

多層型スフェロイドを利用したボトムアップ式高機能肝組織の構築とその肝再生医療への応用

奥平, 達也

<https://doi.org/10.15017/1806993>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済



多層型スフェロイドを利用したボトムアップ式 高機能肝組織の構築とその肝再生医療への応用

平成 29 年 1 月

奥平 達也

目次

第 1 章	序論.....	- 1 -
1.1	本研究の背景及び目的.....	- 1 -
1.2	本研究の方針.....	- 3 -
1.3	本研究のオリジナリティ.....	- 6 -
1.4	本論文の構成.....	- 8 -
第 2 章	既往の研究.....	- 10 -
2.1	組織工学(Tissue Engineering)	- 10 -
2.1.1	組織工学における足場材料.....	- 10 -
2.1.2	血管化組織の構築.....	- 12 -
2.1.3	組織工学における共培養.....	- 14 -
2.1.4	微細構造の構築.....	- 14 -
2.2	肝臓組織構築の試み.....	- 15 -
2.2.1	肝臓とは.....	- 15 -
2.2.2	肝臓の機能.....	- 16 -
2.2.3	肝臓の構造.....	- 18 -
2.2.4	肝臓を構成する細胞と役割.....	- 18 -
2.2.5	肝臓組織構築に対する試み.....	- 19 -
2.3	多層型スフェロイドを利用した肝臓組織構築.....	- 22 -
2.3.1	スフェロイド培養法.....	- 22 -
2.3.2	共培養スフェロイド培養法.....	- 23 -
2.3.3	中空糸内部空間を利用したスフェロイドの集積培養.....	- 24 -
第 3 章	内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイド集積による肝臓組織の構築	- 25 -
3.1	本章の目的及び概要.....	- 25 -
3.2	肝細胞スフェロイドの大量培養.....	- 26 -
3.2.1	本節の目的.....	- 26 -
3.2.2	実験方法.....	- 26 -
3.2.3	実験結果.....	- 29 -
3.2.4	考察.....	- 31 -
3.2.5	本節のまとめ.....	- 31 -
3.3	中空糸内部空間における内皮細胞被覆化肝細胞スフェロイドの集積による 肝臓組織の構築と機能評価.....	- 32 -
3.3.1	本節の目的.....	- 32 -
3.3.2	実験方法.....	- 32 -
3.3.3	実験結果.....	- 41 -

3.3.4	考察.....	- 46 -
3.3.5	本節のまとめ.....	- 48 -
3.4	本章のまとめ.....	- 49 -
第 4 章	スフェロイド集積法による高機能肝臓組織構築の試み.....	- 50 -
4.1	本章の目的及び概要.....	- 50 -
4.2	ヘパリンを利用した増殖因子の徐放による高機能肝臓組織構築の試み.....	- 51 -
4.2.1	本節の目的.....	- 51 -
4.2.2	実験方法.....	- 52 -
4.2.3	実験結果.....	- 54 -
4.2.4	考察.....	- 57 -
4.2.5	本節のまとめ.....	- 57 -
4.3	間葉系細胞との共培養による高機能肝臓組織構築の試み.....	- 58 -
4.3.1	本節の目的.....	- 58 -
4.3.2	実験方法.....	- 59 -
4.3.3	実験結果.....	- 64 -
4.3.4	考察.....	- 71 -
4.3.5	本節のまとめ.....	- 72 -
4.4	本章のまとめ.....	- 73 -
第 5 章	スフェロイド集積法によって作製された肝臓組織の性能評価.....	- 74 -
5.1	本章の目的及び概要.....	- 74 -
5.2	肝不全モデルマウスを用いた作製肝臓組織の治療効果の検証.....	- 75 -
5.2.1	本節の目的.....	- 75 -
5.2.2	実験方法.....	- 75 -
5.2.3	実験結果.....	- 77 -
5.2.4	考察.....	- 80 -
5.2.5	本節のまとめ.....	- 81 -
5.3	本章のまとめ.....	- 82 -
第 6 章	総括.....	- 83 -
6.1	本論文のまとめ.....	- 83 -
6.2	今後の課題と展望.....	- 85 -
参考文献	- 87 -
謝辞	- 94 -

第1章 序論

1.1 本研究の背景及び目的

従来の医療は患者自身の自然回復力に依存する対症療法を基本とし、炎症の抑制や消毒、障害部位の除去など治療そのものが障害部位の機能回復を担うことはなかった。そのため、自然回復力による回復が見込めない重度の機能障害や損傷に対する治療として、臓器移植や組織移植、または人工物による置換が行われている。しかし、慢性的なドナー不足や人工代替物の限られた機能、劣化による定期的な交換や検査の必要といった制約がある。これらの問題を解決するため、培養細胞などを利用し組織本来の機能を提供し、障害を受けた臓器や組織を回復させる再生医療が近年注目されている。その再生医療へのアプローチとして、人工臓器のように生体臓器・組織の機能を外部から提供することで患者の自然回復力をサポートする、もしくは再生が見込まれない欠損部位に対し培養組織などを移植することで生体の持つ組織構造を再生する新しい医療技術の開発が望まれている。近年では、Vacanti, Langer らによって提唱された組織工学(Tissue Engineering)という研究分野が盛んに研究されており細胞・増殖因子・足場材料を組み合わせ様々な組織が構築されている¹⁴。三次元組織培養技術や足場材料技術の進歩と共に皮膚、骨、血管などを作製することが可能となり、特に皮膚等一部の組織は既に臨床試験が行われている⁵。また、細胞のみからなる角膜上皮細胞シートは臨床知見において良好な結果が報告されている⁶⁻¹⁰。

組織工学の分野において、移植に適した形状、大きさを有する細胞組織を生体外(in vitro)で構築する手法について研究が行われている。古くから培養担体(Scaffold)を組織形状の骨組みとして利用する手法が研究されているが、培養担体の生体適合性や生分解性、細胞毒性が課題となっており、これらを解決するために様々な工夫が行われている¹¹。また、培養担体による問題を解決するため、培養担体を利用しない培養組織が注目されている¹²。培養担体を利用しないことで、高密度の細胞組織体が形成でき、大量の細胞の培養が可能になる。しかし、現在 in vitro において培養維持が可能な細胞組織は薄いシート状や細胞密度の低い組織など酸素・栄養要求性が低いものに限定されている。一方、肝組織など多くの細胞数かつ高細胞密度が求められる組織では酸素・栄養要求性が高く、in vitro において組織の形成や長期培養維持する培養技術がいまだ確立されていない。この高密度かつ十分な大きさの細胞組織の培養技術は組織工学における解決すべき課題となっている¹³。

従来の組織培養法では酸素・栄養供給が組織体表面からの分子拡散に依存し、厚さ数百 μm を超える細胞組織では内部細胞に十分な酸素・栄養が供給できない。そこで、生体内において体中の細胞に酸素・栄養を供給する毛細血管を培養組織内部に構築する研究が行われている。毛細血管構造を細胞組織内部に一定の密度で配置することで組織中の細胞の機能や生存が維持される^{14,15}。しかしながらこれまでに、毛細血管網を構築するために多

くの手法が検討されてきたが、生体組織を代替できる大きさの毛細血管網を有する細胞組織を構築するには至っていない。再生医療、組織工学の分野において、この毛細血管網を構築する手法の開発は解決すべき課題となっている¹³。

本研究では、細胞培養・組織構築法が求められている組織として肝臓に着目した。肝臓は合成・代謝・解毒・貯蔵など複雑かつ多岐にわたる機能を持ち“生体の化学工場”と呼ばれる。現在、肝硬変や肝臓などの重篤な肝不全患者に対する有効な治療法は肝移植のみであるが、現状では移植治療のみで全ての肝不全患者を治療するに至っていない。そこで、肝移植に替わる新たな治療法として、培養肝細胞を利用し患者の肝機能を回復させる肝再生医療が期待されている。この肝再生医療における解決すべき課題として、大量に必要とされる肝細胞源の確保、高機能かつ高細胞密度を有する肝組織の構築法の開発が挙げられる。細胞源においては、近年開発が進んでいる iPS 細胞¹⁶⁻²¹や株化肝細胞^{22,23}、ダイレクトリプログラミング²⁴などの手法が検討されている²⁵⁻²⁹。一方、肝組織の構築法において、足場材料³⁰やヒドロゲル³¹、脱細胞化組織³²などを利用する手法や 3D バイオプリンターで組織形成する手法³³が検討されているが、いまだセンチメートルオーダーの高密度肝組織を構築するには至っていない。しかしながら、臨床スケールで肝不全を治療する場合、 10^{10} 個オーダーの肝細胞が必要であると考えられており、限られた移植空間などから高細胞密度の肝組織を構築する手法の開発は肝再生医療にとって一刻も早く望まれている。

そこで、これらの課題を克服する手段として、高細胞密度と高機能発現を両立する微小組織体である球状組織体組織体(スフェロイド)に着目した。肝細胞スフェロイドを血管内皮細胞で被覆した多層型スフェロイドを集積し肝組織を構築することで、組織内部において規則的に血管内皮細胞を配置することが可能となり、毛細血管網様構造の速やかな構築が期待できる。本研究では肝細胞スフェロイドを基本単位としたボトムアッププロセスによる高機能かつ高細胞密度の肝組織構築と、その肝組織の肝再生医療への有用性を示すことを目的とした。

1.2 本研究の方針

前述の通り高機能かつ高細胞密度を有する肝組織の構築法が求められている。これを達成するには、肝組織内部に毛細血管網を構築し組織構成細胞に栄養・酸素を供給することが不可欠となる。既往の研究では、培養組織内部に毛細血管網を構築し、対流によって栄養・酸素を供給するために血管内皮細胞との共培養を行う手法が試みられてきた³⁴。しかしながら、共培養による血管内皮細胞の血管様構造の構築には数日程度の時間がかかるため、栄養・酸素要求性の高い肝細胞の機能、生存を維持し続けることは困難である。肝組織構築において求められる毛細血管網構築の条件は、1)できるだけ早い血管網構築、2)およそ 100 μm 間隔の密な血管密度、3)血管が連結したネットワークを有していることが挙げられる。この条件を達成するためには、肝細胞と血管内皮細胞を共培養し、培養組織中において血管内皮細胞の分布を制御できるような組織構築・培養法が求められる。本研究では、高機能かつ高細胞密度の肝組織構築を目指すため、足場材料を利用しない(Scaffold-free)組織構築を行う。Scaffold-free の培養組織は前述の通り、移植組織として適しているが、培養組織の組織骨格を予め作製することができない。毛細血管網を構築するための組織構造を細胞のみで提供することは困難であり、現状において血管網構築は細胞播種後の自己組織化に依存しており望むような組織構造を構築することは難しい。

そこで本研究では、高機能かつ高細胞密度の Scaffold-free な肝組織を構築するため球状の微小组織体であるスフェロイドに着目した。肝細胞スフェロイドは、単分散の肝細胞から構築される組織体で *in vitro* において肝機能を長期維持できることが知られている。また、肝細胞スフェロイドの細胞密度は生体肝臓に近く、非常に高細胞密度の組織体である。肝細胞スフェロイドにおける組織中細胞への栄養・酸素供給はスフェロイド表面からの分子拡散に依存するため直径 150 μm 以上のスフェロイドでは中心部細胞が壊死してしまう¹⁵。本研究では、Scaffold-free の肝組織を構築するため、直径 150 μm 以下の肝細胞スフェロイドの表面を血管内皮細胞で被覆した多層型スフェロイドを基本単位として利用した。この多層型スフェロイドを多数個集積し三次元組織を構築することで、組織構築時点において血管内皮細胞を約 100 μm 間隔に規則的に配置することが可能となる(Fig. 1.1)。組織を培養し、血管内皮細胞が再組織化することで密な毛細血管網を有した高密度肝組織が得られると期待できる。本研究では、以上のような多層型スフェロイドを基本単位としたボトムアッププロセスによる高機能かつ高密度な肝組織の構築とその応用を試みた。

Fig. 1.2 に多層型スフェロイド集積による肝組織構築とその応用の研究方針を示す。上述の通り、血管内皮細胞に被覆された多層型スフェロイドの集積によって高機能かつ高細胞密度の肝組織を作製し、肝再生医療への有用性を示すための戦略として、以下のように研究を進めた。

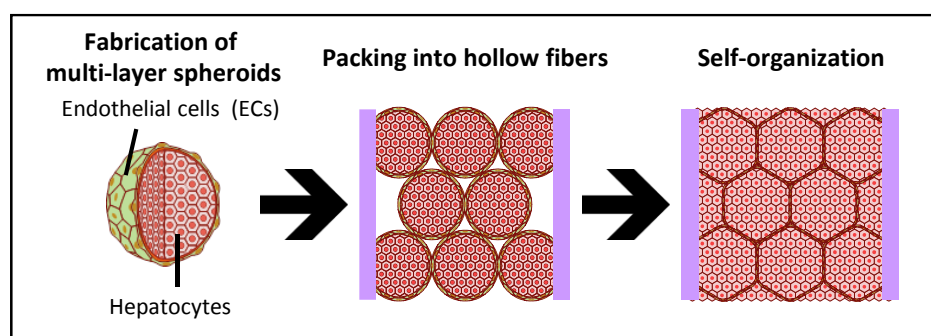


Fig. 1.1 Concept of the bottom-up method using multi-layer spheroids.

まず、本組織構築法に必要となる肝細胞スフェロイドの大量培養法について検討を行い、組織構築に適した粒径のスフェロイドが大量に得られる培養条件を決定した。得られた肝細胞スフェロイドの表面を血管内皮細胞の層で被覆し、血漿分離用中空糸の内部空間に集積することで高密度肝組織を作製した。そして単分散細胞を中空糸に充填して作製した肝組織、肝細胞スフェロイドを集積して作製した肝組織と細胞生存率・肝特異機能を比較し評価を行った。また、作製した肝組織の内部細胞分布を観察し、血管内皮細胞によるネットワーク構造変化を調べた。

多層型スフェロイド集積による肝組織構築の次のステップとして、作製した肝組織の更なる高機能化と内皮細胞による血管網構築の誘導について検討を行った。まず、肝細胞スフェロイドをコーティングし、血管内皮細胞の足場となるコラーゲンゲルに肝細胞、血管内皮細胞に有効な増殖因子を固定化、徐放による効果を確認した。また、肝細胞の機能を向上し、血管内皮細胞の血管構築を促進する間葉系細胞との共培養を行い、肝機能や内部細胞分布、酸素供給などの評価を行った。

最後に、作製した肝組織の治療効果を確認するため、肝不全モデル動物への移植を行った。具体的には、免疫不全マウスに対して 90% 部分肝切除により急性肝不全を誘導し、作製肝組織を移植することで移植用肝組織としての性能を評価した。

本研究では、肝細胞の細胞源としてラット初代肝細胞、血管内皮細胞として正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)、間葉系細胞として NIH/3T3 細胞を用い肝組織構築を行った。

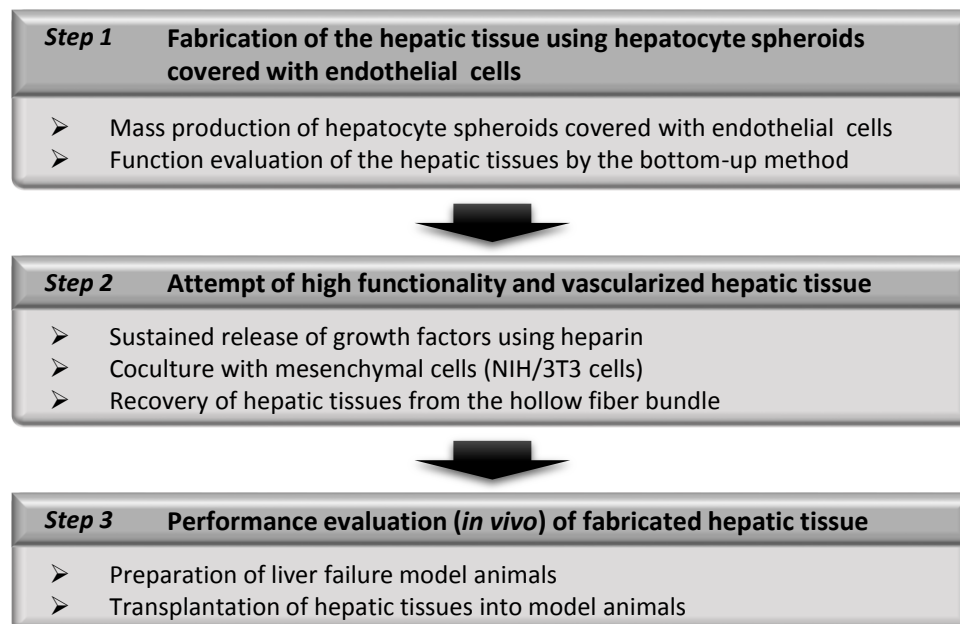


Fig. 1.2 Research overview of this study.

