

学位論文要旨

氏名 細谷 智



論文題目

「三次元高密度培養法を用いた肝組織の再構成」

指導教授承認印

渡辺 昌彦



三次元高密度培養法を用いた肝組織の再構成

氏名 細谷 智

【背景・目的】近年、ES 細胞や iPS 細胞をはじめとするさまざまな幹細胞が樹立され、細胞成長因子などによって目的の細胞へ分化誘導する技術的基盤が整ってきた。これらの細胞を血管などを経由して目的とする臓器へ送達する方法が試みられてきたが、移植細胞の生存性が低いことから臓器機能の回復は限定的である。そのため二次元、三次元の細胞組織をあらかじめ構築してから目的の組織あるいは組織に移植する方法が試されるようになった。このようなアプローチは角膜などの比較的微小な範囲での組織再生には有効であるが(Nishida et al., 2004)、肝臓など大型実質臓器の機能不全に対しては著明な効果は期待できない。大型臓器では細胞の三次元配置を維持する細胞外マトリックス(ECM)が重要な役割を果たしており、ECM の適切な利用が重要である。

肝臓は被膜と呼ばれるコラーゲン細線維と線維芽細胞からなる結合組織のシートによって包まれ、内部は 1-2mm の多角形をした肝小葉から構成されている。隣接する肝小葉の間にはやはりコラーゲン細線維と線維芽細胞からなる小葉間結合組織が存在し、その組織内には胆管、動脈、静脈が配置している。肝臓は I 型コラーゲンを主体とした細線維によって肝小葉に分けられ、小葉内は III 型と V 型コラーゲンを主体とした線維によってその三次元構造が維持されている。

コラーゲンは細胞外マトリックス(ECM)の主要線維成分である。精製した I 型コラーゲンは培養液中で会合しコラーゲン細線維を形成することから、Bell(1979)らはコラーゲンと線維芽細胞から皮膚の真皮に相当するモデル組織を再構成した。Dunn(1989, 1992)らは培養肝細胞を 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(特許第 467136 号)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。

【方法】本研究で用いた高密度培養システムは還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)を還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 か所の還流用ウィンドウが開けられている。リブ上にはポリ乳酸糸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。

アテロ I 型コラーゲン(0.5mg/ml)を含む氷冷した DMEM 液 45ml を還流した。還流開始 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還流を継続した。還流開始 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。還流開始 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 に交換して還流を継続した。還流開始 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 日間還流した。

高密度サンドイッチ型包埋肝組織は Zamboni 液 (0.2%picric acid, 4%paraformaldehyde, 0.5%glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer) で固定し、定法に従って脱水、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。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 0.1-0.3mm) 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。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 15-20 μ m の球形ないし卵円形の HepG2 細胞が凝集していた。

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径 30 μ m 程度の伸展した細胞形態をしていた。細胞の辺縁部にはところどころ糸状偽足が観察され、細胞質には少数の粗面小胞体とミトコンドリアが観察された。隣接する細胞間隙には微絨毛があり、細胞間接着構造は認められなかった。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 10-20 層重なり、0.2-0.6 μ 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 0.2-0.6 μ 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。

【考察】 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。肝特異的な機能発現は HepG2 細胞を高密度に

集積するだけで薬物代謝機能にかかわるチトクローム P450 活性が上昇する(Liu et al., 2007; Aoki et al., 2008; Ishii et al., 2008)、肝臓の非実質細胞である Kupffer 細胞と共培養するとアルブミンや尿素合成能が維持される(Zinchenko et al., 2005)などの報告がある。またガラクトース(Yin et al., 2002)やポリエチレン誘導体(Taguchi et al., 2011)などを用いて HepG2 細胞や肝細胞を接着固定化することによっても肝特異機能発現が上昇するという。また I 型コラーゲン細線維によるサンドイッチ型包埋法(Dunn et al., 1989 & 1992)、コラーゲンスポンジ包埋法(Sugimoto et al., 2005)、ハイドロゲル包埋法(Albrecht et al., 2006)によっても肝細胞の生存性と特異機能発現を維持できるという。本研究で用いた高密度培養システムにより高密度コラーゲン細線維網に包埋された高密度細胞組織では cell-cell 及び cell-ECM 相互作用により、HepG2 細胞は正常の肝細胞に類似した形態的特徴を発現したと考えられる。

