 \times 10^7$)を再構成した高密度コラーゲン組織内に包埋することが出来た。本研究により 11 時間で人工肝組織を再構成することができ、実験動物の代替組織や部分肝移植などに応用可能と思われる。

6. 今後の課題

6.1. 実験動物への移植

再構成肝組織の移植可能性を検討するためには高密度培養装置を用いて再構成した肝組織を実験動物に移植してその生着性を検討する必要がある。我々の研究グループで DsRed2 にて標識した HepG2 細胞を用いて肝組織を再構成し、マウス腸間膜に移植したところ移植後 14 日目において移植部位に DsRed2 の特異蛍光を持った細胞塊が観察された (図 15)。また移植片の周囲には多数の毛細血管が観察された事より、被包したコラーゲン細線維網は被移植動物の血管新生を誘導する可能性がある (Tamai et al., 2013)。

6.2. 肝以外の人工組織

HFO 細胞を播種した高密度培養装置を用いて再構成したコラーゲン細線維網は生体の結合組織に類似した組織構造を持っている。そこで再構成結合組織上にヒト表皮細胞を播種したところ重層扁平上皮を再構成することが出来た (図 16)。再構成結合組織として鼓膜穿孔部の補修材としての有用性を検討したところ、鼓膜穿孔部を閉鎖し移植片内に毛細血管の申請が認められた (図 17)。この事より高密度培養装置により再構成した結合組織は肝以外の組織再構成にも有用であることが示された (未発表)。

6.3. 大型人工組織の作成

ヒトの肝臓はおよそ 1.4kg であるが、本研究によって再構成できた肝組織はおよそ 0.5g であった。再構成肝組織を臨床応用するに当たっては大型組織を再構成できるよう装置の大型化などを図る必要がある。そこで大型化したバイオリクター (図 18) を用いて結合組織の再構成を試みた。その結果およそ 4 倍の面積を持つ結合組織を再構成することが出来た (図 19, 未発

表)。走査型電子顕微鏡観察の結果、ほぼ同様なコラーゲン細線維網が観察された。今後の利用拡大を展望すると単に大型化するだけでなく円筒形や球形の人工組織再構成が可能なリアクターの開発が望まれる。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり直接のご指導、ご鞭撻を賜りました 渡邊 昌彦 教授 に心から感謝いたします。また、実験技術、知識等ご支援いただきました、北里大学大学院医療系研究科細胞組織再生医学および東京工業大学大学院生命理工学研究科・生体分子機能工学専攻の皆様にも感謝いたします。

8. 引用文献

- Ham AE, Cormack DH 22 The pancreas, liver, and gallbladder. In: Ham AE, Cormack DH, eds. Histology, 8th edition. Philadelphia and Tront: J.B. Lippincott; 1979. p.694-724.
- Roykind M, Ponce-Noyola P The extracellular matrix of the liver. Collagen Relat Res 1982;2:151-175.
- Adachi E, Hayashi T, Hashimoto PH A comparison of the immunofluorescent localization of collagen types I, III, and V with the distribution of reticular fibers on the same liver sections of the snow monkey (*Macaca fuscata*). Cell Tissue Res 1991;264:1-8.
- 安達栄治郎、鈴木伸英、中里浩一：コラーゲン細線維の形成とその制御。
生体材料 2000;18(1):24-32.
- Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. FASEB J. 1989 Feb;3(2):174-7.
- Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. J Cell Biol. 1992 Feb;116(4):1043-53.
- Shuster S, Black MM, McVitie E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. Br J Dermatol. 1975 Dec;93(6):639-43.
- 安達栄治郎、大橋しほ花、平井和弥：高密度培養組織の製造方法及び高密度培養組織（特願 2005-38261：出願日 2005 年 2 月 15 日；国際出願番号：PCT/JP2006/302561、2006 年 2 月 14 日；国際公開番号：WO2006/088029、2006 年 8 月 24 日；第 4671365 号；平成 23 年 1 月 28 日）
- Iwashiro H, Hosoya S, Hirai K, et al. Characterization of dense artificial connective tissues generated in a newly designed bioreactor. Connect Tissue Res 2011;52:340-52.
- Tamai M, Adachi E, Tagawa Y. Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblasts in dense collagen fibrils. Tissue Eng Part A 2013;19:2527-35.
- Sugimoto S, Harada K, Shiotani T, et al. Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver tissues. Tissue Eng 2005;11:626-33.
- Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. Nat Med;

2010;16:814-20.

Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplant* 2005;14:151-7.

Hamilton GA, Jolley SL, Gilbert D, et al. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res* 2001;306:85-99.

9. 業績目録

【原著論文】

- 1, Hosoya S, Watanabe M, Ueno M, Adachi E: Hepatoblastoma derived cells (HepG2) can restore the normal liver morphology by culture in 3D collagen gels. *Kitasato Medical Journal* 2013 accepted for publication.
2. Iwashiro H, Hosoya S, Hirai K, Mima T, Ohashi S, Aihara T, Ito S, Ohara S, Adachi E: Characterization of dense artificial connective tissues generated in a newly designed bioreactor. *Connective Tissue Research* 52(4), 340-352, 2011.

【学会発表】

1. Adachi E, Takashi Aihara T, Hosoya S and Iwashiro H: Restoration to a contractile phenotype from dedifferentiated status of smooth muscle cells in layered vascular constructs. July 22-27, 2007 New London, New Hampshire, Gordon Research Conference on Collagen (Collagen Gordon Research Conference 2007 Poster Sessions p.1).
2. Hosoya S, Tamai M, Iwashiro H, Kikuchi S, Ueno M, Akaike T, Tagawa Y, Watanabe M, Adachi E: Characterization of HepG2 cells accumulated on collagen gels populated with fibroblasts as hepatic tissue substitutes. July 19-24, 2009 New London, New Hampshire, U.S.A. Gordon Research Conference on Collagen (Collagen Gordon Conference: List of Posters p.1).
3. Tamai M, Hosoya S, Akaike T, Adachi E, Tagawa Y: Establishment of the High Density Culturing System Using Primary Culture of Hepatocyte, 2nd World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) *in conjunction with* 2009 Seoul Stem Cell Symposium, 2009 Aug. 31-Sept. 3, Seoul (Poster)
4. 細谷 智、岩城啓修、菊池史郎、上野正樹、玉井美保、田川陽一、渡邊昌彦、阿達栄治郎：高密度培養法を用いた複合型人工肝組織の再構成 第8回再生医療学会総会 2009年3月5-6日 東京
5. 玉井美保、細谷 智・赤池敏宏、安達栄治郎、田川陽一：初代培養肝細胞を用いた再構成コラーゲンゲル内培養の検討 第16回肝細胞研究会 2009年6月26-27日 山形
6. 玉井美保、細谷 智、赤池敏宏、安達栄治郎、田川陽一：再構成コラーゲンゲルの構築による初代培養肝細胞の3次元組織化 第31回日本バイオマテリアル学会大会 2009年11月16-17日 京都