1.3 本研究のオリジナリティ

本研究のオリジナリティを以下に示す。

[1] 内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを利用した肝臓組織の構築と定量的な機能評価

組織工学において、スフェロイドを利用した三次元組織構築は広く検討されている。また、機能向上を目的とした共培養スフェロイドにおいても肝細胞だけでなく膵臓細胞など複数種の細胞を用いた研究が行われている。しかし、本研究のようにスフェロイドの表面を内皮細胞で被覆した多層型スフェロイドを組織構築に利用する検討は、あまり報告されていない。本研究では始めに内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを作製し、血漿分離用中空糸の内部空間において高密度に集積することによって高密度肝臓組織を作製した。また、スフェロイドを介さずに中空糸内部空間において肝臓組織を作製し、組織構成細胞の生存率や肝特異機能、内皮細胞の分布を評価することで、多層型スフェロイドの集積による組織構築の有用性を示した。

[2] 肝細胞スフェロイド表面を覆うコラーゲンゲルへの増殖因子固定化可能なヘパリンの導入

増殖因子は細胞の生存や増殖だけでなく分化や機能発現に対しても影響を与えるシグナル伝達物質であり、組織工学において非常に重要な因子である。通常、増殖因子は培地中に添加され細胞へと供給されるが、この状態では安定性に欠ける。また、高密度三次元細胞組織を培養する場合、培地中に含まれる増殖因子は組織表層付近の細胞のみに提供され、組織中心部の細胞に届かないことが課題となっている。そこで、本研究では、増殖因子を静電的相互作用により固定化可能であるヘパリンに着目した。肝細胞スフェロイド表面を覆い、内皮細胞の足場になるコラーゲンゲルにヘパリンを結合、増殖因子を固定化することで培養期間を通して組織構成細胞に増殖因子を供給することが可能となる。作製された肝臓組織において肝特異機能評価を行ったところ、肝細胞の肝特異機能の向上、内皮細胞の増殖・管状構造の構築が示唆された。

[3] 内皮細胞・間葉系細胞で被覆された肝細胞スフェロイドの集積による高機能肝臓組織の構築

組織工学において、内皮細胞と間葉系細胞を共培養することによって、内皮細胞の管状構造系性能が向上することが報告されている。また、間葉系細胞は肝細胞と共培養することで、肝細胞の肝特異機能発現を向上させるはたらきがある。本研究では、肝細胞スフェロイドの表面に内皮細胞と共に間葉系細胞を配置することで、3種の細胞を規則的に配置した肝臓組織を構築した。それぞれの細胞種を組み合わせた肝臓組織を作製し、比較評価を行

ったところ、肝細胞の肝特異機能の向上が示され、内皮細胞の増殖、間葉系細胞の強固な細胞骨格のため肝組織の機械的強度の向上が示唆された。

[4] 多層型スフェロイドを利用した肝臓組織の動物実験による性能評価

本研究で作製した肝組織は、移植組織や体外設置型人工肝臓装置、または薬理試験や毒性試験など様々な用途に応用可能である。本研究では、血漿分離用中空糸の内部空間で形成された肝組織を中空糸から回収し、移植用肝組織として応用を試みた。まず、肝不全モデル動物として免疫不全である **SCID** マウスに 90% 部分肝切除を施し、作製肝組織を腹腔内部の尾状葉表面に移植した。その結果、肝不全マウスの生存時間において治療効果が確認された。これによって作製した肝組織の肝再生医療への有効性が示唆された。

1.4 本論文の構成

第1章では、本研究の背景として再生医療技術開発における組織工学の背景を述べると共に、現状の課題を挙げ肝臓組織構築法の開発の必要性を示し、それを踏まえた上で本研究の方針を示した。また、本研究のオリジナリティについて示し、本研究の位置づけを明確にした。

第2章では、はじめに組織工学について概説し、組織構築に用いられている足場材料や装置、共培養といった試みを示した。その上で本研究の目的臓器である肝臓について概説し、肝臓組織構築の現状をまとめた。最後に、本研究の手法であるスフェロイドを利用した培養法についてまとめ、多層型スフェロイド集積による組織構築の研究をまとめると共に、解決すべき課題について示した。

第3章では、はじめに肝細胞スフェロイドの大量培養法について検討を行い、培養条件を決定した。その条件を利用して内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを作製し、血漿分離用中空糸の内部空間に集積し三次元組織構築を行った。その結果、組織構成細胞の生存率と肝特異機能の向上を確認し、多層型スフェロイドの集積による組織構築法の有用性を示した。また、組織内部において内皮細胞の規則的なネットワーク構造が培養期間を通じて観察された。

第4章では、第3章において作製した肝組織における更なる肝特異機能の向上と血管化組織の構築を試みた。はじめに、細胞の機能・増殖に有効である増殖因子を継続的に供給するために、足場材料へのヘパリンの導入について検討を行った。肝細胞スフェロイドを覆うコラーゲンゲル中にヘパリンを導入しヘパリンに増殖因子を吸着することで、組織構成細胞へ増殖因子を徐放した。その結果、肝特異機能の向上と内皮細胞による管状構造の形成が確認された。また、内皮細胞の管状構造構築に有効であると報告されている間葉系細胞を肝臓組織に導入した。肝細胞スフェロイドを内皮細胞・間葉系細胞で被覆し、集積することで組織構築を行った。その結果、肝特異機能の向上、組織内部への十分な酸素供給が示された。

第5章では、第4章で作製した肝組織の性能評価を行った。まず、肝不全モデル動物として、免疫不全マウスに対し90%部分肝切除し急性肝不全を誘導してマウスの生存曲線を作成した。作製肝組織をモデルマウスに移植し、生存率を調べ肝組織の性能評価を行った。その結果、部分肝切除後の生存時間が長くなるなど治療効果が確認された。これによって作製肝組織の肝再生医療への有効性を示した。

第 6 章では、本論文の総括を行うと共に、本研究の課題と展望について述べた。

第2章 既往の研究

2.1 組織工学(Tissue Engineering)

組織または臓器の損失および不全は、生命維持において最も重大な問題のひとつである。組織工学（Tissue Engineering）は生物学と工学を融合して障害を受けた組織の機能的な代替物を開発する新しい分野の学問である。この組織工学において、細胞・足場材料・増殖因子の三要素は重要な役割を果たし、これらを組み合わせることによって生体機能を有した組織、臓器を創出できると考えられる。さらにこれの実現には生物学と工学だけでなく、医学や薬学などの異分野間研究交流も重要であるとされている。この組織工学は細胞培養といった基礎研究の手法を医療へ応用することから、再生医療の一部として認識されており、再生医療の実現に向けた新しい手段として近年注目を集めている。

本節では、組織工学における重要な要素として、足場材料、血管化組織の構築、異種細胞種の共培養における既往の研究について述べる。

2.1.1 組織工学における足場材料

組織工学において、足場材料は細胞に様々な刺激を与える役割を持つ。本項では、機能的な肝組織構築を達成するための指針や知見を得ることを目的として、組織工学における足場材料の役割、足場材料の形状と機械的性質、既報の足場材料について述べる。

2.1.1.1 足場材料の役割

組織工学において足場材料がもつ役割は再生の場の提供・再生空間の制御・基質の供給に分類される³⁵⁻⁴⁰。

再生の場の提供とは、細胞によって組織が構築される際の足場の提供のことである。生体組織では、細胞は細胞外マトリクス(ECM)が足場となることで増殖や分化、機能発現を果たす。しかし、損傷した組織の場合、足場としての ECM が欠損または劣化している場合がある。そこで、細胞が自身の ECM によって足場環境が整うまでの間、足場材料が組織を再生する空間を提供する。

組織が欠損した場合、損傷を受けた部位は結合組織に置き換わる。この場合、足場材料による再生空間の提供が困難になるため、目的の組織が再生するまでの間、他の細胞や組織の侵入を防ぎ続ける必要がある。これが再生空間の制御としての役割である。

生体内の細胞は増殖因子やサイトカインなど様々な生理活性物質の供給を受ける。これらは、細胞の増殖や生存だけでなく機能発現や分化などにも効果がある必要不可欠な成分である。足場材料はこれらの生理活性物質を細胞に供給し、再生を促進する役割をもつ。

2.1.1.2 足場材料として用いられる材料

足場材料として用いられる材料として天然高分子と合成高分子があり、更に、これらを組み合わせた複合材料の開発も行われている。以下にそれぞれの特徴に関して述べる。

以下に例を挙げ、合成、天然ポリマーの違いを Table 2.1 に挙げる。

Table 2.1 Comparison of natural and synthetic polymer⁴¹.

		Natural polymer	Synthetic polymer
Function	<i>Retaining, circulation of information</i>	Nucleic acid	-
	<i>Element of polymer</i>	Amino acid Monosaccharide	Monomer
Structure	<i>Primary structure</i>	Mono-dispersion	Poly-dispersion
		Low stereoregularity	High stereoregularity
		Ordered array	Random array
	<i>Secondary structure</i>	Alpha helix Spiral-shaped	Random coil
Polymerization		Template	Stereo-specific Alternating

天然高分子は、分子間相互作用が強く安定した構造形成が特徴である⁴²⁻⁴⁵。細胞の生物的特性や物理的特長の維持に適しており、哺乳類や甲殻類から抽出される。また化学的修飾を施された材料もある。天然高分子はコラーゲンなどのたんぱく質とヒアルロン酸などの多糖類に分類される。

コラーゲンは生体内に最も多く存在するたんぱく質であり、全たんぱく質の約 1/3 を占める⁴⁶⁻⁴⁷。コラーゲン繊維は 3 重らせん構造をとるものがある。異なるペプチド鎖からなるコラーゲンファミリーに分類され、I 型コラーゲンが最もよく研究に用いられている。近年では、酵素処理によってテロペプチドを除去したアテロコラーゲンなどが開発され、再生医療用の材料として期待されている。

ゼラチンはコラーゲンを熱処理または酸/アルカリ処理することで得られる⁴⁶。ゼラチンは疎水性基の存在により分子内相互作用が生じ、分子としては親水性を示す。精製法により、分子量や等電点が大きく左右されるが、中性で溶解するアルカリ処理ゼラチンは DDS の材料として応用されている⁴⁸。

合成高分子は、物性や分子設計を自由に設定できる点や免疫原性の低さが利点の材料である⁴⁹。また、天然高分子の様なロット間誤差が少ないことも特徴である。合成高分子の特徴は、モノマーの性質や重合反応条件によって左右される。一般的に生体適合性を得るため、加水分解可能な官能基を組み込むことが多く、エステル、無水物、アミド基などが挙げられる。以下に例を挙げる。

ポリ乳酸は、D 体と L 体の 2 種類あるラクチドによって合成される^{50,51}。L 体のみからなるポリ乳酸は PLLA と呼ばれる半結晶性の高分子であり、高い引張応力と低い伸張性が特徴である。このことから、整形外科の固定具に用いられる。D 体と L 体を混合させ重合した PDLLA はアモルファスであり、低い引張応力と高い伸張性が特徴である。また、生体内における分解速度が早く、DDS 用の材料として用いられる。

2.1.2 血管化組織の構築

組織工学における血管網構築は、生体血管を利用した生体内でのアプローチと、生体外における血管内皮細胞による血管網構築に分類される。本項では、この 2 つのアプローチについてそれぞれ記す。

2.1.2.1 生体血管を利用した血管網構築

毛細血管網を有する組織を生体内で構築するためのアプローチの多くは、生体中の血管の侵入に依存した手法である。この手法では、生分解の多孔質材料に血管新生誘導因子である bFGF、VEGF を混合し移植部に生体血管を侵入させ毛細血管網を得る⁵²。また、遺伝子を導入することで移植組織の血管化を促進させる手法も報告されている⁵³。

一方、培養細胞を用いて血管を構築する手法も報告されている。繊維芽細胞などの血管新生誘導因子を分泌する細胞を培養基質上で培養し、移植することで組織中の血管化を誘導する。この手法は、皮膚組織など一部の組織で商業化されている⁵⁴。また、培養担体を用いずに、細胞シートを積層する手法も試みられている⁵⁵。この手法では、高密度かつ厚みのある組織が作製可能であるが、生体血管が侵入するまでに時間がかかり組織が壊死してしまう可能性がある。そのため、薄い組織を複数回移植し徐々に厚みのある組織を構築する手法が試みられている。

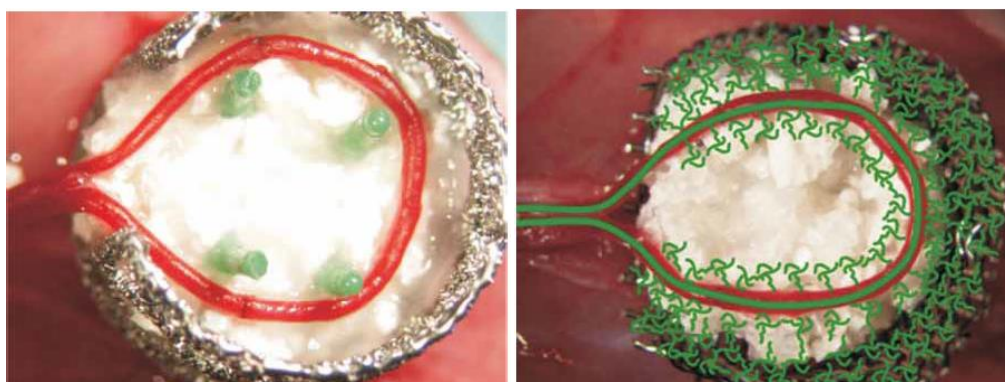


Fig. 2.1 Vascular network construction using biological blood vessels⁵⁶.

2.1.2.2 生体外における血管内皮細胞の血管網構築

生体血管を利用した血管網構築には、血管が侵入するまでに時間がかかり、一度に厚みのある組織を構築できないといった問題点がある。そのため、高細胞密度かつ厚みのある組織を移植する場合、予め組織内部に毛細血管網を構築しておく必要がある。この課題を克服するため、生体外で毛細血管網を構築する手法が広く検討されている。

管状の内皮細胞組織を形成する手法として、足場材料を用いる手法が報告されている⁵⁷。実質細胞を含むヒドロゲルに血管となる流路の穴を開け、その穴の中に血管内皮細胞を播種することで管状組織を有する組織を構築する⁵⁸。また、微小なコラーゲンゲルの表面を内皮細胞で覆った微小组織構造体を集積させることで、組織構造体内部に連通した流路を形成させ生体外での灌流培養を行う手法も報告されている⁵⁹。しかし、足場材料を用いた手法では、高細胞密度の組織を形成することが困難であり、まだ発展段階の技術分野である。

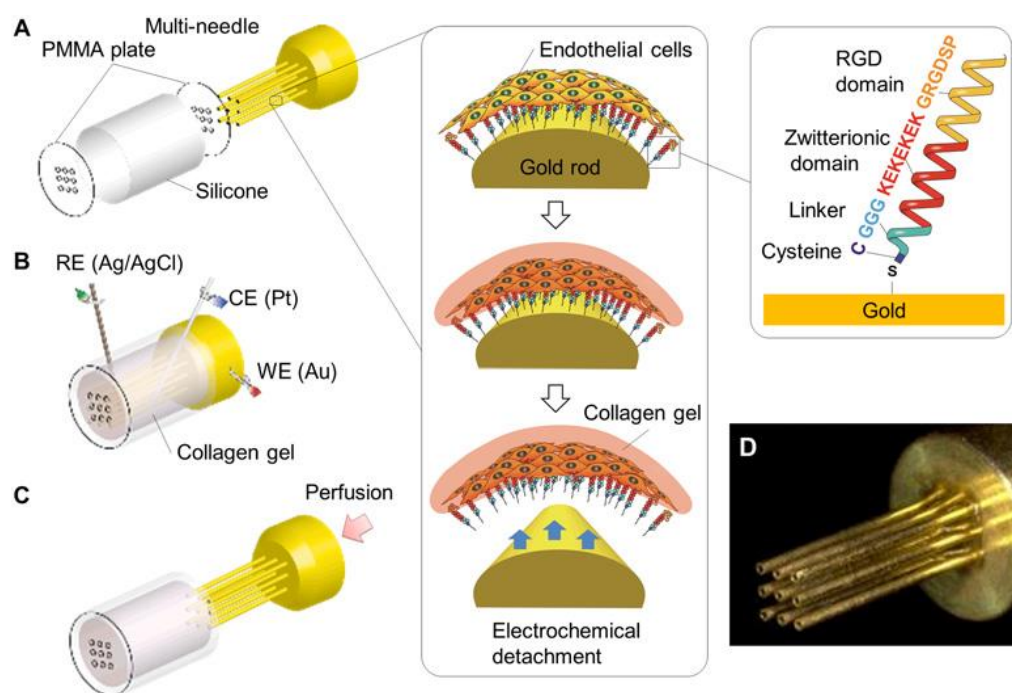


Fig. 2.2 Fabrication of perfusable vascular-like structures by using collagen gel and an electrochemical reaction⁵⁸.