肝臓、心臓、肺など大型実質臓器を SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)などの界面活性剤を加えた溶液で還流することにより全ての細胞を溶解し、除去した ECM に再度細胞を播種して臓器を再生する方法が開発され(Otto et al., 2010; Uygun et al., 2010, Song & Otto 2011)、臨床応用された例(Macchiarini et al., 2008)も報告されている。脱細胞化するとコラーゲン細線維が元の臓器の形態を維持している。そのため生体に近い臓器を再生するには有利である。しかし重量にして 3%程度の DNA が遺残している(Otto et al., 2010)。このことは生体の臓器を基にする限り潜在的に病原体の汚染される恐れがある。しかし本研究で用いた ECM は精製した分子状のアテロ I 型コラーゲンであり、現在の基準では有害な病原体が再構成した肝組織に混入する恐れはない。十分な細胞さえ用意できれば 11 時間で人工肝組織を再構成することができ、正常肝細胞の形態にきわめて類似していることから高密度サンドイッチ型包埋肝組織は実験動物の代替組織や部分肝移植などに応用可能である。

【今後の展望】本研究によって再構成した肝組織は 0.5 g 以下の小組織である。今後はより大きな肝組織を再構成できることを実証する。また移植した人工組織が生着するにはレシピエント側からの血管新生が重要である。人工肝組織のコラーゲン細線維網に血管が新生されるのかどうか検索して行きたい。

【引用文献】

- Albrecht DR, Underhill GH, Wassermann TB, Sah RL, Bhatia SN. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nat Methods*. 2006 May;3(5):369-75.
- Aoki K, Mizumoto H, Nakazawa K, Funatsu K, Kajiwara T. Evaluation of a hybrid artificial liver module with liver lobule-like structure in rats with liver failure. *Int J Artif Organs*. 2008 Jan;31(1):55-61.
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Mar;76(3):1274-8.
- 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.

- 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.
- Ishii Y, Saito R, Marushima H, Ito R, Sakamoto T, Yanaga K. Hepatic reconstruction from fetal porcine liver cells using a radial flow bioreactor. *World J Gastroenterol*. 2008 May 7;14(17):2740-7.
- Iwashiro H, Hosoya S, Hirai K, Mima T, Ohashi S, Aihara T, et al. Characterization of dense artificial connective tissues generated in a newly designed bioreactor. *Connect Tissue Res*. 2011;52(4):340-52.
- Liu Tsang V, Chen AA, Cho LM, Jadin KD, Sah RL, DeLong S, et al. Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. *FASEB J*. 2007 Mar;21(3):790-801.
- Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008 Dec 13;372(9655):2023-30.
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*. 2004 Sep 16;351(12):1187-96.
- Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med*. 2010, Aug;16(8):927-33.
- 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.
- Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med*. 2011 Aug;17(8):424-32.
- Sugimoto S, Harada K, Shiotani T, Ikeda S, Katsura N, Ikai I, et al. Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver tissues. *Tissue Eng*. 2005 Mar-Apr;11(3-4):626-33.
- 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 Nov;19(21-22):2527-35.
- Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010 Jul;16(7):814-20.
- Yin C, Ying L, Zhang PC, Zhuo RX, Kang ET, Leong KW, et al. High density of immobilized galactose ligand enhances hepatocyte attachment and function. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Dec 15;67(4):1093-104.
- Zinchenko YS, Coger RN. Engineering micropatterned surfaces for the coculture of hepatocytes and Kupffer cells. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Oct 1;75(1):242-8.