【特許】

安達栄治郎、松下 治、岩城啓修、細谷 智、西 望：積層型高密度培養人工組織の製造方法及び積層型培養人工組織（特願 2009-017475：出願日：2009年1月29日）

10. 図表

表 1: 再構成肝組織に取り込まれた細胞数

	HepG2($\times 10^6$)	Yield(%)	HFO ($\times 10^6$)	Yield(%)
HepG2 & HFO	24.5 (n=3)	82	11.4 (n=3)	88
HepG2	25.5 (n=3)	85	8.2 (n=3)	82

表 2: 環流培養3日間のアルブミン産生量

	Albumin (ng/ 10^6 HepG2/3days)
HepG2 & HFO	1.4 (n=3)
HepG2	1.6 (n=3)
HepG2 on dish (3 d.)	378.6
HepG2 on dish (0 d.)	0.0

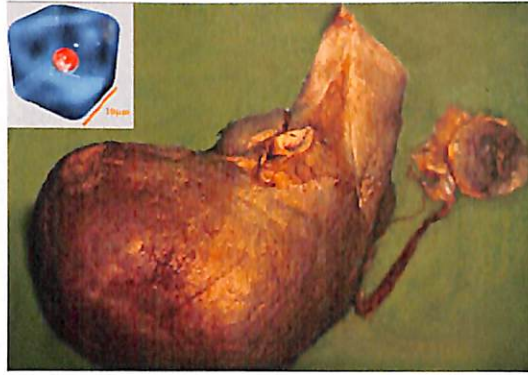


図1. ヒト成人肝臓

肝細胞の大きさを $10\mu\text{m}$ (10^{-3}cm) の立方体 (枠内) と仮定すると細胞1個当たりの重量は $1.06 \times 10^{-9}\text{g}$ であるから、約 1400g の肝臓は 1.5×10^{12} 個 (1.5兆個) の細胞から構成されていると言える。しかし Kupffer 細胞や Ito 細胞などの非実質細胞やコラーゲンなどの細胞外マトリックスも肝組織の構成に与っている。臨床応用するにあたっては移植肝組織のサイズも重要である。

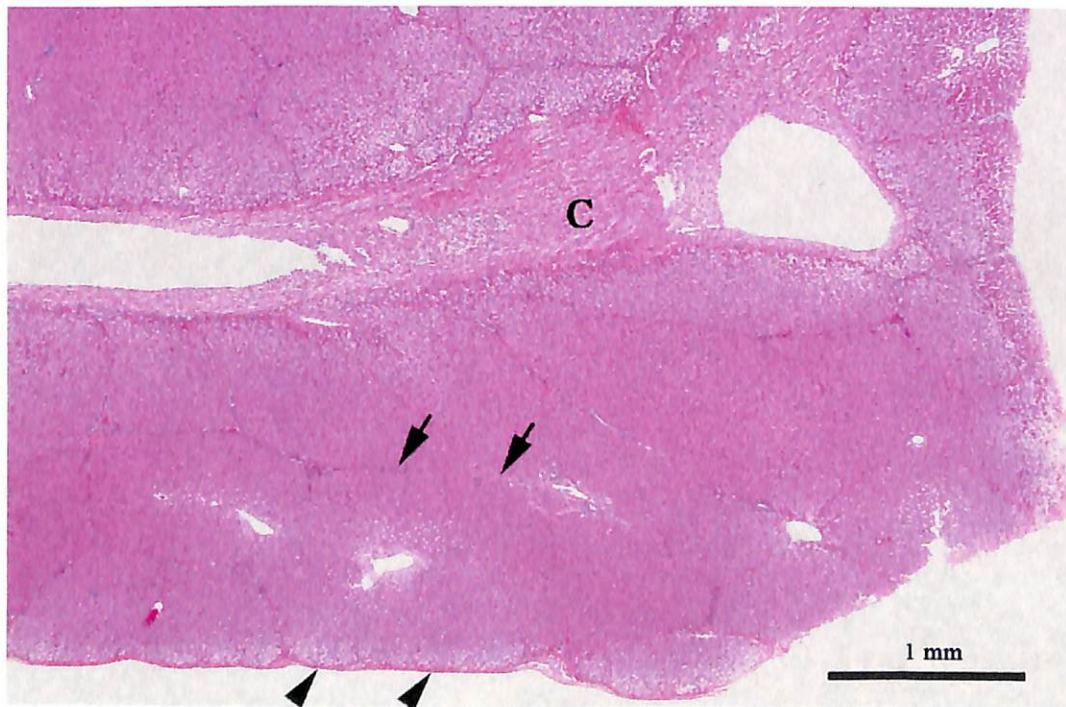


図2. ブタ肝臓の光学顕微鏡像

肝組織は結合組織と腹膜上皮からなる被膜 (矢尻) に包まれ、組織内は小葉間結合組織 (矢印) によって分割されている。C: 血管を伴った葉間結合組織。 Hematoxylin-Eosin 染色 スケールは 1mm