2.1.3 組織工学における共培養

組織工学において、異種細胞の共培養は広く検討が行われている手法である。共培養による細胞間相互作用によって、増殖因子やサイトカインを傍分泌によって享受し合い互いに好影響を与える。これは生体内部でも同様の現象が行われており、生体内環境の模倣として共培養は重要な要素である。

共培養において広く検討されているのは、実質細胞と非実質細胞の共培養である。非実質細胞は実質細胞の機能を補助するだけでなく、細胞の形質や生存維持、組織の構造構築といった役割を果たす⁶⁰。共培養による機能補助効果は非実質細胞の種類、細胞比率だけでなく空間配置や接触の有無によっても変化する⁶¹⁻⁶³。また、3種以上の細胞による共培養にも効果が確認されている⁶⁴。

また、実質細胞同士による共培養も検討されている。肝細胞と膵島細胞の共培養によって、肝機能、膵臓機能が共に向上する結果が確認されている⁶⁵。

近年では、血管内皮細胞と間葉系細胞の共培養による血管網の構築が関心を集めている。間葉系細胞は間質細胞として、速やかな血管構築の手助けをしている。この共培養効果は、二次元培養や三次元培養、足場材料の有無に問わず広く利用されており、多くの手法が開発されている⁶⁶⁻⁶⁸。特に Takebe らによる報告で、間葉系幹細胞を用いた血管化ミクロ肝臓の構築に関する検討では、血管内皮細胞による迅速な自己血管組織化が示され注目を集めている⁶⁹。

2.1.4 微細構造の構築

微細な組織構造を持つ培養組織体を構築する手法として、3D バイオプリンターや微細加工技術が挙げられる。

3D バイオプリンターは 3D プリンターを細胞に応用したものであり、細胞を材料にした立体組織の構築が可能である。あらかじめ設定した組織を正確に構築できる利点があり、管状組織などを組織構築時点で構築できる^{30,70-72}。しかし、組織構築の基本単位として、細胞凝集塊を用いるため、それ以下の大きさの制御ができない課題がある。

微細加工技術は基材への表面処理や、マイクロチップの流路作製などに用いられる技術である。微細表面処理を施すことで、細胞接着部分を制御することが可能となる⁷³⁻⁷⁵。また、微細な構造をマイクロ流路を用いることで作製することができる⁷⁶。

2.2 肝臓組織構築の試み

本研究では、高機能血管化培養組織の対象として肝臓組織に着目した。現在、日本において生体肝移植の待機患者は350人いるのに対し、1年間で実際に移植されたのは50人程度であり、深刻なドナー不足が問題となっている⁷⁷。そのため、培養肝細胞を用いて患者の肝機能を補助、回復させる肝再生医療の技術開発が一刻も早く望まれている。この肝再生医療を実現するため、肝細胞の細胞源、培養肝組織の構築法など広く研究が行われている。

本節では、肝臓の概容、機能、構造を述べると共に、報告されている肝組織構築の試みについてまとめた。

2.2.1 肝臓とは⁷⁸⁻⁸⁰

肝臓は人体最大の臓器であり、“生体の化学工場”に喩えられる500以上の機能を有する臓器である。消化管から吸収された栄養の分解や転換、貯蔵や合成を行い、薬剤、毒物、異物の分解や解毒、排泄も行っている。一方、肝臓は再生能力が高い臓器として知られており、肝臓の一部を切除しても、自己修復が可能である。また、高い予備能力を持ち、肝癌といった局性の病変では肝機能は代償され、症状が末期に至るまで自覚症状が認められないことが多い。

2.2.2 肝臓の機能

2.2.1 で述べたように肝臓は合成、貯蔵、解毒など複雑かつ多岐に渡る機能を有する。本項では、肝臓が有する代表的な機能について記す。

Table 2.2 Representative functions of liver.⁸¹

Metabolism	<i>Carbohydrate metabolism</i>
	Uptake of glucose, glycogenesis and storage
	Oxidative glycolysis of glucose
	Secretion to blood
	Galactose, fructose metabolism
	<i>Lipid metabolism</i>
	Biosynthesis of fatty acid and lipoprotein
	Biosynthesis of cholesterol and phospholipid
	Uptake and degradation of fatty acid
	Ketogenesis
	<i>Amino acid and protein metabolism</i>
	Amino acid metabolism
	Ammonia metabolism in urea cycle
	Protein synthesis and proteolysis
	<i>Vitamins and hormone metabolism</i>
	Vitamin inactivation and strage
	Hormone inactivation and decomposition
Detoxification	<i>Oxidation and hydroxylation of drug with enzyme</i>
	<i>Glucuronide, glutathione</i>
	<i>Alcohol metabolism</i>
	<i>Ammonia disposition</i>
	<i>Phagocytosis of Kupffer cells</i>
Excretion	<i>Bile secretion</i>
	<i>Bile acid biosynthesis and secretion</i>
	<i>Secretion of cholesterol, phospholipid and bilirubin</i>
	<i>Secretion of detoxificated drugs</i>
Circulatory Regulation	<i>Liver regulate the circulation of blood</i>

2.2.2.1 糖代謝

肝臓は、インスリンやグルカゴンと関与し血糖の維持やエネルギー生産の重要な役割を果たしている。糖質は肝細胞中にグリコーゲンとして貯蔵され、血糖値が低下するとグルコースに再分解され血中に放出される。肝臓ではガラクトースの代謝も行われており、肝障害によって耐糖能に異常が発生する。

2.2.2.2 たんぱく質・アミノ酸代謝

たんぱく質は消化管でアミノ酸まで分解され、小腸から吸収されて肝臓に到達する。アミノ酸は肝細胞内で主にたんぱく質合成に利用され、アルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、プロトロンビン（血液凝固因子）など多くのたんぱく質に合成される。このうち特にアルブミンと血液凝固因子の合成は臨床的に重要な機能であり、これらの合成能が低下すると浮腫や出血の原因となる。また、これらのたんぱく質の合成は肝機能の指標として広く用いられている。

2.2.2.3 脂質代謝

消化管から吸収、または脂肪組織から動員された脂肪酸は、一部が肝臓で分解され、大部分はコレステロール・リン脂質とともにリポたんぱく質に合成され血中に放出される。肝障害によってこの機能が低下した場合、肝臓に中性脂肪が蓄積され脂肪肝となる。肝臓はコレステロールやリン脂質の合成にも重要な役割を果たしており、血中のコレステロールはレシチンの脂肪酸でエステル化される。胆汁酸は肝臓でコレステロールから生成され、抱合型胆汁酸となり胆汁中に排出され、脂質の消化吸収に重要な役割を果たしている。消化吸収作用を終えた胆汁酸の一部は腸管より吸収されて肝臓で再抱合を受け、胆汁中に再排泄され腸肝循環する。

2.2.2.4 薬物代謝

薬物を代謝する場合、肝細胞内の滑面小胞体が大きな役割を果たしている。薬物は消化管から吸収され、肝循環に入ると代謝作用を受けることによって初回通過効果をしめす。肝細胞において薬物代謝に重要な役割をもつ酵素がシトクロム P450 である。シトクロム P450 は CYP と呼ばれ、アミノ酸配列に基づいてファミリー1、サブファミリーA が分類される。CYP は酸化還元酵素であるが、ステロイドホルモンの生合成、脂肪酸の代謝などにも関与している。

2.2.2.5 解毒機能

肝臓は、体外から入ってくる有害物質の分解だけでなく、体内で発生する有害物を無毒化する役割をもつ。体内で発生する有害物としてアンモニアが挙げられ、肝臓ではアンモニアを尿素に変換して体外に排出しやすくする働きをもつ。このアンモニア代謝能が低下

すると、体内アンモニア濃度が上昇し肝性脳症を引き起こす。また、肝臓では古くなった赤血球から生じるビリルビンの代謝も行う。非抱合型ビリルビンは水に溶けないが、肝臓によってグルクロン酸の抱合を受け水溶性となる。

2.2.2.6 グリコーゲン貯蔵

グリコーゲンは多数のグルコース分子が重合した高分子であり、動物における貯蔵多糖として知られている。グリコーゲンは脂肪やアミノ酸と同様のエネルギー貯蔵手段のひとつであるが、他の手段と違い、グリコーゲンは直接ブドウ糖に分解できる利点がある。肝臓では肝重量の 8% までのグリコーゲンを蓄えることができ、肝臓に貯蔵されてグリコーゲンのみが他の臓器でも利用することができる。

2.2.3 肝臓の構造^{81,83}

肝臓は右葉、左葉、方形葉、そして尾状葉の 4 つに分類される。この 4 葉は外観による分類であり、それぞれが持つ機能は同じである。肝臓の重さは体重の約 50 分の 1 であり、成人男性では約 1.5kg になる。肝臓の構造における最小単位は肝小葉と呼ばれる六角柱状の組織であり、直径 1-2 mm、高さ 1-2 mm 程度の大きさである。肝小葉の内部には、肝細胞が板状に配列した肝細胞板が存在し肝細胞板の間に類洞が存在する。肝小葉の中心には中心静脈が存在し、中心静脈を中心とした規則的な構造をとっている。肝小葉は肝臓内に約 50 万個存在し、肝小葉内は約 50 万個の肝細胞から構成される。心臓から送られてきた血液は門脈と肝動脈から肝臓に供給され、類洞にわたり肝細胞へ酸素・栄養を供給する。そして血液は中心静脈から 1 本の肝静脈に集まり肝臓から流出する。

2.2.4 肝臓を構成する細胞と役割

肝臓の細胞のうち約 70% は肝機能を発現する肝（実質）細胞である。残りの約 30% は胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、伊藤細胞、クッパー細胞などといった様々な肝非実質細胞で構成される⁸⁴。肝細胞は肝臓体積の約 85% を占め、直径約 20 μm の比較的大きな細胞である。本項では肝細胞と肝非実質細胞について述べる。

2.2.4.1 肝細胞

肝細胞は肝機能の大部分を担っており、ひとつひとつ全ての肝細胞がそのほとんどの肝機能を発現する。そのため、生体外における肝臓の研究では肝細胞が用いられることが多い。しかし、肝細胞は生体外においてほとんどの機能を急速に失い形質を維持できない。そのため生体外において、生体内環境を模倣した培養環境を設定することが重要となる。現在では、足場材料や増殖因子といった様々な方面から肝細胞培養に適した培養系の確立に向けた取り組みがなされている。しかしながら、治療用の人工肝臓装置や創薬研究にお

ける薬物代謝システムを開発し生体肝臓と同等の機能を発現させるには至っていないのが現状である。

2.2.4.2 肝非実質細胞

肝非実質細胞は、肝臓の構造を支持し、肝細胞の機能を補助する因子・サイトカインを分泌する働きをするものがある。生体肝臓の中において肝細胞は肝非実質細胞に支えられている、と言われるのはこのためである。以下に、肝非実質細胞について簡潔に述べる。

類洞内皮細胞は、類洞を形成すし、扁平な形状で存在する。類洞内皮細胞は一般的な内皮細胞と違い基底膜を有しておらず、肝細胞とは Disse 腔で隔たれている。また、細胞膜上に多数の小孔が存在し、この小孔を通じて肝細胞は血液との物質交換を行う。

伊藤細胞は、一般的に星細胞とも呼ばれ Disse 腔内に存在する。肝繊維芽細胞系の細胞であり、コラーゲンを算出する。また、ビタミン A 貯蔵細胞でもあり、ビタミン A をレチノールエステルとして貯蔵する。伊藤細胞の周辺には、コラーゲンやラミニンといった糖たんぱく質が分布し、これらの細胞外マトリクスと共に三次元的に存在する。更に、肝線維化、肝硬変を引き起こし、慢性肝炎や肝癌などに深く関与していることが示唆されている。

クッパー細胞は、肝臓特有の免疫細胞であり強い貪食能を有する。類洞内において類洞内皮細胞に接着して存在しており、肝臓内に流入した異物を捕らえるはたらきを持つ。

この他に、胆管を形成する胆管上皮細胞、類洞内に存在するナチュラルキラー細胞であるピット細胞などで肝非実質細胞は構成されている。

2.2.5 肝臓組織構築に対する試み

これまでに述べたことから、高機能肝組織の構築を実現するためには生体環境に近い培養環境を模倣することが重要な要素と言える。本項では、これまでに報告されている肝組織構築技術に関する研究成果を記す。

2.2.5.1 脱細胞化肝臓を足場材料とする手法

脱細胞化肝臓とは、生体肝臓を Triton X-100 等の界面活性剤で処理することで、細胞を除去し、ECM だけを残した材料である³²。この脱細胞化肝臓は肝臓の ECM に含まれる豊富な基質をそのまま利用できるだけでなく、類洞といった肝臓の微細な構造を利用できるメリットがある。門脈等から血管内皮細胞を播種することで肝臓の微小血管を模倣でき、その後、胎児肝細胞などの増殖性を有する肝細胞を播種することで肝臓様組織を生成することが可能となる⁸⁵⁻⁸⁷。また、生体肝臓の ECM を利用する手法として、脱細胞化肝臓に幹細胞を播種することで肝分化を促進することも可能となる。ECM に含まれる豊富な因子により肝機能の長期維持が可能となることが報告されている⁸⁷。一方、増殖性が旺盛な細胞

を利用しても細胞密度は低く、生体肝臓と同等な組織にするためには、細胞の播種方法などの最適化が必要である^{88,89}。

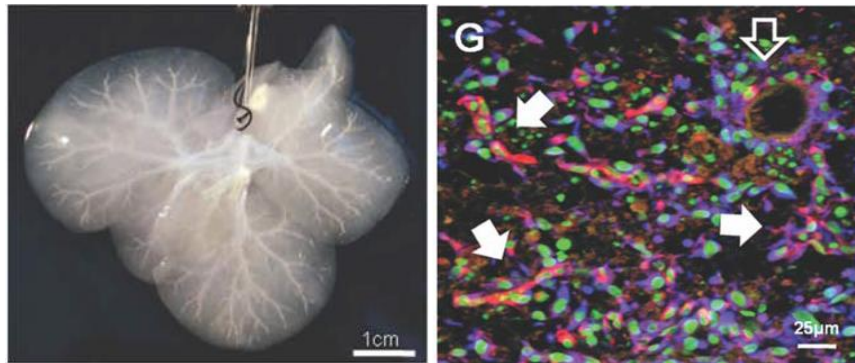


Fig. 2.3 Decellularized liver (Left) and hepatic tissue using decellularized liver (Right). Red : endothelial cells, blue : hepatocytes, green : cell nuclei.

2.2.5.2 ヒドロゲルを用いた組織構築法

ヒドロゲルは形状変化が容易かつ、ゲルの機械的強度の調節が可能である利点を持つ。また分子修飾も可能であり、細胞接着性の調節が可能な材料である。組織構築に利用されるゲル材料としてアルギン酸、コラーゲンが挙げられる^{31,90}。アルギン酸は、褐藻などに含まれる多糖類で、カルシウムイオンの存在下によってゲル化する材料であり、カルシウムイオンを除去することで容易にゾル転移するため扱いやすい材料として知られている。アルギン酸溶液中に細胞を懸濁し、カルシウムイオンと接触させることで組織構築を行う手法が検討されている⁹¹。また、酵素処理によってアルギン酸を分解する手法も報告されている⁹²。コラーゲンは肝臓に多く存在するマトリクスであり、肝細胞との親和性が高い。そのため、コラーゲンゲル中に法埋された肝細胞は機能、形質を長期維持することが可能となる。組織構築においてこの利点を活かし、コラーゲンをヒドロゲルとして利用する手法が報告されている⁹⁴。

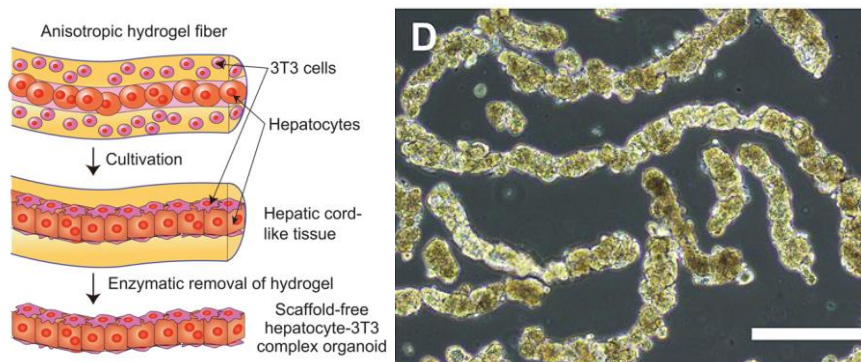


Fig. 2.4 Fiber-type hepatic tissue using alginate acid gel⁹².

