九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

血管網を有する足場材料を用いた臓器規模の肝組織構築法の開発

白木川，奈菜

https://hdl.handle.net/2324/1398363

出版情報：九州大学，2013，博士（工学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

（別紙様式２）

論　文　要　旨

区　分	甲・乙	氏　名	白木川　奈菜
論文題名　血管網を有する足場材料を用いた臓器規模の肝組織構築法の開発			

論 文 内 容 の 要 旨

肝臓は代謝の中心臓器であるため、機能不全に陥ると重大な生命の危機につながる。しかしながら、重度の肝不全患者に対する根本的な治療法は未だ肝移植しかない。肝移植は心臓死ドナーからの臓器提供では行うことができず、健常者からの生体肝移植、もしくは脳死ドナーからの移植に限られる。生体肝移植は提供者の命に関わる大きな負担であること、そして脳死ドナーからの移植は慢性的なドナー不足が問題となっている。本研究では、体内においてドナー肝臓に代わる臓器規模の肝組織を構築することを目標とした。

肝臓の機能を担う肝細胞は酸素要求性が高い細胞であるため、臓器規模の肝組織構築には血管網が不可欠である。そこで本研究では、血管構造を有する臓器規模の足場材料を作製し、その構造を利用して血管網構築を行い、その血管間において細胞増殖と血管新生による肝組織構築を行うことで、全体として臓器規模の肝組織構築を達成しようと考えた。この臓器規模の血管構造を有する足場材料として脱細胞化肝臓に注目した。肝臓の血管構造を維持しながら細胞を抜き去ることで、脱細胞化肝臓を作製し、それを血管網構築の足場として利用しようと考えた。

第1章では、肝移植の現状と本研究の必要性を述べた。また、本研究の方針及び本論文の構成を述べた。

第2章では、肝臓の構成とその機能、また人工肝臓の歴史及び再生医工学分野で構築されている肝組織の現状を述べた。さらに脱細胞化肝臓を用いた類似研究の現状を述べた。

第3章では、血管構造周囲で肝組織を構築するための細胞源及び細胞周囲環境に求められる条件を検討した。人工的に構築できる血管網の間隙を1 mmと仮定し、その間隙における肝組織構築を目的とした。初代肝細胞もしくは胎仔肝由来細胞を10^6 cells/mlにて包埋したコラーゲンゲル充填多孔質円板(厚さ1 mm、直径1 cm)を作製した。これを部分肝切除を施したラットおよび正常ラットに対して皮下移植した。その結果、肝実質細胞は増殖しないが胎仔肝由来細胞は増殖し、部分肝切除によりその増殖が促進されることが示された。部分肝切除を施したラットに対して移植された胎仔肝由来細胞においては、100 μm程の肝臓組織様構造体の形成も観察された。よって、適切な細胞と細胞周囲環境を整えることで1 mmの血管間隙における肝組織構築が期待された。さらに、増殖因子固定化基材を用いることにより、移植した肝細胞の生着率向上が示唆された。

第4章では、臓器規模の血管構造を有する足場材料として、脱細胞化肝臓の作製及び取得した脱細胞化肝臓の血管構造の評価を行った。種々の条件において脱細胞化を行い、脱細胞化された肝臓の血管構造と組織学的評価から脱細胞化法の最適化を行っ

た。その結果、4% Triton X-100溶液とDNase/RNase処理を行うことで、細胞を抜き去りながらも1 mm以下の間隙で血管構造を維持した脱細胞化肝臓の作製に成功した。以降の検討では治療に必要な体積を考慮し、ラット肝臓の右葉のみを用いることにした。血管構造を型取りした樹脂を3次元コンピュータ断層撮影 (3D-CT)を用いて評価した。樹脂そのままでは細部まで撮像できなかったが、造影剤によるコーティングや金の蒸着によりミリメートルレベルでの撮像に成功した。断面画像の解析により、脱細胞化肝臓は通常の肝臓と同程度の血管密度及び直径を有していることが定量的に示された。

第5章では、脱細胞化肝臓に対して細胞を配置することによる肝初期構造体構築を行った。血管の内壁を形成する内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC) 2×10^6 cellsを脱細胞化肝臓の門脈から播種し、6時間静置培養の後、3日間培地循環培養を行った。HUVECは血管構造に沿って接着し、その内壁で伸展していた。つまり、脱細胞化肝臓の血管構造が内皮化されていたため血液を流したところ、内皮化された血管構造からは赤血球の漏洩が見られなかった。これらのことから、脱細胞化肝臓の血管構造を足場とした血管網構築が可能であることが期待された。

また、血管構造には門脈からHUVECを、血管構造周囲に対しては周囲から針付シリンジを用いてコラーゲンゾル懸濁ヒト肝癌由来細胞(HepG2)を播種した。3日間培地循環培養を行ったところ、HUVECは血管構造に沿って観察され、さらにHepG2が血管構造周囲に観察された。また、周囲から針付シリンジを用いてコラーゲンゾルを注入した場合においても脱細胞化肝臓は血管構造を概ね維持していた。つまり、血管構造の内壁とその周囲にそれぞれHUVECとHepG2を部位特異的に配置することが可能であると示された。また、この方法は200 μm程度の肝細胞集塊であっても播種可能であり、肝組織構築に対するさらなる効率化が期待された。

さらに、作製した脱細胞化肝臓に対して初代ラット肝細胞を播種し、1日培養したところ、肝特異的機能であるアルブミン生産が認められた。これは従来法である血管網を利用した肝細胞播種と比べて約4倍高い値であった。以上のことから本研究において開発した播種方法の有効性が示された。

第6章では、本論文のまとめを行い、今後の展望を述べた。