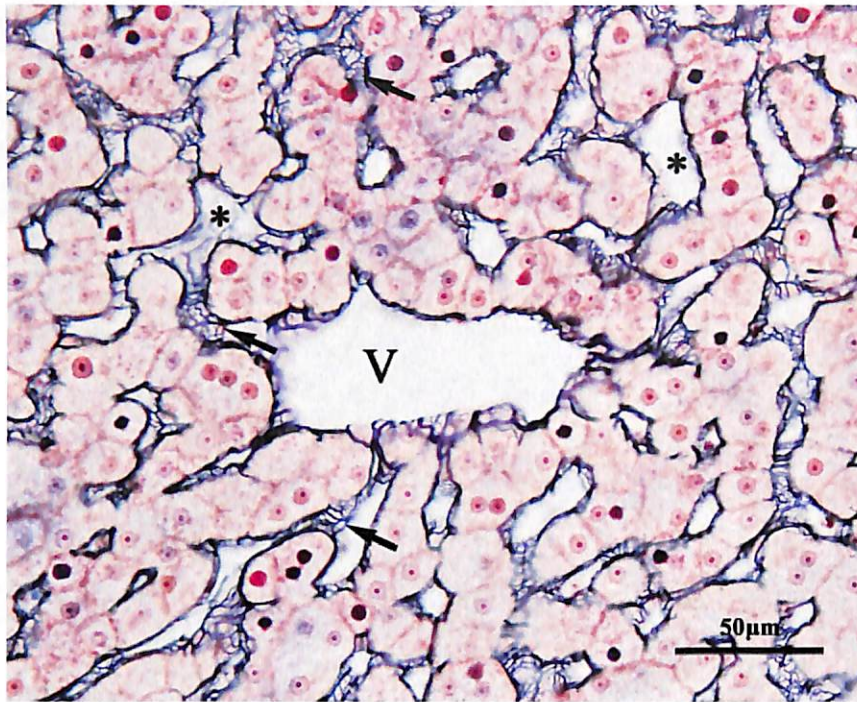


図3. サル肝臓の光学顕微鏡像

安達栄治郎氏より

肝小葉内細胞外マトリックスには細網線維と呼ばれる細いコラーゲン細線維 (矢印) が分布している。細網線維は肝細胞索と類洞 (アステリスク) 内皮細胞の間隙 (Disse 腔) に沿って格子状の細線維網を形成する。V: 中心静脈。鍍銀染色。スケールは 50 μ m

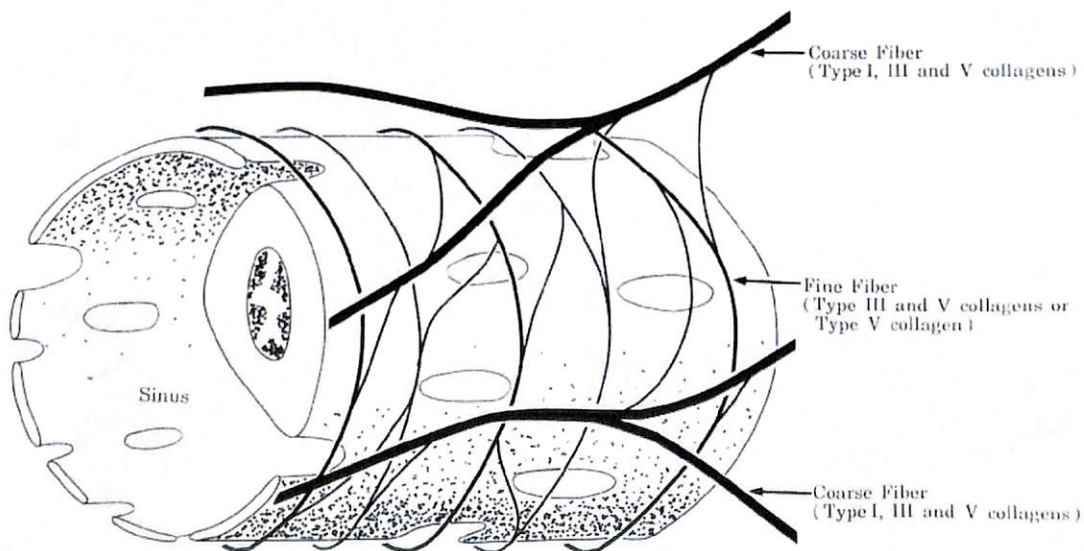


図4. サル肝臓の類洞周囲腔に分布する細網線維の模式図

安達栄治郎氏より

類洞の長軸にそって走行する比較的太い細網線維は I 型、III 型、V 型コラーゲンの混合細線維によって、類洞を取り巻く細い細網線維は III 型、V 型コラーゲンの混合細線維によって構成されている。