2.2.5.3 増殖因子の徐放を用いた手法

増殖因子は組織構築において重要な要素のひとつであり、増殖因子の持続的な供給は細胞の構造維持や機能向上において役割を果たす。増殖因子の持続的な供給法として、ヘパリンを利用した徐放が挙げられる⁹⁴。ヘパリンは分子構造中に SO_3 基を多く含むため、負に帯電している。これに増殖因子中の正に帯電した部分が静電気力によって吸着されることで増殖因子が導入される⁹⁵。静電気力は結合力が弱いため、増殖因子は徐々に切り離され徐放される。ヘパリンは単体で存在すると不安定であり分解される欠点がある。そのため、増殖因子の徐放に用いる際は、ゲルなどに結合させる必要がある。ゲルの例としてコラーゲンやポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる^{95,96}。これらのゲルに FGF や EGF を固定化、徐放することで、肝細胞の高機能化だけでなく、血管内皮細胞の血管構築を促進させることが報告されている⁹⁷。

2.3 多層型スフェロイドを利用した肝臓組織構築

本研究は、スフェロイドを単位構造としたボトムアップ式の組織構築について検討を行う。本節ではスフェロイドと組織構築に関する既往の研究について述べる。

2.3.1 スフェロイド培養法

本研究では、多くの均質な肝細胞スフェロイドが組織構築の基本単位として必要となる。スフェロイド培養法については多くの手法が報告されており、本項では初代肝細胞に適したスフェロイド培養法について述べる。

一定数の細胞からスフェロイドを形成する手法としてハンギングドロップ法がひろく知られている。ハンギングドロップ法は、培養ディッシュの蓋の裏に細胞懸濁液の液滴を乗せ、蓋をひっくり返すことで細胞凝集塊を作る手法である。この手法は主に幹細胞の胚様体を形成する手法として用いられているが、培地交換が困難であり液滴の乾燥といった問題がある。似たような手法として非接着U底ウェルプレートを用いる手法もあるが、培地交換や回収操作の煩雑さといった課題がある⁹⁸。

比較的簡便に複数のスフェロイドを形成する手法として、非接着性培養ディッシュを用いる手法がある。細胞非接着性底面を作製するため、親水性高分子やアガロースゲルを培養ディッシュ底面にコーティングする。これによって、細胞は底面に接着せずに周囲の細胞と凝集塊を形成する⁹⁹。また、ディッシュ底面に細胞を接着させないため、ディッシュを旋回、攪拌させる手法もある。肝細胞に関しては、陽性荷電細胞培養ディッシュを用いた方法も報告されている。しかし、これらの手法の問題点として、一定数の細胞でスフェロイドを形成することが困難でスフェロイド粒径に分布が生じることが挙げられる。

足場材料を用いる手法として、多孔質体を利用する手法がある。ポリウレタン、ポリ乳酸、アルギン酸ゲルなど様々な材料を用いた多孔質培養担体に細胞を播種し、孔の内部でスフェロイドが形成される¹⁰⁰。この手法は、主に人工肝臓装置に多く用いられる手法であり、肝細胞スフェロイドを形成し、生体外で肝細胞の機能を維持することが示されている。しかしながら、培養担体からスフェロイドを回収する方法が確立されていないといった問題点がある。

大量のスフェロイドを形成する手法としてスピナーフラスコを用いた浮遊攪拌培養がある¹⁰¹。この手法は、幹細胞やCHO細胞などに広く利用される手法であり、攪拌速度や細胞密度でスフェロイドの大きさをある程度制御できる。しかしながら、攪拌によるせん断によって細胞にダメージがあり、せん断に弱い細胞には向かない手法である。

近年、均質かつ多くのスフェロイドを作製するため、マイクロウェルプレートが多く用いられている¹⁰²。微細化工技術を利用し、基材に微小な孔をあけ、細胞を播種することでスフェロイドを形成する。孔の深さや直径、孔の間隔など培養条件が設定しやすく、プレートに多くの孔を空けることで多くのスフェロイドを一度に作製することが可能である。

この他に、マイクロパターンニングを用いた接着底面のパターンニングや細胞を封入しスフェロイドを形成するマイクロカプセルなど様々な手法が研究されている。

2.3.2 共培養スフェロイド培養法

複数種類の細胞を共培養してスフェロイドを形成させる場合、ハンギングドロップ法やマイクロウェルプレートなどのように一定数の細胞数からひとつのスフェロイドを方法が適している。スフェロイドあたりの各細胞数を制御することが容易であり、スフェロイドの機能、細胞分布観察を評価しやすい。浮遊攪拌培養や浮遊旋回培養では大量のスフェロイドを形成できるが、スフェロイドを構成する各細胞数が一定にすることは非常に困難である。

本研究では、毛細血管網を有する培養組織を作製するために、複数の血管内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドが必要となる。複数の細胞によるスフェロイド作製の場合、細胞分布は各細胞の性質に依存する。似た性質をもつ肝細胞と膵島細胞の共培養スフェロイドでは、ランダムな細胞分布を示し、制御することが困難である⁶⁵。肝細胞と血管内皮細胞の場合、内皮細胞は高圧・低酸素環境を好むため、内皮細胞がスフェロイドの内部に分布することが確認されている¹⁰³。

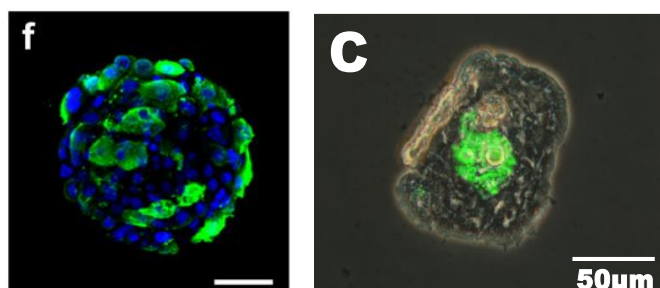


Fig. 2.5 Cell distributions of co-cultured spheroids. (Left) Spheroid co-cultured primary hepatocytes (green) with primary islet cells⁶⁵. (Right) Spheroid co-cultured primary hepatocytes with HUVECs (green)¹⁰³.

本研究では、内皮細胞をスフェロイド表面に配置するため、段階的なスフェロイド形成を行う。はじめに肝細胞を浮遊旋回培養し、大量の肝細胞スフェロイドを取得する。次に、これらの肝細胞スフェロイドの表面を薄いコラーゲンゲルでコーティングする。このコラーゲンは、血管内皮細胞の内部への侵入を防ぎ、内皮細胞の足場として接着を補助する役割をもつ。最後に肝細胞スフェロイドと血管内皮細胞を共培養することで内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドが得られる¹⁰⁴。

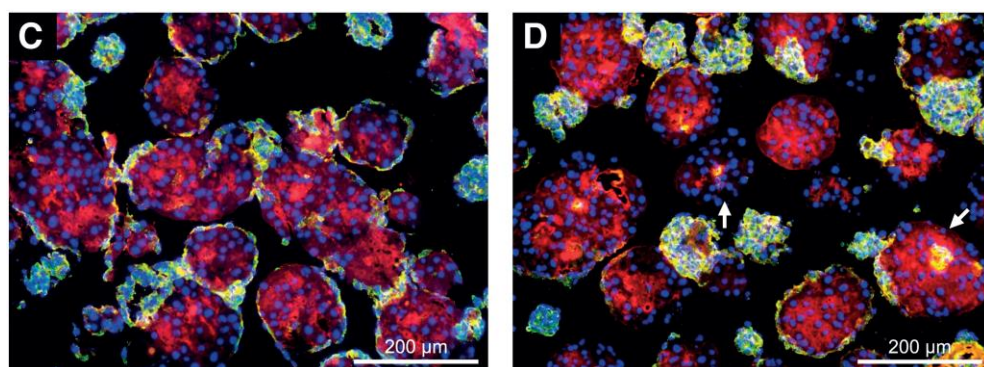


Fig. 2.6 Cell distributions of hepatocyte spheroids with HUVECs. Red : hepatocytes, green : HUVECs, blue : cell nuclei. (Left) Collagen-coated hepatocyte spheroids and HUVECs. (Right) Hepatocyte spheroids without a collagen coat and HUVECs¹⁰⁴.

2.3.3 中空糸内部空間を利用したスフェロイドの集積培養

本研究では、多層型スフェロイドを集積培養する培養担体として血漿分離用中空糸の内部空間を利用した。血漿分離用中空糸膜は酸素やたんぱく質等の基質を十分に通過させ、培養培地等の流動によるせん断から細胞を保護することが可能であり、組織培養に適した素材である。これまでに、肝細胞や胚性幹細胞（ES 細胞）、多能性幹細胞（iPS 細胞）など多くの細胞種における組織培養が行われてきた¹⁰⁵。本研究で用いる中空糸は親水性処理が施されており、中空糸膜に細胞は接着しにくい性質を持つ。また、中空糸の内径は 330 μm であり、粒径 100 μm 程度のスフェロイドを充填するには十分な大きさをもつ。以前の報告により、血管内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドを中空糸内部空間に充填した場合、規則的な内皮細胞ネットワークを有する肝組織の構築が確認されている¹⁰⁴。また、血管内皮細胞と共培養することで肝機能の向上も示されている。しかしながら、この組織構築法によって、血管網の構築、酸素・栄養供給の改善などはまだ確認されておらず、組織構築・培養条件において改善すべき点があると思われる。

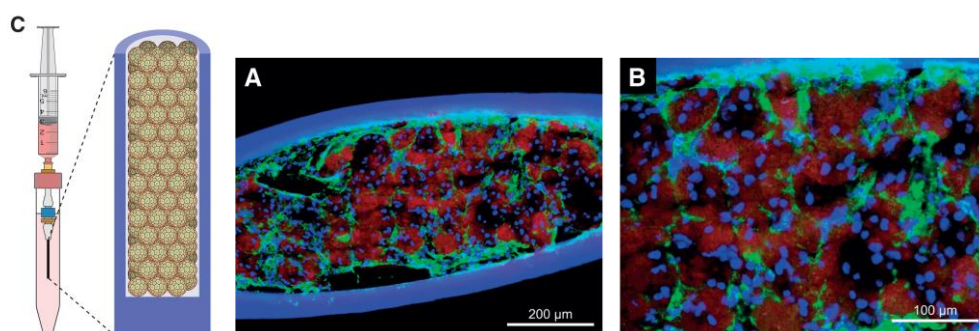


Fig. 2.7 (Left) Schematic illustration of spheroids seeding into hollow fiber bundle. (Center and right) Immunofluorescent microscopy of HUVEC-covered hepatocyte spheroids stained for hepatocytes (red) and HUVECs (green)¹⁰⁴.

第3章 内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイド集積による肝臓組織の構築

3.1 本章の目的及び概要

移植用の肝臓組織構築における満たすべき条件は、実用的な肝特異機能発現、生体への適合性、限られた移植スペースによる組織のコンパクト化など困難な課題が多い。更に、肝細胞の高い酸素要求性のため、肝臓組織構築には酸素や栄養を供給する血管組織を構築することが必須であり、高い肝特異機能発現と両立することは難しい課題となっている。本研究では 1.2 節の方針で述べたように、高機能発現と高細胞密度を両立するために肝細胞スフェロイドに着目し肝組織構築に利用した。まず血管内皮細胞で被覆した肝細胞スフェロイドを作製し、これを基本単位としたボトムアッププロセスによって高機能発現かつ高細胞密度の肝組織構築を試みた。本手法によって、組織構築時点で血管内皮細胞の規則的な空間配置が可能となり、三次元培養組織において重要である毛細血管網の迅速な構築が見込める。

本章では、はじめに本組織構築法において使用される肝細胞スフェロイドの大量培養法について培養条件を検討した。これによって得られた肝細胞スフェロイドを血管内皮細胞で被覆した多層型スフェロイドを作製し、これらを血漿分離用中空糸の内部空間に充填することで高密度な三次元培養肝組織を構築した。この肝組織の細胞生存率や肝特異機能、組織内部構造を評価することで、本手法の肝組織構築法としての有用性を示すことを目的とした。

3.2 肝細胞スフェロイドの大量培養

3.2.1 本節の目的

本研究の方針は前章で述べた通り、はじめに内皮細胞で被覆された肝細胞スフェロイドを作製し、それらを高密度に集積することで三次元肝組織を構築するものである。そのためにはまず、肝細胞スフェロイドを大量に作製する必要がある。また、スフェロイドにおける構成細胞への酸素・栄養の供給はスフェロイド表面からの拡散に依存するため、構成細胞の生存と肝特異機能を維持できる粒径制御が重要となる。既往の研究で述べた通り、ハンギングドロップ法やマルチウェルを利用した方法では、本研究における十分な量のスフェロイドを作製することが困難である。そこで本節では、組織構築の基本単位として十分な量のスフェロイドを得るために、浮遊旋回培養による肝細胞スフェロイド作製を行い、必要量かつ適切な粒径の肝細胞スフェロイドが得られる培養条件の検討を行った。

3.2.2 実験方法

3.2.2.1 ラット初代肝細胞の調製

全ての動物実験は九州大学動物実験委員会の承認を受け、また九州大学動物実験規則に基づいて実施した。

実験動物には、7-8 週齢のオスの Wistar ラット（九動または日本 SLC）を使用し、Seglen らのラット初代肝細胞調製法を参考にした¹⁰⁶。以下に詳細を示す。

ラットの腹腔内に三種混合麻酔薬（ミダゾラム・メデトミジン・ブトルファノール）を 0.55mL 注射し麻酔を施した。

手術台に固定し、腹部を 70%エタノールで消毒した。ピンセットと鉗で下腹部から剣状突起部まで開腹した。その際、誤って内臓を切ることの無いように腹腔内を目視し注意しながら開腹した。開腹後、胃と腸を向かって右に掻き出し、肝臓と門脈を露出させた。ピンセットで門脈に縫合糸をかけカニューレ固定用の結び輪を作った。その際、門脈から胃へ血管が分岐している位置よりも肝臓側の部位で縫合糸を通し、糸で血管を傷つけないよう注意した。門脈を半切し、Table 3.1 に示す前灌流液を 5mL/min で流しながら、17G のカニューレを門脈内に挿入した。カニューレを結び目より奥に挿入し縫合糸の結び目を縛って固定した。その後、胸部を開いて心臓を切断し脱血させ、灌流を 30mL/min にした。下大静脈をピンセットでつまみ肝臓を前灌流液で満たした後、ピンセットを離して心臓より前灌流液を排出させる操作を繰り返し、5-10 分間ほど脱血を行った。その後、下大静脈をつまんで肝臓内に前灌流液が充満した状態でポンプを止め、前灌流液から Table 3.1 に示すコラゲナーゼ溶液に交換した。

再びポンプを作動させた後、下大静脈を開放して約 30 mL/min で 1 分間程度コラゲナーゼ溶液を流し、肝臓内とラインの前灌流液をコラゲナーゼ溶液へと置換した。前灌流液と同様に下大静脈をピンセットでつまんで肝臓内部にコラゲナーゼ溶液を充満・排出させた。

第3章 内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイド集積による 肝臓組織の構築

コラゲナーゼ溶液に交換して1分後にポンプ流量を約 10 mL/min に減少させ、約 10 分間コラゲナーゼ溶液を流し肝臓内のコラーゲン等を分解した。肝臓内部がペースト状に消化されたところで、肝臓を鉗で摘出し冷蔵しておいたガラスシャーレに移した。

ガラスシャーレをクリーンベンチ内に入れ、シャーレ内に 10 mL、Table 3.2 に示す肝細胞培養培地を加えた。メスを用いて肝臓を細かく切断して肝細胞を遊離させた。次に、300 mL ビーカー上に固定したガーゼを培地で濡らし、シャーレ内の懸濁液をガーゼに移し濾過した。更に 300 mL ビーカー上に固定したステンレスメッシュフィルター（孔径 45 μ m）に懸濁液を移して再び濾過した。濾過した懸濁液 50 mL を遠沈管 2 本に等量に分注し、培地を加えて遠沈管内の懸濁液量を 45 mL にした。懸濁液を遠心分離(60 \times g, 90 s)した後、上清を捨てて新しい培地を静かに加え、再び懸濁液量を 45 mL に調節した。5 mL ガラスピペットで穏やかにピペッティングすることでペレットを少しずつ懸濁し肝細胞を再懸濁させた。懸濁後、再び遠心分離を行った。この操作で非実質細胞や細胞外マトリクスを取り除き、肝実質細胞を回収した。この洗浄操作を合計 3 回繰り返し、最後の遠心操作・再懸濁後は懸濁液量を 20 mL にした。2 本の懸濁液を 1 つにまとめた。

洗浄後の肝細胞懸濁液を穏やかにピペッティング・分散させて約 1 mL サンプルングし、血球計算盤を用いて細胞数および生存率の測定を行った。本研究では生存率が 85 % 以上のものを実験に用いた。

Table 3.1 Components of preperfusion buffer and collagenase solution.