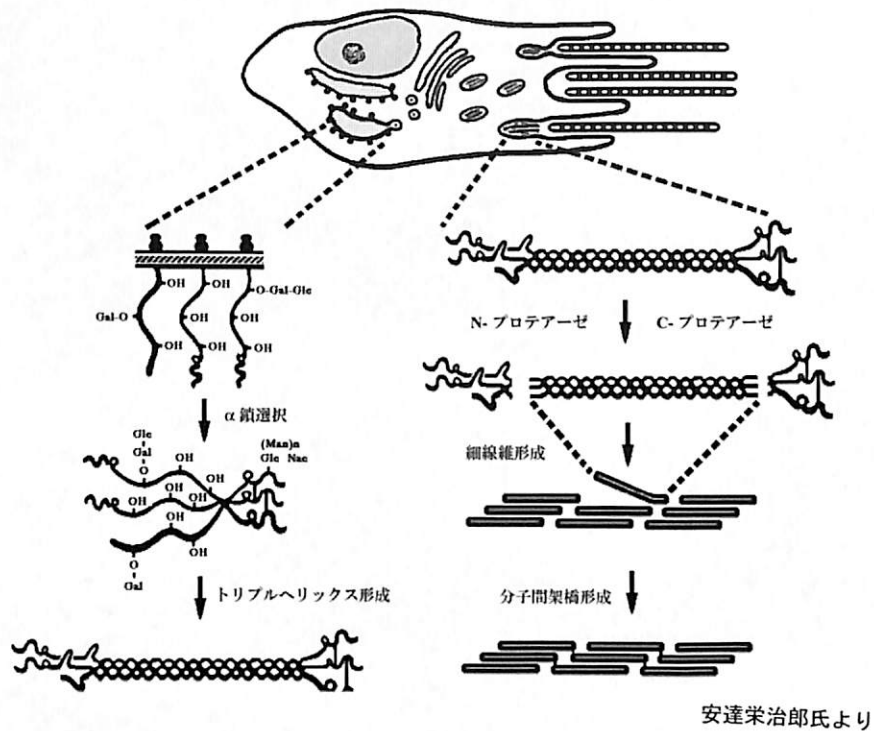


図5. コラーゲンの合成と細線維形成過程を示す模式図

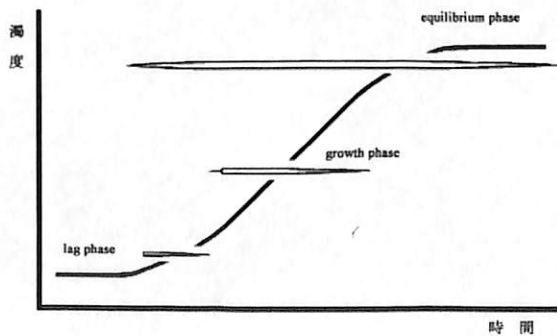


図6. I型コラーゲン細線維形成過程における溶液の濁度変化模式図
I型コラーゲンの中性溶液を37℃でインキュベーションすると最初の15-30分では濁度変化は認められないがその急速に濁度が上昇し、ほぼ24時間で細線維形成は終了する。

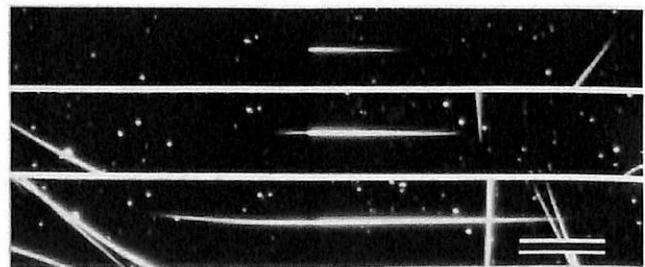


図7. I型コラーゲン細線維形成過程の暗視野顕微鏡像
I型コラーゲンの中性溶液を37℃でインキュベーションすると鋭端と鈍端をもった細線維が観察される。鈍端からは小型の鋭端が出現すると、両方向に細線維が伸長する。スケールは100μm

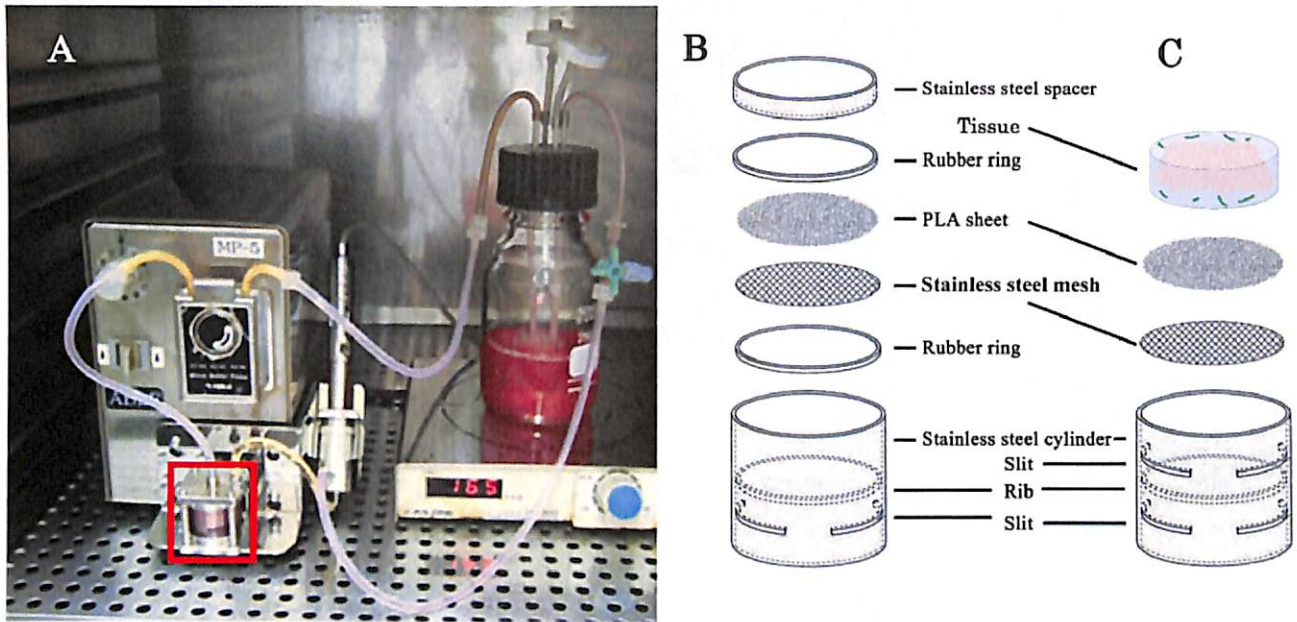


図8. 高密度培養システムの写真とバイオリアクター内部の模式図

A: 高密度培養システムは赤枠内のバイオリアクターと環流ポンプ、リザーバー瓶、溶存酸素濃度計およびマグネットスターラーから構成されている。

B: バイオリアクター内に留置したシリンダーの構成を示す。内筒には幅2 mmのつばがありその下方に環流液が流出するスリットが設けられている。ここにシリコンゴムリング、ステンレス鋼製メッシュ、ポリ乳酸 (Poly Lactic Acid; PLA) シート、シリコンゴムリング、ステンレス鋼製スペーサーを配置する。環流液は上方から下方に向けて PLA シート抜けて流れる。図7で示したようなコラーゲン細線維は PLA シート上に蓄積してゲル状の結合組織が形成される。

C: 11 時間環流して PLA シート上に再構成された人工組織は環流による水圧を避けるためつばの上下にスリットをもったシリンダーに移し、3 日間環流培養を行う。

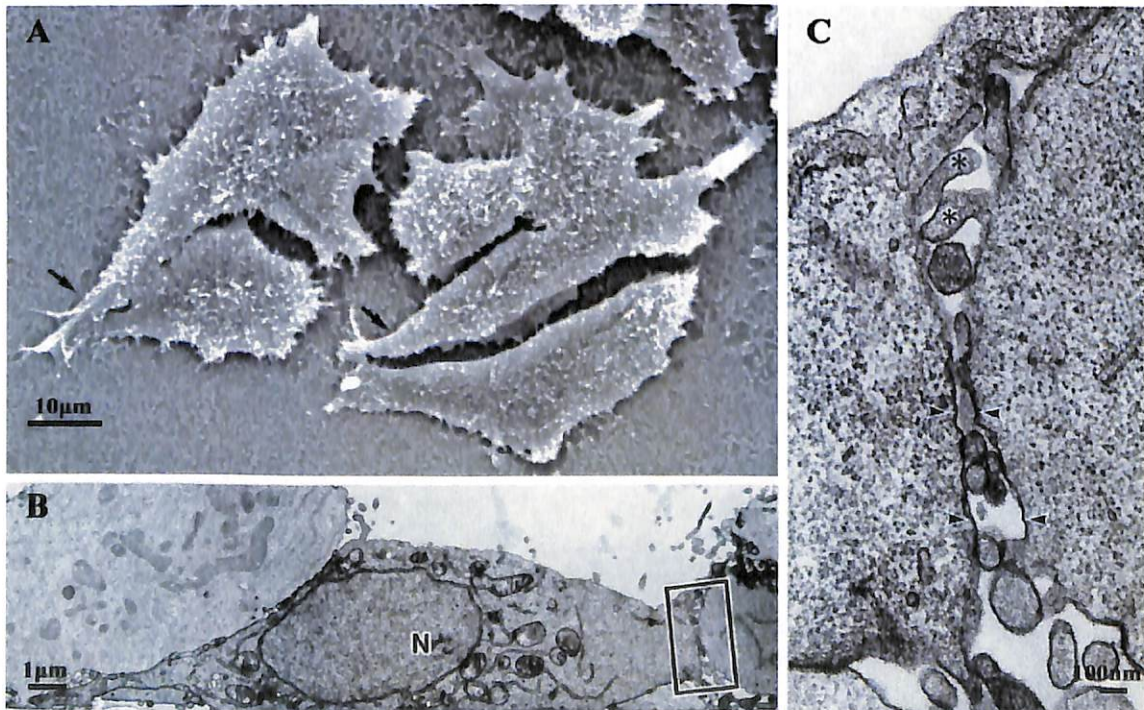


図9. 培養皿状に接着・進展した HepG2 細胞の走査型 (A) および透過型電子顕微鏡像 (B, C)

A: HepG2 細胞は進展し細胞突起 (矢印) を伸長させている。スケールは 10µm

B: HepG2 細胞は卵円形の核 (N) を持ち、細胞質には粗面小胞体、ミトコンドリアおよびゴルジ装置が観察される。スケールは 1µm

C: 図 B の枠内の拡大像を示す。HepG2 細胞の細胞間には多数の細胞突起 (*) が観察されるが、細胞接着構造は認められなかった。矢印: は、HepG2 細胞膜を示す。スケールは 100nm