Component	Preperfusion buffer [g/L]	Collagenase solution [g/L]
NaCl	8	8
KCl	0.4	0.4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	0.56
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.078	0.078
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.151	0.151
HEPES	2.38	2.38
Collagenase	-	0.5
Trypsin inhibitor	-	0.05
GEDTA	0.19	-
NaHCO ₃	0.35	0.35
Glucose	0.9	-
Penicillin	0.0588	0.0588
Streptomycin	0.1	0.1

Table 3.2 Components of hepatocyte culture medium.

Component	Concentration	
DMEM	13.5	g/L
EGF	50	μg/L
Insulin	10	mg/L
Hydrocortisone	7.5	mg/L
Proline	60	mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1	μM
H ₂ SeO ₅	3	pM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	50	pM
Linoleic acid	50	μg/L
Penicillin	0.0588	mg/L
Streptomycin	100	mg/L
NaHCO ₃	3.7	g/L
HEPES	5.985	dg/L

3.2.2.2 浮遊旋回培養による肝細胞スフェロイド形成

非接着 6 well プレートを用いて初代ラット肝細胞が肝細胞スフェロイドを大量に形成できるよう培養条件（播種細胞数、培養日数）を最適化した。以下に具体的な培養法を述べる。

初代ラット肝細胞を調製し、肝細胞懸濁液を 5.0×10^5 cells/mL に調節した。細胞培養用 6 well プレート（培養面積：9.6 cm²/well）中に 1.5 mL/well で懸濁液を播種し、水平円運動式ロータリーシェイカー上に置き 80 rpm で浮遊旋回培養した。

3.2.2.3 画像による肝細胞スフェロイド粒径分布の測定

6 well プレート中の肝細胞スフェロイドを位相差顕微鏡で観察、撮影した。撮影した画像をマイクロアナライザー(日本ポラデジタル)を用いて粒径を測定し、粒径分布を求めた。

3.2.3 実験結果

3.2.3.1 浮遊旋回培養によって作製された肝細胞スフェロイドの形態

浮遊旋回培養によって作製された肝細胞スフェロイドの形態を Fig. 3.1 に示す。6 well プレート上で浮遊旋回培養された初代肝細胞は培養 1 日目で大きな凝集体を形成しており、球状のスフェロイドが複数個接着した形状をしていた。旋回培養 2 日目では、粒径の小さなスフェロイドが多数観察された。その後培養 3 日目、4 日目につれてスフェロイドの形状に変化はないが、粒径の増加が観察された。

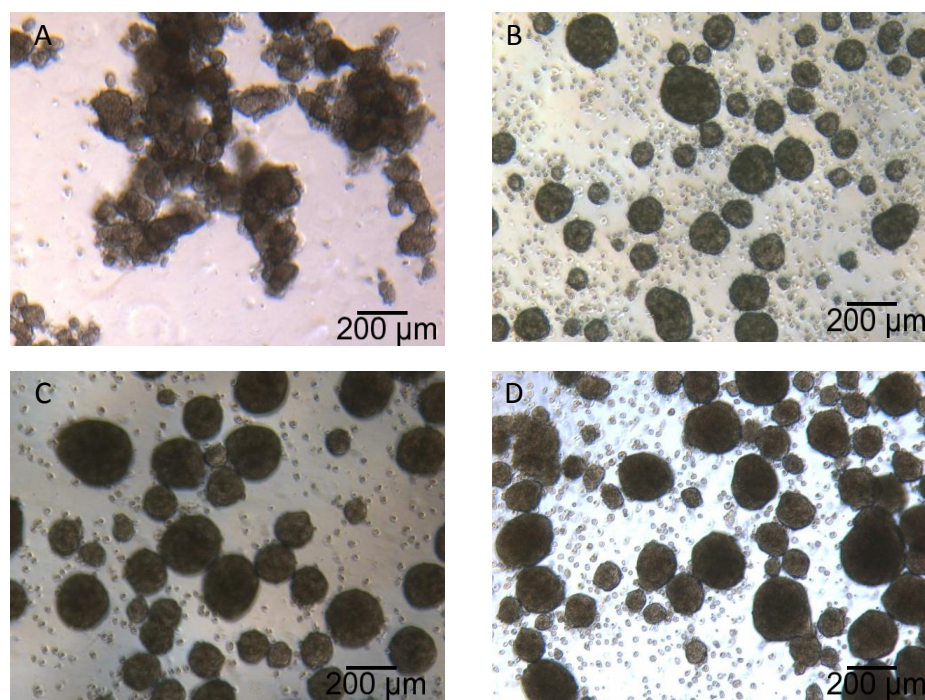


Fig. 3.1 Morphology of hepatocyte spheroids. (A) For 1 day (B) 2 day (C) 3 day and (D) 4 day.

3.2.3.2 スフェロイド粒径分布

浮遊旋回培養した肝細胞スフェロイドの粒径分布を Fig. 3.2 に示す。培養 1 日目では凝集体の形状が球状でないため計測できなかった。培養 2 日目では粒径が 100 μm 以下のスフェロイドが多く含まれ、培養経過に伴ってスフェロイド粒径が増大した。肝細胞は *in vitro* で殆ど増殖しない細胞のため、スフェロイド粒径の増大はスフェロイド同士の接着、融合によって生じたと考えられる。

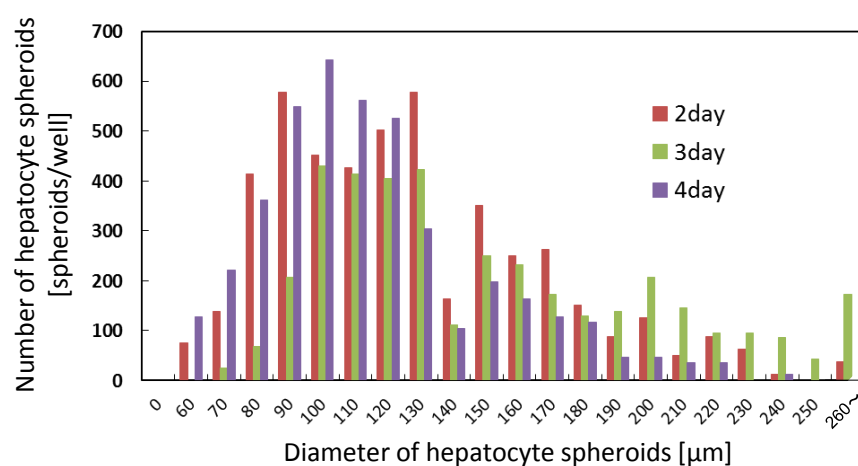


Fig. 3.2 Particle size distribution of hepatocyte spheroids.

3.2.4 考察

ラットから調製した初代肝細胞を浮遊旋回培養することで肝細胞スフェロイドを形成した。初代肝細胞は旋回培養によって細胞同士が接触することで組織体を形成した。調製直後では接着力が強いため、スフェロイドが接着することで大きな凝集体を形成したと考えられる。その後、旋回の遠心力によってスフェロイド同士の接着が外れ、2日目では球状の肝細胞スフェロイドが大量に得られた。2日目に得られた肝細胞スフェロイドの粒径は50-150 μm のものがほとんどを占めた。培養経過に伴って肝細胞スフェロイドの粒径分布は大きく変化した。初代肝細胞は *in vitro* においてほとんど増殖しないため、粒径の増大はスフェロイド同士の接着、融合によるものであると考えられる。肝細胞スフェロイドでは構成細胞への栄養・酸素供給が組織表面からの分子拡散による。Fick の拡散法則より生存維持できる肝細胞スフェロイド粒径の上限はおよそ 150 μm であり、組織構築に用いる肝細胞スフェロイドは粒径 150 μm が望ましい。よって本研究では粒径 50-150 μm の肝細胞スフェロイドが最も効率よく取得できる条件として、培養日数を2日間とした。

3.2.5 本節のまとめ

ラット初代肝細胞を用いて肝細胞スフェロイドを大量に作製する培養条件を検討した。スフェロイド表面からの酸素・栄養供給で構成細胞が生存可能なスフェロイド粒径は最大で 150 μm であり、粒径 50-150 μm のスフェロイドを最も多く作製できる播種細胞数と培養日数を決定した。今後の実験では、本節で決定した培養条件を利用する。

3.3 中空糸内部空間における内皮細胞被覆化肝細胞スフェロイドの集積による肝臓組織の構築と機能評価

3.3.1 本節の目的

前節において、ラット初代肝細胞を浮遊旋回培養することで、最適粒径の肝細胞スフェロイドを大量に取得する培養条件を決定した。本研究では、高機能かつ高密度の肝組織を構築する手法について検討を行う。本節では、はじめに内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを作製した。これを基本単位とし、血漿分離用中空糸の内部空間において高密度集積することによって三次元肝組織を作製した。また、本手法で作製した肝組織の細胞生存率、肝特異機能、組織内部構造を評価することで、本手法の肝組織構築法としての有用性を示すことを目的とした。

3.3.2 実験方法

3.3.2.1 HUVEC 継代培養法

HUVEC は Lonza の商品を購入し、培養培地は EGM-2 BulletKit (Lonza) を用いた。この培地は基礎培地である EBM-2 (Endothelial Basal Medium-2) と添加物質セットである EGM-2 SingleQuots (Hydrocortisone, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ascorbic acid, heparin, 2 % FBS, hEGF, GA-1000) から構成されており、EBM-2 に EGM-2 SingleQuots を加え EGM-2 (Endothelial Growth Medium-2) として使用した。

(1) HUVEC の解凍と継代培養

凍結保存状態の HUVEC (1×10^6 cells / mL) を 37 °C の恒温槽で解凍し、バイアル中の氷塊が 5 mm 大になった時点で 70 % エタノールをかけ素早くクリーンベンチ内に持ち込んだ。バイアルを開封し、バイアル中の HUVEC 懸濁液を穏やかにピペッティングし、15 mL 遠沈管に分注した EGM-2 (10 mL) に懸濁した。遠心分離した後、上清を除去して 40 mL の EGM-2 に懸濁し、100 mm 細胞培養ディッシュ 4 枚に播種した。その後、HUVEC を播種した細胞培養ディッシュをインキュベーター (37 °C, 5 % CO₂) 内に移動した。培地交換は 2 日に 1 回行い、80 - 90 % コンフルエントになるまで 4 日程度培養した。

(2) 継代培養した HUVEC の回収と凍結保存

HUVEC が 90 % コンフルエントになったことを確認して、ディッシュをクリーンベンチ内に持ち込んだ。ディッシュ内の培地を捨てた後、各ディッシュをカルシウム、マグネシウムを含まないリン酸緩衝溶液 (Calcium and magnesium-free phosphate buffered saline, CMF-PBS, Table 3.3) 5 mL で 2 回洗浄し、その後 CMF-PBS 6 mL を入れ、3 分間インキュベートした。ディッシュをクリーンベンチ内に持ち込み、0.25 % Trypsin (Sigma), 0.02% (w/w) EDTA 溶液を 1.25 mL 加え、再び 3 分間インキュベートした。顕微鏡下でディッシュを観察して HUVEC の形態が丸いことを確認し、ディッシュに軽く衝撃を与えて HUVEC をデ

ディッシュ底面から剥がした。HUVEC がディッシュ底面からはがれたことを確認した後、各ディッシュに血清添加培地を 3 mL 加え Trypsin の反応を停止させた。その後、50 mL 遠沈管に HUVEC 懸濁液を回収し、遠心分離した。遠心分離後、上清を捨て EGM-2 を 10 mL 添加しピペッティングして HUVEC を再懸濁した。ピペッティングした後 100 μ L をサンプリングして細胞数を計測した。

HUVEC を凍結保存させる場合には EGM-2 の代わりにセルバンカー(十慈フィールド)を用いて HUVEC 懸濁液を 1×10^6 cells/mL の細胞密度で調製した。容量 2 mL のクライオバイアルを用意し、調製した HUVEC 懸濁液を素早く 1 mL ずつ分注してバイセル（日本フリーザー）に入れディープフリーザー(-80 $^{\circ}$ C)内に移動させ、翌日以降に液体窒素中に保存した。

Table 3.3 Components of Calcium and magnesium free phosphate buffered saline.

Component	Concentration	
NaCl	8.0	g/L
KCl	0.2	g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9	g/L
KH ₂ PO ₄	0.2	g/L

3.3.2.2 肝細胞スフェロイドの回収

ガラスピペットを用いて 6 well プレート中の肝細胞スフェロイド懸濁液を 50 mL 遠沈管に回収した。スフェロイドがプレートに残った場合は培地で洗浄して回収した。回収後、懸濁液を遠心分離して上清を捨て、10 mL 程度に調節した。

300 mL ビーカーに目開き 45 μ m の金属メッシュを載せ、更に目開き 150 μ m の金属メッシュを重ね、金属メッシュの中心部に培地 1 mL 程度を滴下して 2 枚のメッシュ中心部を濡らし、通過させた。その後、10 mL ガラスピペットを用いて肝細胞スフェロイド懸濁液をメッシュ中心部に少しずつ滴下し、スフェロイドをメッシュにトラップさせた。その際培地がメッシュの縁に付着しないよう注意した。懸濁液をすべて滴下し終えたら、メッシュに新しい培地を 5 mL 程度滴下して小さいスフェロイドがメッシュを通過できるよう洗浄した。培地がメッシュを完全に通過し終えたことを確認し、150 μ m メッシュを傾けないように静かに持ち上げ、1 mL ピペットマンを用いてメッシュの底側から培地を吸い取って 300 mL ビーカーの上に置いた。同様に 45 μ m メッシュを持ち上げ、余分な培地を吸い取った後、メッシュをひっくり返して 25 mL 自立型遠沈管に載せた。その際メッシュの濡れている領域が遠沈管の口に収まるよう注意した。1 mL ピペットマンを用いて新しい培地を 5 mL 程度滴下し、メッシュにトラップされたスフェロイドを遠沈管に回収した (Fig. 3.3)。メッシュにスフェロイドが残っている場合は、メッシュを回転し再び洗浄した。最後に 1 mL ピペットマンを用いてスフェロイド懸濁液を穏やかにピペッティングし、100 μ L サン

プリングして冷蔵庫(4 °C)に保存した。

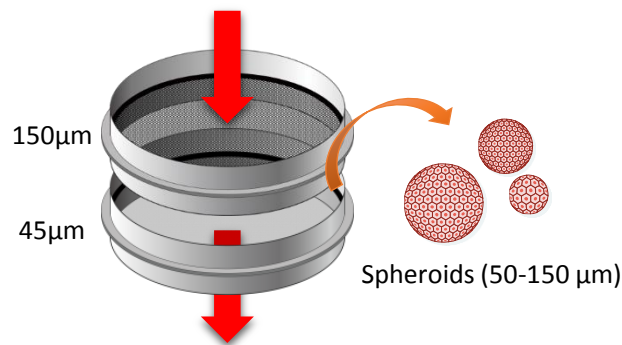


Fig. 3.3 Collection of hepatocyte spheroids.

3.3.2.3 肝細胞スフェロイドの細胞数測定

サンプリングした肝細胞スフェロイド懸濁液 100 µL に Stabilizing Reagent A (Chemometric) を 300 µL 加えた。懸濁液をポリトロンホモジナイザーで処理し (15000 rpm, 3 min) 懸濁液中に細胞核を遊離させた。懸濁液と等量の Stabilizing Reagent B (ChemoMetec; pH 8.7) を加え懸濁液の pH を中性にした。その後、懸濁液を NucleoCassette (Chemometric) 内に吸い上げて、カセット内でヨウ化プロピジウムと反応させることで核を蛍光標識した。最後に NucleoCassette を NucleoCounter (Chemometric) にセットして懸濁液中の核数を測定した。

細胞には 2 核の細胞が存在するため、今回用いたラット初代肝細胞では 2 核の割合を 1.45 として核数から細胞数を算出した。

3.3.2.4 肝細胞スフェロイド表面へのコラーゲンコート

懸濁液中に分散した肝細胞スフェロイドの表面にコラーゲンコートを行った。コラーゲンは Type I コラーゲンを主成分とする Cellmatrix Type I-A(新田ゼラチン)を使用した。詳細な手順を以下に示す。

予め肝細胞スフェロイド懸濁液の上清を捨てて懸濁液量が数 mL になるように調節し冷蔵(4 °C)した。その後クリーンベンチ内に氷を入れたビーカーを用意し、15 mL 遠沈管を氷の中に必要な本数差し込んでコラーゲン溶液(Cellmatrix Type I-A)を 1 mL ずつ分注した。続いて濃縮培地を 125 µL 添加し、全体が黄色くなるようピペッティングした。更に再構成用緩衝液 125 µL を加え、全体がピンク色になるまでピペッティングした。この際、コラーゲン溶液中に気泡ができないよう注意した。

冷蔵しておいたスフェロイド懸濁液をクリーンベンチ内に移動し、調製したコラーゲン溶液を 1 mL ずつ加え数回ピペッティングして攪拌、懸濁した。攪拌後すぐに冷蔵庫(4 °C)に戻し 1 時間おいた。

1 時間後、コラーゲンを添加したスフェロイド懸濁液をクリーンベンチ内に移し、冷蔵温度の培地を 10 mL 加えてスフェロイドを分散させ肝細胞スフェロイドを遠心分離した。

遠心分離後、上清を捨て 5 mL 程度の培地に再懸濁して播種直前まで冷蔵保存した。

3.3.2.5 肝細胞スフェロイドと HUVEC の共培養

アガロースをコートし、非接着処理をした培養ディッシュ上に肝細胞スフェロイドと HUVEC を播種した。詳細は次の通りである。

アガロース 4g と超純水 100 mL を瓶に入れオートクレーブした。オートクレーブ後、冷めないうちにアガロース溶液をクリーンベンチ内に入れた。オートピペッターを用いて 100 mm 培養ディッシュにアガロース溶液 6 mL 程度を入れディッシュ全体に広げた。この時、ディッシュ上でアガロースの斑ができないよう注意した。その後 10 分程度おいてアガロース溶液をゲル化させ、置換用培地を 10 mL 入れてゲル内の水分を置換した。細胞播種時にディッシュ内の置換用培地を捨てた。

アガロースコートしたディッシュに肝細胞スフェロイド(1×10^6 cells / 8 mL / dish)と HUVEC(2×10^6 cells / 8 mL / dish)懸濁液を播種した。ディッシュ内の細胞を均等に分散させインキュベーター内(37 °C, 5 % CO₂)に入れて培養した。2 日に 1 回培地を 4 mL 加えた。

3.3.2.6 内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドの回収

3.3.2.2 と同様に、培養ディッシュからスフェロイドを回収し、45 – 150 μm のスフェロイドを分画した。

3.3.2.7 内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドの免疫蛍光染色

本検討では、作製した肝組織の内部細胞分布を観察するため免疫蛍光染色による評価を行った。肝細胞マーカーであるアルブミン及び HUVEC マーカーである hvWF (human von Willebrand Factor) について免疫染色を行った。詳細は以下に示す。

(1) スフェロイドの凍結

凍結ブロック作製用の型にアルミ箔を押しつけて 3 × 1 × 1 cm 程度の箱形の容器を作製した。アルミ泊容器内に凍結包埋剤(Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, サクラファインテックジャパン)を深さ 1 cm 程度注いで包埋の準備をした。

スフェロイド懸濁液を 15 mL 円沈管に回収し、遠心分離してスフェロイドを沈降させた。できるだけ上清の培地を捨て、円沈管に培地がわずかに残るようにした。1 mL ピペットマンで回収したスフェロイドを吸い上げ、凍結包埋剤の中にピペットチップを差し込み、スフェロイドを包埋剤の深さ 5 mm の部分に注入した。ピンセットで金型ごとアルミ泊容器をつかみ、ディープフリーザー内に移し冷凍保存した。

(2) 凍結切片の作製

使用する前日に凍結ミクロトーム(Leica Microsystems)のスイッチを入れて装置内部温度を-20℃にした。その後、ディープフリーザー内に凍結保存したサンプルを取り出し、サンプル固定用の台座に凍結包埋剤を塗り、サンプルを台座に平行に押し付けた。ディープフリーザー内にサンプルを移動し包埋剤を凍結してサンプルを台座に固定した。包埋剤が完全に白くなったことを確認して、ミクロトーム内に移し3時間程度放置し、サンプルの温度を安定させた。

切片の厚さを15 μmに設定して、右側のハンドルを回してサンプルを徐々にカミソリ刃に近づけていき、そのまま包埋剤を切り出してサンプルのスライス面を滑らかにした。更に右ハンドルを回し、スフェロイドが見え始めるまで包埋剤を切り出した。スフェロイドが見え始めたら、切片厚さを10 μmに設定した。筆を使い切片を立ち上げらせながら右ハンドルを回し、作製された切片にMASコートスライドガラス(松浪硝子)を接触させて切片をスライドガラス上に移した。実体顕微鏡(Leica)で切片を観察し、歪みが無いことを確認し、1枚のスライドガラスに4枚程度の凍結切片を乗せた後、一晩自然乾燥させた。

(3) 凍結切片の免疫蛍光染色

染色する前に実体顕微鏡で切片を観察し、染色する切片を決定した。乾燥させた切片の乗ったスライドガラスをアセトン中に入れ10分間冷蔵し、サンプル中のタンパクの固定化と膜透過処理を行った。スライドガラスを風乾して余分な包埋剤を水で軽く拭き取った後カルシウム、マグネシウムを添加したリン酸緩衝溶液(Calcium and magnesium added phosphate buffered saline, CM(+)-PBS, Table 3.4)中に5分間浸して包埋剤を洗浄した。

余分なCM(+)-PBSをふき取り乾燥させた後、リキッドブロッカー(PAP PEN, 大道産業株式会社)を用いてサンプル周辺に円を描き再び乾燥させた。前日に作製し冷蔵しておいたブロッキング液(CM(+)-PBS中に10% (w/w)スキムミルク)をサンプル上に150 - 200 μL程度滴下して室温で30分間ブロッキングした。ブロッキングで使用した液量を参考に抗体の使用量を決定した。スライドガラスを傾けて余分な液をこぼした後、CM(+)-PBS中に浸して5分間洗浄した。更にCM(+)-PBSを2回交換して5分間の洗浄を3回行った。

スライドガラスを取り出し、サンプル部分に触れないようにしてスライドガラス上の余計な水分を拭き取った。予めCM(+)-PBSに希釈した1次抗体をサンプル上に滴下した。その後、水を入れた容器に入れフタをし、冷蔵、遮光状態で反応させた。反応後CM(+)-PBS中に浸して5分間洗浄を3回行った。

洗浄後、予めCM(+)-PBSに希釈した2次抗体をサンプル上に滴下した。2次抗体希釈液は蛍光色素が結合しているため使用まで遮光で冷蔵保存しておいた。2次抗体希釈液滴下後、水を入れた容器と一緒にフタをして室温、遮光状態で反応させた。反応後CM(+)-PBS中に浸して5分間洗浄を3回行い、観察するまでCM(+)-PBSに浸し遮光保存した。最後に、観察するスライドガラスを取り出し、サンプル部分に触れないようにしてできる限り水分

第3章 内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイド集積による 肝臓組織の構築

を拭き取った後、CM(+)-PBS とカバーガラスで封入して蛍光顕微鏡で撮影した。抗体の反応条件は Table 3.5 に示す。

Table 3.4 Components of Calcium and magnesium added phosphate buffered saline.

Component	Concentration	
NaCl	8.0	g/L
KCl	0.2	g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9	g/L
KH ₂ PO ₄	0.2	g/L
CaCl ₂	0.1	g/L
MgCl ₂	0.1	g/L

Table 3.5 Immunoreaction conditions and antibodies.

Manipulation	Antibody (Manufacturer)	Dilution ratio	Condition
Primary reaction	Rabbit polyclonal anti-human von Willebrand factor antibody (Dako)	1:100	Overnight, 4 °C
	Goat IgG fraction against rat albumin (MP Biomedicals)	1:100	
Secondary reaction	Swine anti-rabbit IgG FITC-conjugated antibody (Dako)	1:100	1 hour, room temperature
	Donkey anti-goat IgG rhodamine-conjugated antibody (Millipore)	1:100	
	Hoechst 33342 (Dojindo)	1:1000	

3.3.2.8 HUVEC 被覆化肝細胞スフェロイドの集積による肝組織の構築法と培養法

本検討では、高密度三次元肝組織を構築する培養担体として血漿分離用中空糸 (poly-ethylene treated with ethylene vinyl alcohol, PE-EVAL, 旭化成メディカル) を使用した。本中空糸は内径が $330\ \mu\text{m}$ であり、直径 $150\ \mu\text{m}$ 以下のスフェロイドを高密度に集積させるのに十分な培養空間を有しており、中空糸膜を通じて培養組織へ栄養・酸素を供給することが可能である。本研究に使用した中空糸バンドルの作製及び播種・培養方法については以下に示す。

(1) 中空糸バンドルの作製方法

中空糸を2本ずつにまとめ、片端を半田鋺で焼き封止した。封止部分から約4 cmの部分を1 cmに切断した ϕ 2-4 mmのシリコンチューブに入れ、チューブ内をシリコン (DOW CORNING) で埋めた。1日乾燥させ、シリコンチューブごと中空糸を切断し、細胞の播種口となる穴を開け、切断面に気泡がないことを確認した。 ϕ 2-4 mmのシリコンチューブの外側に1.5 cmに切断した ϕ 4-6 mmのシリコンチューブを接続し、チューブ同士をシリコンで固定した。ルアーフィッティングに ϕ 2-4 mmのシリコンチューブをつけ、作製した中空糸バンドルを接続した(Fig. 3.4)。

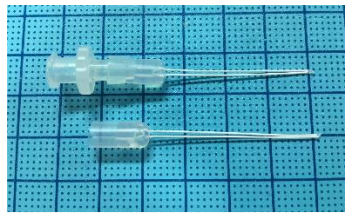


Fig. 3.4 Hollow fiber bundle.

(2) 中空糸内部空間への播種方法

HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドを 4.0×10^5 cells/mL に懸濁し、1 mL シリンジ (TERUMO) で1 mL 吸い取り、ルアーフィッティング部分に接続した。ルアーフィッティング部分にたまっている気泡を抜いた後、スフェロイド懸濁液をゆっくりと注入した (HEP-SPH/HUVEC)。遠心機にセットし遠心充填を行った。中空糸バンドルの先端から1.5 cmの部分をメスで切断した。切断箇所を封止し、12 well プレートに移し、培地量1 mL、45 rpm で旋回培養を行った。培養培地には肝細胞培養培地 (D-HDM) に EGM-2 SingleQuots (Lonza) を加えた培地 (D-HDM + Growth Factor) を用い、2日に1回培地交換を行った。概略を Fig. 3.5 に示す。

比較検討するため、単分散の肝細胞 (4.0×10^5 cells/mL、HEP)、単分散の肝細胞と HUVEC (4.0×10^5 hepatocytes, 1.5×10^5 HUVECs /mL、HEP/HUVEC)、コラーゲンコートされた肝細胞スフェロイド (4.0×10^5 cells/mL、HEP-SPH) を同様に中空糸に播種し、培養した。各培養系における培養日程を Fig. 3.6 に示す。

第3章 内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイド集積による 肝臓組織の構築

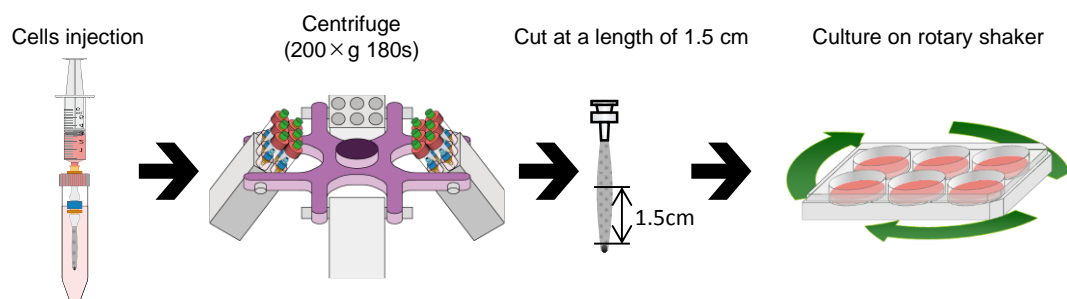


Fig. 3.5 Illustration of seeding cells into hollow fiber bundle.

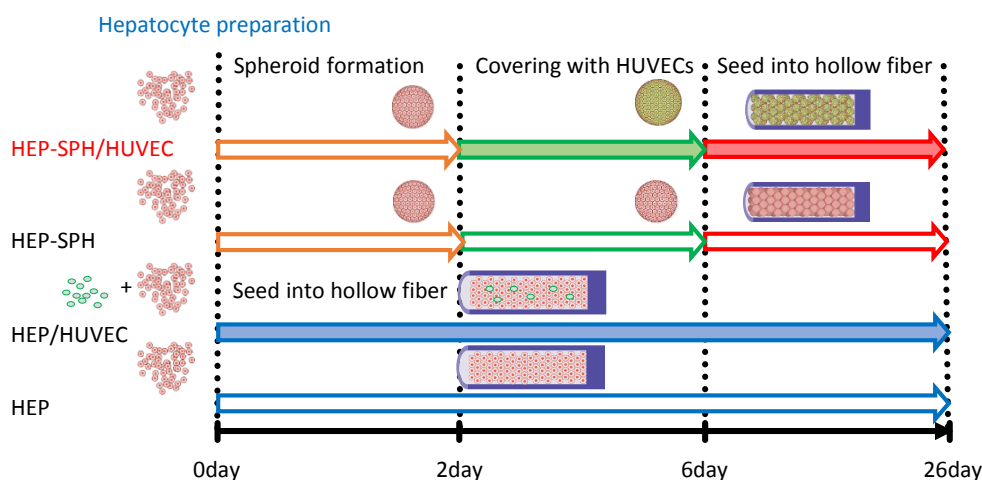


Fig. 3.6 Cultivation schedule of four culture systems.

3.3.2.9 作製肝組織の核数計数法

使用した装置は 3.3.2.3 と同じである。以下に詳細を示す。

肝組織を内包した中空糸をピンセットで摘み上げ、はさみで細切しクエン酸溶液（21 mg/mL）中に懸濁した。使用したはさみをクエン酸で洗浄し、中空糸懸濁液中加入した。その後、懸濁液をポリトロンホモジナイザーで処理し（15000 rpm, 3 min）、懸濁液中に組織中の細胞核を遊離させた。懸濁液から 100 μ L サンプルングし、懸濁液と等量の **Stabilizing Reagent B** を加え懸濁液の pH を中性にした。その後、懸濁液を NucleoCassette 内に吸い上げ、NucleoCounter にセットして懸濁液中の核数を測定した。

3.3.2.10 肝特異機能評価法

(1) アンモニア代謝活性測定法

本検討では解毒能の指標としてアンモニア代謝能を評価した。アンモニアは食物中のたんぱく質や腸分泌液中の尿素が分解されることで生産される。アンモニアは肝臓で尿素に変換され無毒化される。肝機能が低下するとアンモニアが蓄積され肝性脳症を発症する。培養培地に 1 mM となるようアンモニアを添加し、その後、6 時間および 24 時間までの代

謝量を用いて評価を行った。アンモニア濃度測定にはアンモニアテストワコーを用いた。

(2) アルブミン分泌活性測定法

本検討ではたんぱく質合成能の指標としてアルブミン分泌能を評価した。アルブミンは血中たんぱく質の 50% 以上を占める肝臓で合成されたたんぱく質であり、浸透圧の調整や物質の輸送といった役割を持つ。新鮮培地に交換後 24 時間のアルブミン分泌量を用いて評価を行った。アルブミン濃度の測定には、ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 法を用いた。

3.3.2.11 作製肝組織の免疫蛍光染色

本検討では、作製した肝組織の内部細胞分布を観察するため免疫蛍光染色による評価を行った。肝細胞マーカーであるアルブミン及び HUVEC マーカーである hvWF について免疫染色を行った。染色方法については、3.3.2.7 と同じである。以下に中空糸の凍結方法について示す。

凍結ブロック作製の型にアルミ箔を押しつけて $3 \times 1 \times 1$ cm 程度の箱形の容器を作製した。アルミ泊容器内に凍結包埋剤を深さ 5 mm 程度注いで包埋の準備をした。

中空糸バンドルの先端と中央部を切断し 2 つに分断した。ピンセットで中空糸をつかみ、アルミ箔容器の先端から 5 mm の部分に 2 本入れた。この時、中空糸が平行かつ水平になるようにした。中空糸の上から包埋剤を入れ、中空糸を包埋した。中空糸が容器のふちに付かないようピンセットで調節した。長いピンセットで金型ごとアルミ泊容器をつかみ、ディープフリーザー内に移動し保存した。

3.3.2.12 HE 染色

培養終了した中空糸を 10 % 中性緩衝ホルマリン液に入れて固定化し、病理組織診断として HE 染色を依頼した(臨床病態医学研究所, CRC グループ)。

3.3.3 実験結果

3.3.3.1 コラーゲンコートされた肝細胞スフェロイドと HUVEC の浮遊共培養

コラーゲンコートされた肝細胞スフェロイドと HUVEC の浮遊共培養における形態を Fig. 3.7 に示す。播種直後では肝細胞スフェロイドの周囲に単分散 HUVEC が多数存在していた。肝細胞スフェロイドの表面に複数の HUVEC が接着していることが確認された。

浮遊共培養 4 日目では、肝細胞スフェロイドの表面に HUVEC の膜が形成されていることが示唆される。

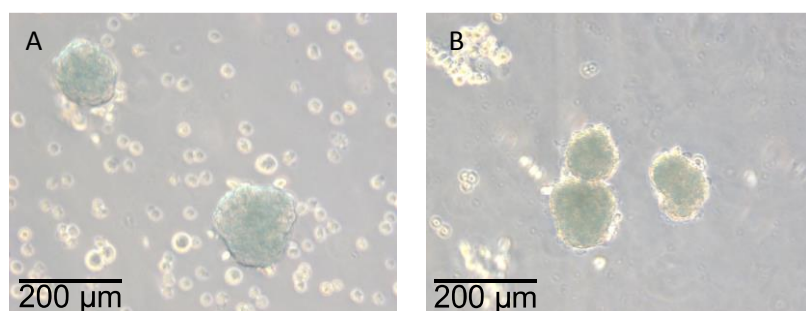


Fig. 3.7 Morphology of hepatocyte spheroids and HUVECs in suspension culture (A) immediately after seeding and (B) at 4 Days.