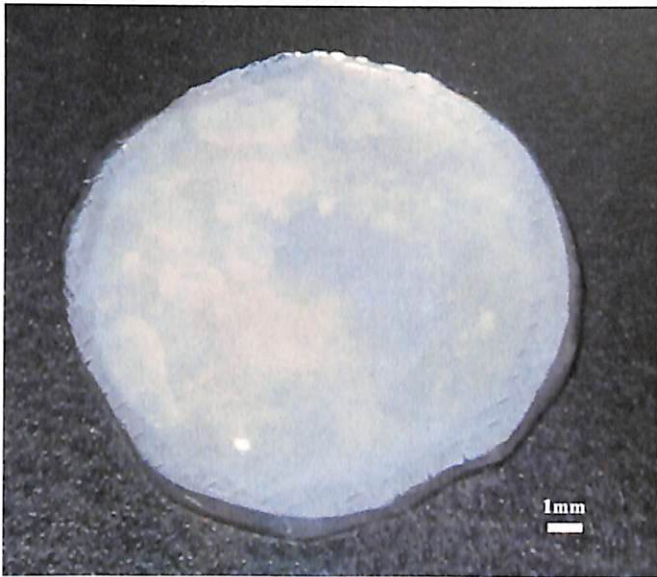


図10. 再構成肝組織の全体像

11時間環流して作成した人工肝臓は、艶のある白色のゲル状組織である。直径は17mm 厚さ0.5-1mmである。スケールは1mm

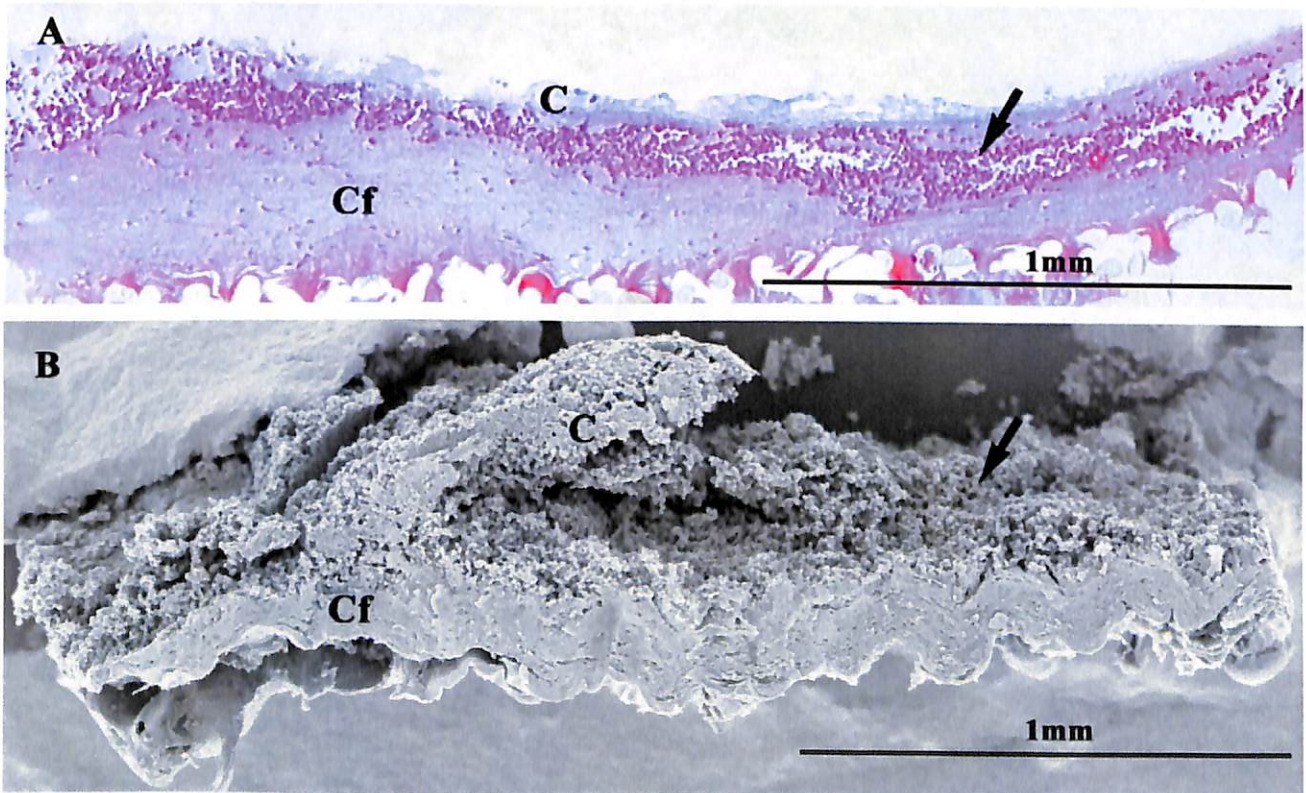


図11. 3日間環流した再構成肝組織の形態

A: 再構成肝組織の光学顕微鏡像を示す。密集した細胞層(矢印)が2層のコラーゲンゲル層の狭間に分布している。

B: 再構成肝組織の操作型電子顕微鏡像を示す。密集した細胞層(矢印)が2層のコラーゲンゲル層の狭間に分布している。

スケールは1mm C: コラーゲン層 Cf: HFO細胞を播種したコラーゲン層

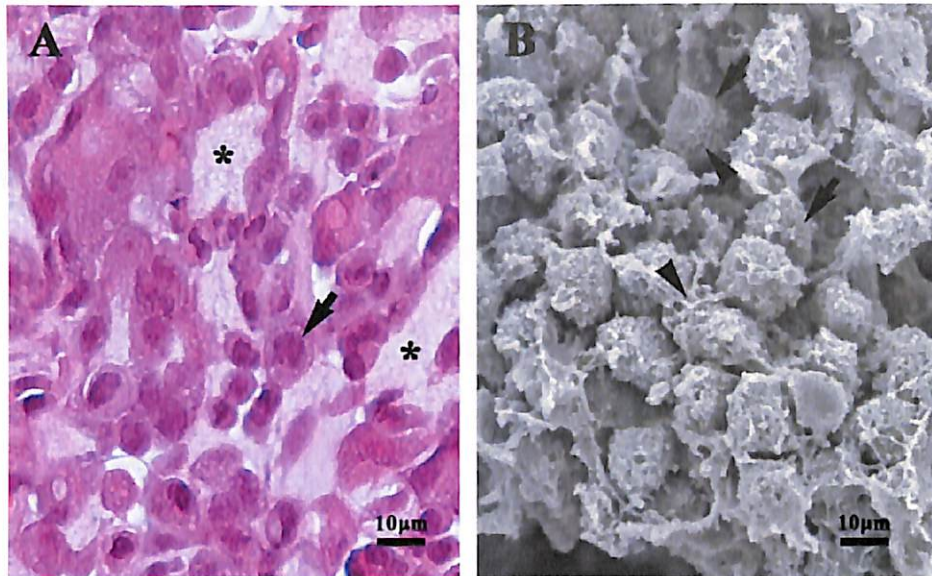


図12. 3日間環流した再構成肝組織の形態

A: 再構成肝組織の光学顕微鏡像を示す。密集した細胞塊(矢印)とコラーゲングル塊(*)が観察される。