3.3.3.2 HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドの細胞分布

コラーゲンコートされた肝細胞スフェロイドと HUVEC の浮遊共培養 4 日目における共培養スフェロイドの免疫蛍光染色画像を Fig. 3.8 に示す。赤色の蛍光で示される肝細胞（アルブミン）スフェロイドの表面を緑色の蛍光で示される HUVEC（hvWF）の薄い膜が覆っている細胞分布が観察された。この 2 重構造はスフェロイド粒径の大小に依存せず、どの大きさのスフェロイドで観察された。

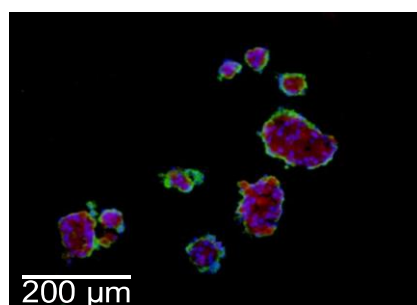


Fig. 3.8 Immunofluorescence staining of hepatocyte spheroids covered with HUVECs for albumin (red) and vWF (green). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue).

3.3.3.3 作製肝組織の細胞数・細胞生存率変化

中空糸内部空間で作製された肝組織の細胞数変化を Fig. 3.9A に示す。また、播種直後の核数を 100 % とした培養経過に伴う細胞生存率変化を算出した (Fig. 3.9B)。全ての培養系において、中空糸播種後 1 日目において細胞数及び細胞生存率が減少し、その後はほぼ一定の細胞数を保った。細胞生存率では、HEP-SPH/HUVEC 培養系では、中空糸 1 日目以降 60 % を保っていたのに対し、その他 3 つの培養系では生存率が 40 % に低下した。

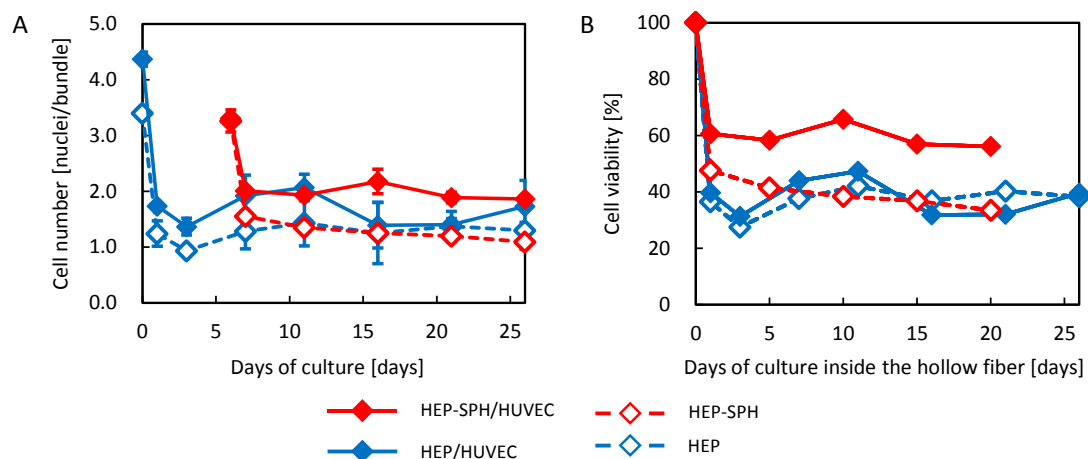


Fig. 3.9 Changes in cell number and viability in the hollow fiber bundle. Data are presented as means \pm standard deviation. Changes in (A) cell number and (B) cell viability in the four culture systems.

3.3.3.4 作製肝組織の肝特異機能評価

(1) アンモニア代謝活性評価

中空糸内部空間で作製された肝組織のアンモニア代謝活性変化を Fig. 3.10A に示す。単分散で播種された 2 つの培養系では、中空糸播種後アンモニア代謝活性が徐々に低下し、7 日目以降はほぼ一定だった。これに比べ、スフェロイドで播種された 2 つの培養系では、中空糸播種後アンモニア代謝活性はほぼ一定の機能を示した。また、HEP-SPH/HUVEC 培養系では、他 3 つの培養系に比べ、およそ 1.5 倍のアンモニア代謝活性を示した。

(2) アルブミン分泌活性評価

中空糸内部空間で作製された肝組織のアルブミン分泌活性変化を Fig. 3.10B に示す。単分散細胞・HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドが播種された 3 つの培養系では、中空糸播種後アルブミン分泌活性が徐々に向上した。また、肝細胞と HUVEC を共培養した 2 つの培養系では肝細胞のみの培養系に比べおよそ 2 倍のアルブミン分泌活性を示した。

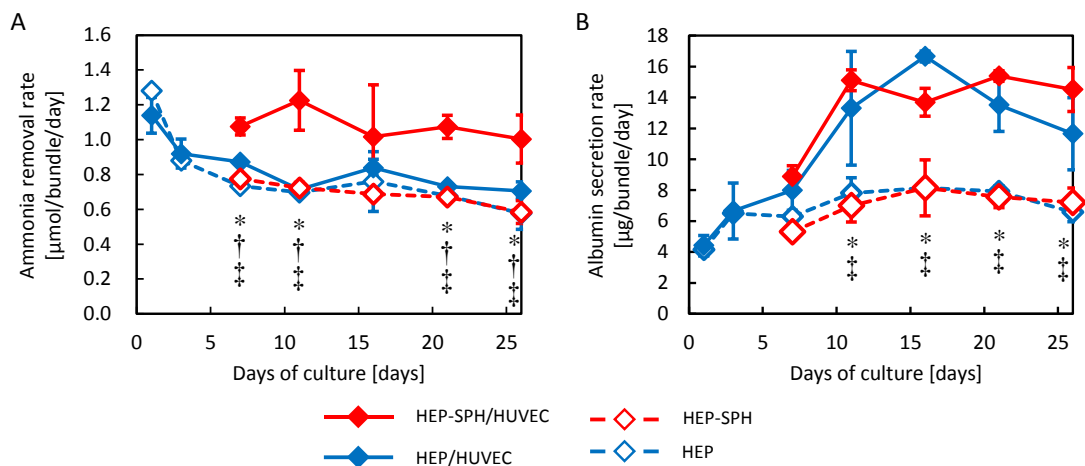


Fig. 3.10 Liver-specific functions of the four culture systems. Data are presented as means \pm standard deviation. (A) Ammonia removal and (B) albumin secretion rates of hepatocytes per hollow fiber bundle. *, † and ‡ denote significant differences in HEP-SPH, HEP/HUVEC and HEP culture systems, respectively, compared with the HEP-SPH/HUVEC culture system at the same time point ($P < 0.05$).

3.3.3.5 作製肝組織の組織学的評価

(1) HE 染色

組織体内部構造を確認するため各培養系において中空糸充填直後と中空糸内培養 10 日目において HE 染色を行った。それぞれの培養系における HE 染色画像を Fig. 3.11 に示す。

中空糸充填直後は、どの培養系においても組織体細胞密度が高く、組織体全体の細胞に細胞核が存在していた。

培養 10 日目において HEP-SPH/HUVEC 培養系では、組織中の細胞密度が高く、組織全体にわたって核が分布していた。それに比べ他 3 つの培養系では、核は組織表面から 50 μm にのみ分布しており、組織中心部には細胞質のみからなる細胞壊死層が存在していた。

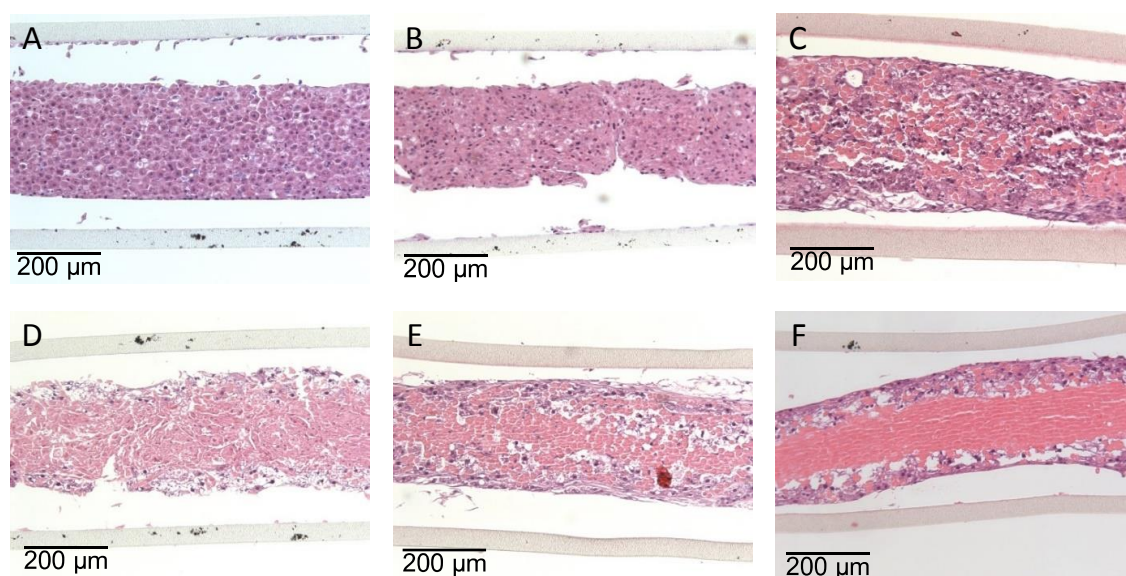


Fig. 3.11 HE staining of cross-sections of hepatic tissues formed in the hollow fibers. Scale bar = 200 μm . (A) Monodispersed and (B) spheroid cell culture systems immediately after seeding into the hollow fiber bundle. (C) HEP-SPH/HUVEC, (D) HEP-SPH, (E) HEP/HUVEC and (F) HEP culture systems 15 days after seeding into the hollow fiber bundle.

(2) 免疫蛍光染色

組織体内部細胞分布を確認するため、肝細胞と HUVEC の共培養を行った 2 つの培養系において免疫蛍光染色を行った。それぞれの培養系における免疫蛍光染色画像を Fig. 3.12 に示す。

HEP-SPH/HUVEC 培養系では、規則的な肝細胞と HUVEC の分布が観察された。培養経過後においても組織中心部に細胞核は存在しており、ネットワークを形成した HUVEC の分布が観察された。

HEP/HUVEC 培養系では、HUVEC は中空糸膜付近に多く分布しており、中空糸内の中心部にはほとんど存在していなかった。培養経過後、中空糸膜から約 50 μ m 以内のみ細胞核が存在しており、HUVEC は組織内にわずかに点在していた。

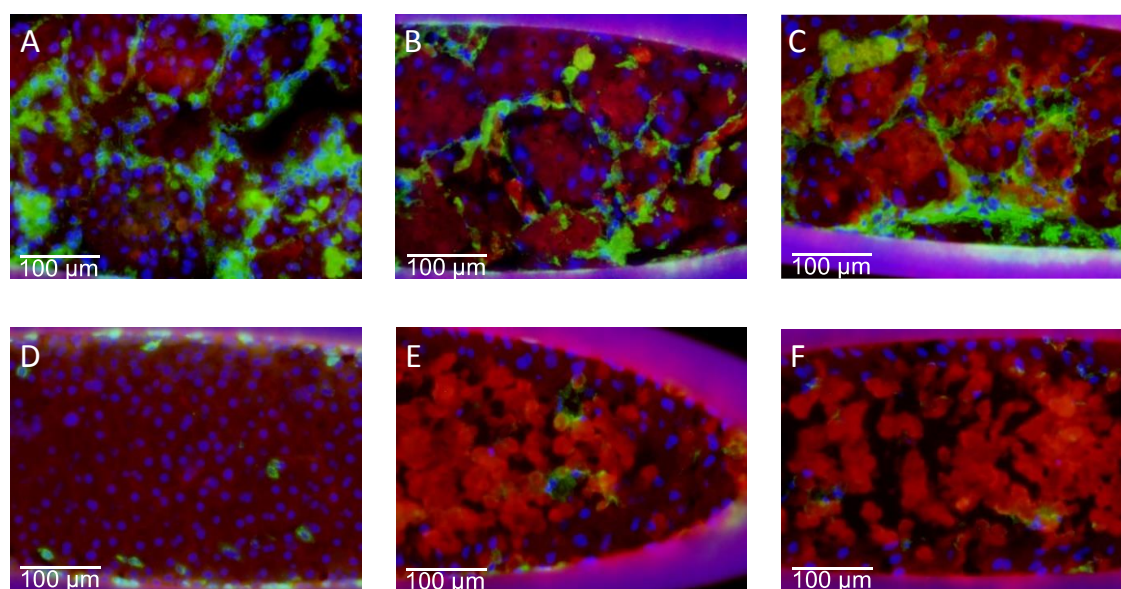


Fig. 3.12 Immunofluorescence staining of hepatic tissues formed in hollow fibers for albumin (red) and vWF (green). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar = 100 μ m. (A–C) Images of the HEP-SPH/HUVEC and (D–F) HEP/HUVEC culture systems. (A and D) Immediately after, (B and E) 5 days after and (C and F) 10 days after seeding into the hollow fiber bundle.