B: 再構成肝組織の操作型電子顕微鏡像を示す。密集した細胞(矢印)は球形ないし卵円形の形態をとりその表面には、コラーゲン細線維(矢尻)が観察された。

スケールは10mm

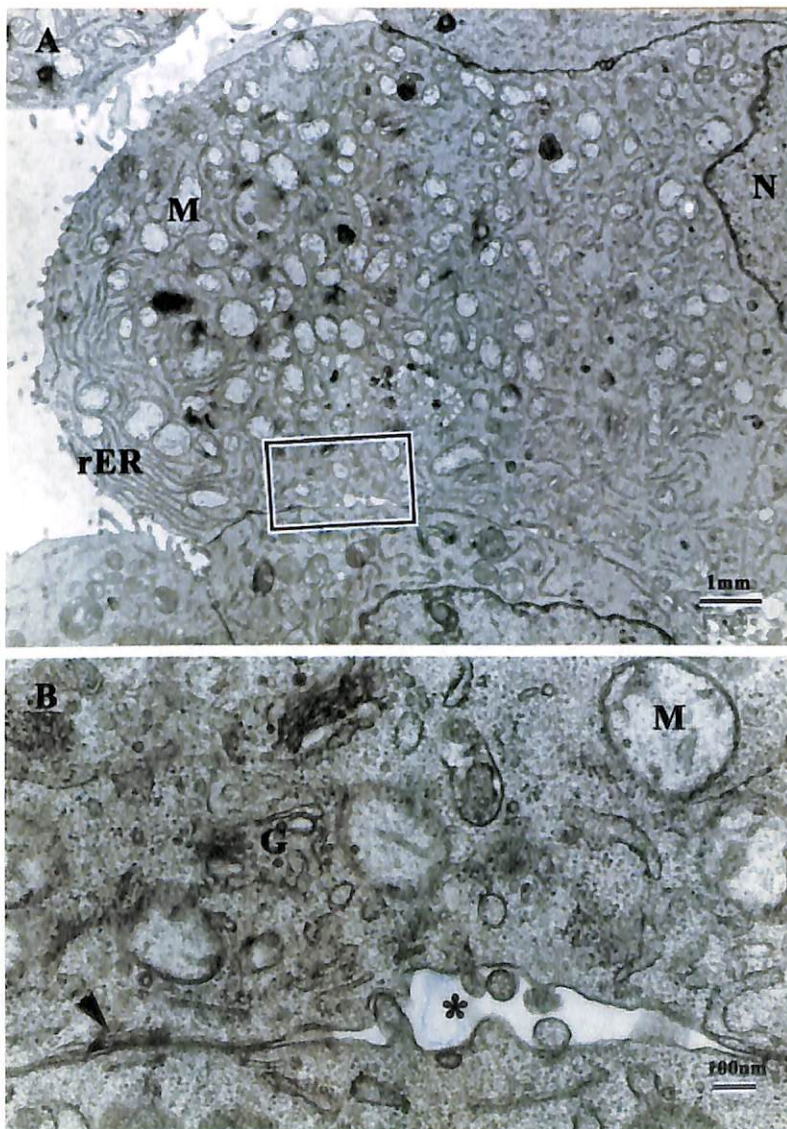


図13. 3日間環流した再構成肝組織の透過型電子顕微鏡像

A: 細胞質内には、多数のミトコンドリア(M)、粗面小胞体(rER)、ゴルジ装置及びライソソームが観察される。N: 各スケールは1mm

B: 図Aの枠内を示す。毛細管(*)、接着班(矢尻)、が観察される。毛細管腔には、微絨毛も観察される。G: ゴルジ装置 M: ミトコンドリア

スケールは100nm

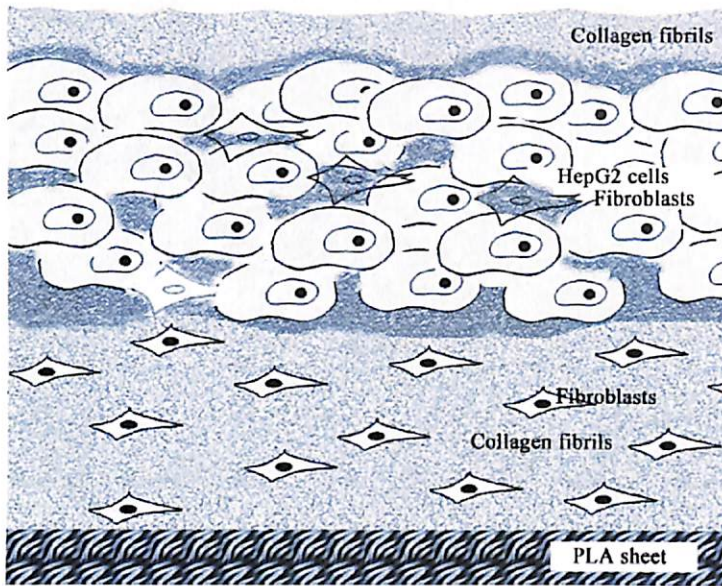


図 14. 再構成肝組織の模式図

PLA シート上に三つの層を 11 時間以内に重畳することが出来た。第 1 層は線維芽細胞を播種したコラーゲン層、第 2 層は HepG2 細胞と線維芽細胞の集積層、第 3 層はコラーゲン細線維層である。

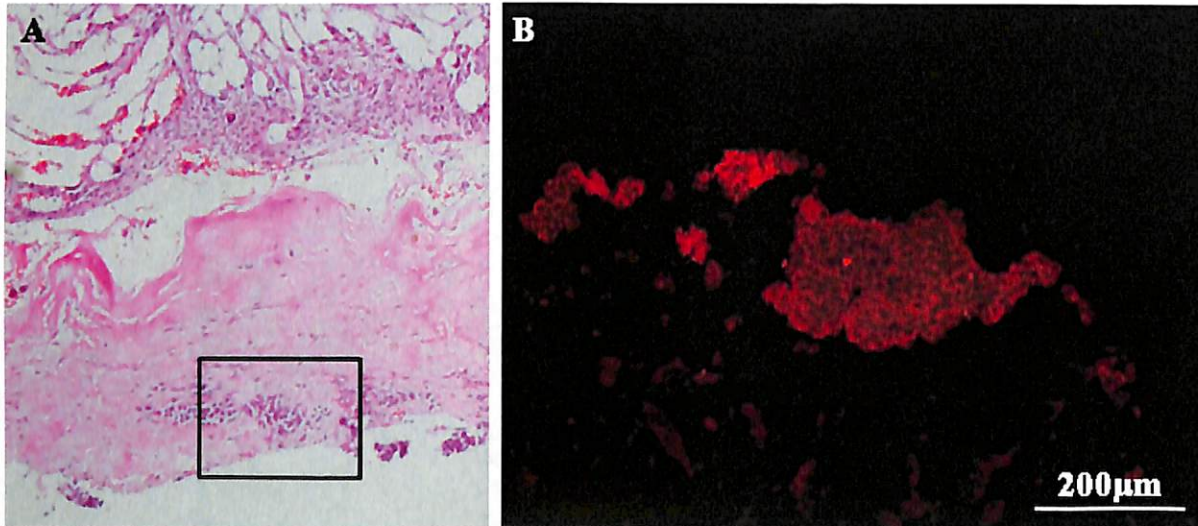


図 15. マウス超間膜に移植した再構成肝組織の形態

移植後 14 日目の組織像を示す。DsRed2 標識 HepG2 細胞が観察される。

A: ヘマトキシリン-エオジン染色 B: DsRed2 の免疫蛍光像

玉井氏より

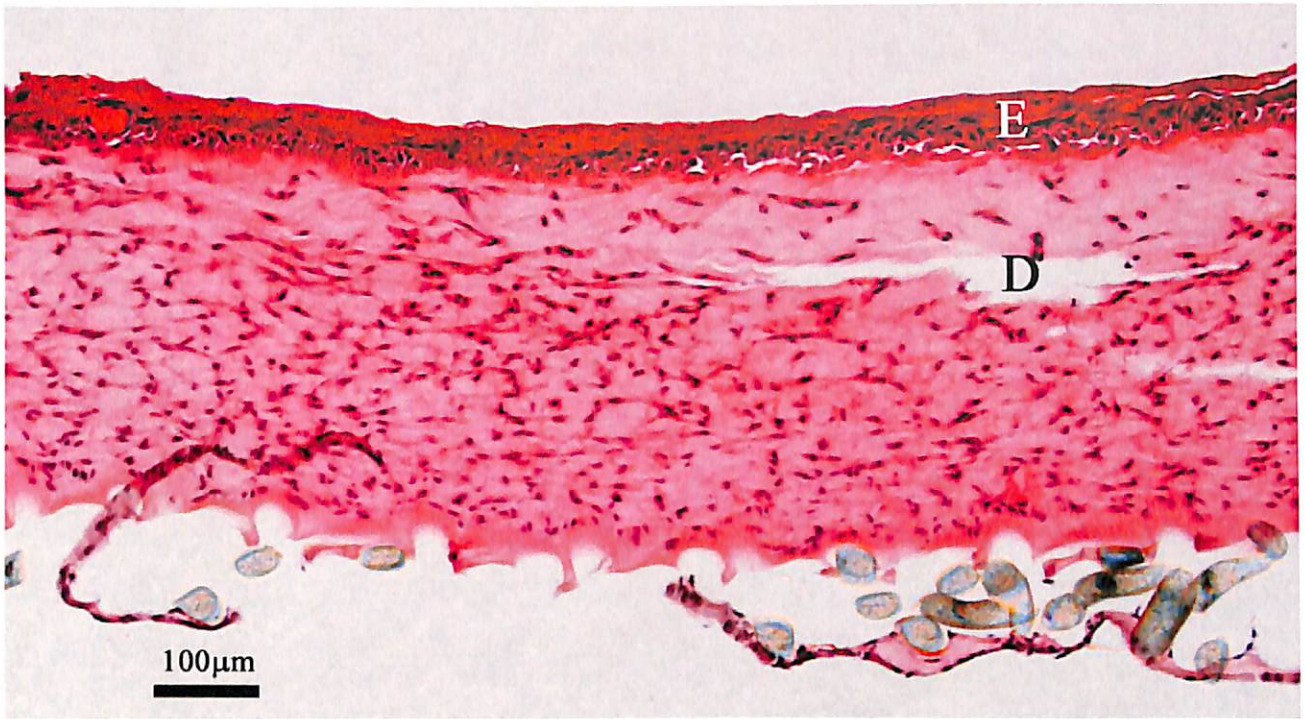


図 16. 高密度培養システムを用いて作成した人工皮膚の光学顕微鏡像

安達栄治郎氏より

HFO 細胞を播種した高密度コラーゲン細線維層 (D) 上に表皮細胞を播種すると、重層して表皮層 (E) が形成される。
ヘマトキシリン-エオジン染色 スケールは 100 μ m



図 17. 高密度コラーゲン細線維層によって閉鎖された鼓膜穿孔部の光顕図

実験的に作成したラットの鼓膜穿孔部に高密度コラーゲン組織を貼り付けることにより、約 3 週間で穿孔部の閉鎖 (*) がみられた。

ヘマトキシリン-エオジン染色 スケールは 0.5mm

安達栄治郎氏より

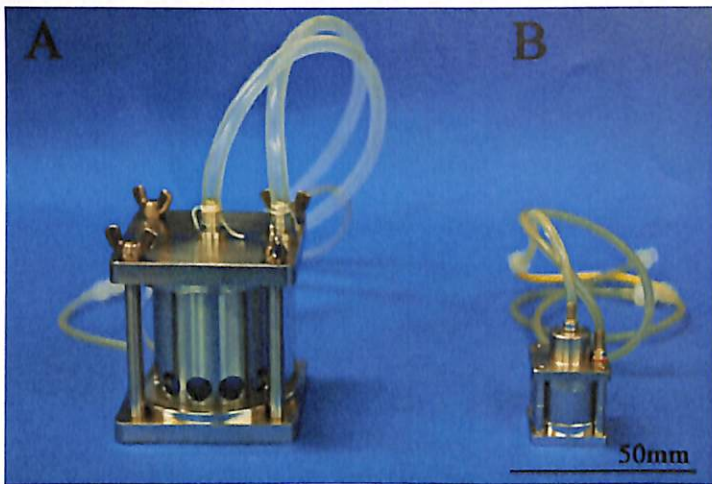


図 18. 大型バイオリアクター (A) と小型バイオリアクター (B)
 本研究では小型リアクターを用いて行った。大型リアクターでも高密度コラーゲンゲルを作成することが出来る。
 スケールは 50mm

安達栄治郎氏より

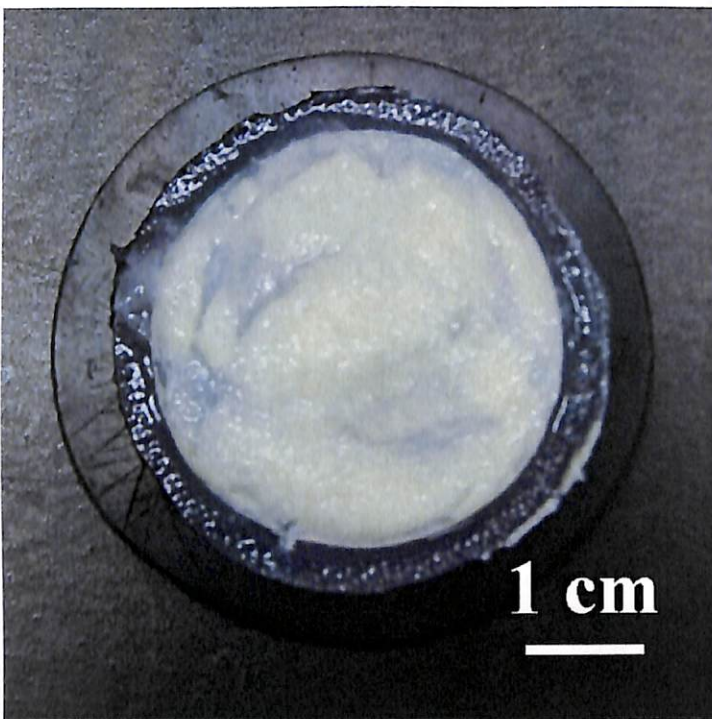


図 19. 大型バイオリアクターで作成したコラーゲンゲル
 スケールは 1cm

安達栄治郎氏より