3.3.4 考察

3.3.4.1 HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドの作製

本研究では、コラーゲンコーティングした肝細胞スフェロイドを単分散 HUVEC と浮遊共培養することで、肝細胞スフェロイド表面を HUVEC で被覆した多層型スフェロイドを作製した。通常、血管内皮細胞は低酸素状態を好み、細胞組織体の内部に侵入する特性があるため、肝細胞スフェロイドと HUVEC を共培養すると HUVEC はスフェロイド内部に分布し表面を覆わないことが分かっている。そこで本研究では、肝細胞スフェロイドをコラーゲングルで被覆し、HUVEC との共培養を行った。薄いコラーゲン膜でスフェロイドをコーティングすることで、足場として HUVEC の接着を手助けすると共にスフェロイド内部への HUVEC の侵入を防ぐことが可能となったと考えられる^{103,104}。

3.3.4.2 作製肝組織の生存率

全ての培養系において中空糸播種後 1 日目で細胞数が減少した。毛細血管網が無い培養組織では組織構成細胞への栄養・酸素供給が組織表面からの分子拡散のみとなるため、十分な栄養・酸素が届かない組織中心部の細胞は壊死する。Fick の拡散法則より、円柱状の肝細胞組織では組織表面からおおよそ 50 μm の範囲のみ十分な酸素が供給されるため、それより内部の細胞は酸素供給不足により壊死したと考えられる。その場合、面積割合から算出される肝細胞が生存可能な部分の割合は約 48 %であり、今回の HEP、HEP/HUVEC、HEP-SPH の生存率とほぼ合致する。これらに比べ HEP-SPH/HUVEC 培養系では約 60 %の生存率を示した。肝細胞調製時の酵素処理によるアポトーシスを考慮した場合、この高い生存率により組織構造の変化が示唆される。この培養系では組織表面からの拡散の他に酸素を供給する経路が構築された可能性が考えられる。この酸素供給路は、多層型スフェロイドを充填した際の、スフェロイド間の隙間が要因となっていると考えられる。スフェロイドが再組織化する際、内皮細胞がこの隙間を維持、もしくは管状構造を構築し隙間に培地が満たされる。培地中では細胞質内より拡散係数が高いため、より組織中心部までの酸素供給が可能となる。一方、HUVEC 無しのスフェロイドでは、スフェロイドが再組織化する際、隙間が完全に統合し、単分散細胞による肝組織と同様になったと考えられる。これらの空隙とそこに満たされた培地の影響により、細胞密度の差が組織表層から分子拡散によって供給される酸素・栄養の拡散係数の差に影響し、組織体内部細胞の生存に繋がったと考察される。これより、本組織構築法によって酸素・栄養の供給が可能となる毛細血管様構造の構築が示唆された。

3.3.4.3 肝特異機能評価

HEP-SPH/HUVEC 培養系では、他 3 つの培養系に比べ、およそ 1.5 倍のアンモニア代謝活性を示した。3.3.4.2 で述べたように、HEP-SPH/HUVEC 培養系では酸素を組織内部に供給する経路が構築された可能性が考えられるため、肝細胞に十分な栄養・酸素が供給されアンモニア代謝能力が向上したと考えられる。更に、HUVEC が分泌するサイトカインや ECM が組織中肝細胞に良好に供給されたことも肝機能向上の要因とされる。

肝細胞を HUVEC と共培養した場合、肝細胞のみと比較してアルブミン分泌能が約 2 倍に向上した。肝細胞は HUVEC と共培養することで肝機能の向上が示されることが広く報告されている⁶⁰⁻⁶³。また、HUVEC は肝細胞と共培養することで、代謝活性や脂質、ビタミン、コレステロールバランスに重要な役割をもつことも報告されている¹⁰⁷。本組織構築法においても、肝細胞と HUVEC が接触し細胞間相互作用が生じたためアルブミン分泌能の向上が示されたと考えられる。

本章では、アンモニア代謝、アルブミン分泌の 2 つの機能について評価を行ったが、HEP/HUVEC 培養系の機能発現に違いが生じた。代謝機能と合成機能で共培養効果に違いが生じる可能性が考えられる。また、アルブミンは肝細胞のみが分泌するたんぱく質であるが、アンモニアは全ての細胞が排出するものであり、HUVEC が排出したアンモニアにより、みかけのアンモニア濃度が上がったことが要因として考えられる。

3.3.4.4 組織学的評価

HE 染色の結果より、中空系内部空間に単分散細胞またはスフェロイドを充填することで高細胞密度の組織体を形成できることが確認された。HEP-SPH/HUVEC 培養系では、培養経過後において、細胞密度はスフェロイド充填直後と比べほぼ同程度だった。また、細胞核の分布においてもあまり変化は見られなかった。一方、その他の 3 条件では、培養経過後において、組織中心部には細胞質のみの層が存在しており細胞核が組織表面部のみに分布していた。細胞核が分布している層の厚さはおよそ 50 μm であり、3.3.4.2 の考察と合致する。これより、肝組織内部の細胞は十分な酸素供給が得られず壊死したことが示唆される。

免疫蛍光染色の結果より、HEP-SPH/HUVEC 培養系では、組織構築時点においておよそ 100 μm 間隔で HUVEC のネットワークが分布する組織構造が構築されていることが確認された。この構造によって肝細胞との密な細胞間相互作用が生じたと考えられる。培養経過後において、HUVEC と細胞核の分布に大きな変化は無く、組織構造が維持されていることが示された。しかしながら、毛細血管網の存在を示す HUVEC の環状構造は確認できなかった。この検討において明確な毛細血管網の構築には至らなかったと考えられるため、組織構築・培養条件の更なる検討が必要である。HEP/HUVEC 培養系では、播種直後において HUVEC が中空系膜付近に多く分布していた。細胞の比重、密度の違いによって播種時に分布が偏ったと考えられる。培養経過後において、細胞核は組織表層のみに分布して

いた。HE 染色の結果と同様であり、組織表層細胞の細胞のみが生存を維持したためと考えられる。また培養経過後において HUVEC の減少が示唆された。組織構築時点における分布の違いによってこの結果がもたらされたと考えられる。

3.3.5 本節のまとめ

本節では、HUVEC に被覆された肝細胞スフェロイドを中空糸内部空間に充填し高細胞密度の三次元培養組織を構築した。細胞生存率、肝特異機能を評価した結果、他の手法によって構築された肝組織と比較し、高い生存率、肝特異機能を示した。また、組織内部細胞の生存が維持され、栄養・酸素を供給する毛細血管網の存在が示唆された。これらの結果より、本組織構築法は高密度肝組織の構築法として有効であることが示された。しかしながら、毛細血管様構造の存在を確認することができなかった。毛細血管網の構築と更なる肝特異機能の向上に向けた組織構築・培養条件の検討が必要である。

3.4 本章のまとめ

本章では以下の事項を示した。

1. コラーゲンコートされた肝細胞スフェロイドと HUVEC を浮遊共培養することによって、HUVEC に被覆された肝細胞スフェロイドを作製することに成功した。
2. HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドを血漿分離用中空糸の内部空間に集積することで、高密度な三次元肝組織を作製した。
3. この手法によって作製した肝組織は単分散の細胞によって形成された肝組織に比べ、高い細胞生存率・肝特異機能を示した。この結果より、本肝組織構築法の有用性が示された。
4. この手法によって作製した肝組織は組織中心部細胞が生存可能であり、組織中に規則的な HUVEC のネットワーク構造が形成されていた。

第4章 スフェロイド集積法による高機能肝臓組織構築の試み

4.1 本章の目的及び概要

第3章において、内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドの集積による三次元肝組織構築は組織構成細胞の生存の維持・肝特異機能の向上に効果的であることが示された。また、組織中心部細胞の生存や規則的な内皮細胞のネットワーク構築も確認されている。しかし、肝疾患の治療が可能な肝組織に不可欠である血管構造の構築は確認できなかった。この問題を解決するため、内皮細胞による血管構築能力の強化、更に肝特異機能発現を向上できるアプローチが必要となる。

この課題を克服するためのアプローチとして、“組織構成細胞への効果的な細胞増殖因子の供給”と“肝細胞・内皮細胞の活性を高める間葉系細胞との共培養”の2つが挙げられる。増殖因子の供給に関しては、**Matrigel** など細胞培養に適した生体材料の利用が候補に挙げられるが、高価かつ生物由来の材料である点など問題がある。間葉系細胞との共培養に関しては、間葉系幹細胞やNIH/3T3細胞が内皮細胞の血管構築を促進する細胞として近年、多く報告がされており、組織構築に活用することで、肝機能の向上と血管化が期待される。

そこで本章では、増殖因子を固定化・徐放する材料として知られる“ヘパリン”と肝細胞の活性を向上し内皮細胞の血管化を促進する“NIH/3T3細胞”に着目し、本手法に組み込むことで、作製肝組織の肝機能向上と血管化組織の構築を試みた。

4.2 ヘパリンを利用した増殖因子の徐放による高機能肝臓組織構築の試み

4.2.1 本節の目的

組織構成細胞へ増殖因子の継続的な提供を実現するため、本節では増殖因子を保持・徐放する性質がある“ヘパリン”に着目した。ヘパリンは、グルコサミノグリカン（Glycosaminoglycan : GAG）のひとつであり、増殖因子に対する親和性が高く、静電気力によって増殖因子を保持・徐放することが可能となる⁹⁴。本節では、肝細胞スフェロイドをコートし内皮細胞の足場となるコラーゲンゲルにヘパリンを導入し、増殖因子を固定化・徐放させることで肝細胞と内皮細胞に継続的な増殖因子供給を行った(Fig. 4.1)。これによって肝細胞の肝機能向上、血管内皮細胞による速やかな管状構造形成が期待できる。本節では、作製肝組織の細胞生存率、肝特異機能、組織内部構造を評価することで、ヘパリンによる増殖因子の徐放が本組織構築法に与える影響を評価することを目的とした。

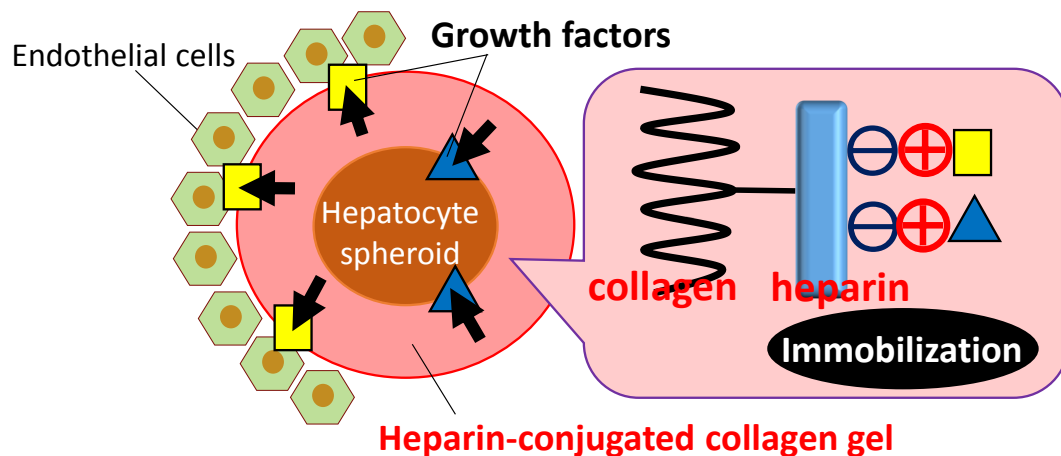


Fig. 4.1 Concept of sustained release of growth factors.

4.2.2 実験方法

4.2.2.1 ヘパリン導入コラーゲン溶液の作製

事前に透析チューブ (MWCO : 1000) (Spectrum Laboratories, Inc.) を 7 cm 程度に切り、超純水に 1 時間程度浸し、付着しているアジ化ナトリウムを洗浄した。50 mM MES 溶液 (pH 5.6) 3 mL を 15 mL 遠沈管に分注し、ヘパリンナトリウム (和光純薬) 30 mg、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (ペプチド研究所) 30 mg、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (和光純薬) 18 mg を添加し、ボルテックスで攪拌した。その後、室温で 30 分間静置してヘパリンのカルボキシル基を活性化させた。透析チューブの片端をクリップで留め、上記の溶液 2 mL を加え、もう片端をクリップで留めた。ビーカーに入れた 50 mM MES 溶液 500 mL に透析チューブを入れ、冷蔵で 3 時間透析を行った。3 時間後、MES 溶液を新しいものに置換し、再び 3 時間透析を行った。その後、透析チューブ内溶液を 15 mL 遠沈管に回収し、濾過滅菌を行った。コラーゲン溶液である Cellmatrix Type I-A 1 mL を 15 mL 遠沈管に分注した。コラーゲン溶液中にヘパリン溶液を 1 μ L 加え、導入量 10 μ g/mL とした。濃縮 MEM 培地 (新田ゼラチン) を 125 μ L を添加し、全体が黄色になるようにピペティングした。使用する直前まで冷蔵で保存した。ヘパリン導入コラーゲンの反応機序を Fig. 4.2 に示す。

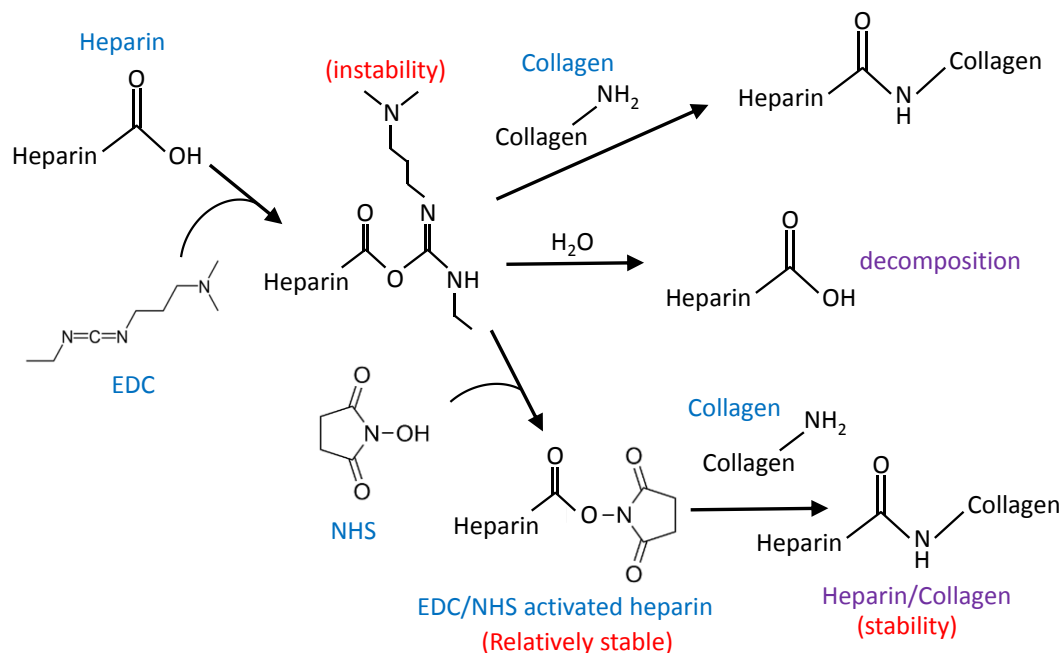


Fig. 4.2 Reaction mechanism of heparin-conjugated collagen.

4.2.2.2 肝細胞スフェロイドの作製

3.2.2.2 と同様の方法で初代ラット肝細胞を浮遊旋回培養して肝細胞スフェロイドを得た。

4.2.2.3 増殖因子固定化ヘパリン導入コラーゲンによる肝細胞スフェロイドコーティング

予め肝細胞スフェロイド懸濁液の上清を捨てて懸濁液量が数 mL になるように調節し冷蔵した。その後クリーンベンチ内に氷を入れたビーカーを用意し、増殖因子を固定化させたヘパリン導入コラーゲン溶液の入った遠沈管を氷に差し込んだ。再構成用緩衝液 125 μ L を加え、全体がピンク色になるまでピペッティングした。この際、コラーゲン溶液中に気泡ができないよう注意した。

冷蔵しておいたスフェロイド懸濁液をクリーンベンチ内に移動し、調製したコラーゲン溶液を 1 mL 加え数回ピペッティングして攪拌した。攪拌後すぐに冷蔵庫(4 $^{\circ}$ C)に戻し 1 時間放置し、ヘパリンに増殖因子を固定化し、更に肝細胞スフェロイドを増殖因子固定化ヘパリン導入コラーゲンでコーティングした。1 時間後、コラーゲンを添加したスフェロイド懸濁液をクリーンベンチ内に移動し、氷冷培地 10 mL を加えてスフェロイドを分散させ遠心分離した。遠心分離後、上清を捨て適量の氷冷培地に再懸濁して播種直前まで冷蔵した。

4.2.2.4 HUVEC 被覆化肝細胞スフェロイドの作製

3.3.2.5 と同様の方法で肝細胞スフェロイドと HUVEC を共培養し、HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドを作製した。

4.2.2.5 培養方法

3.3.2.8 と同様の方法で HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドを中空糸内部空間へ播種し、培養した。

4.2.2.6 作成肝組織の核数計数法

3.3.2.9 と同様の方法で測定した。

4.2.2.7 肝特異機能の測定法

3.3.2.10 と同様の方法で、アンモニア代謝活性とアルブミン分泌活性を測定した。

4.2.2.8 作製肝組織の免疫蛍光染色

3.3.2.11 と同様の方法で中空糸を凍結し、3.3.2.7 と同様の方法で凍結切片の免疫蛍光染色を行った。

4.2.3 実験結果

4.2.3.1 作製肝組織の細胞数・細胞生存率変化

中空糸内部空間で作製された肝組織の細胞数変化を Fig. 4.3A に示す。また、播種直後の核数を 100 % とした培養経過に伴う細胞生存率変化を算出した (Fig. 4.3B)。中空糸播種後 1 日目において急激な細胞数の減少がみられ、その後大きな細胞数の変化は無かった。ヘパリンを利用していない肝組織と比べ、中空糸播種後 5、10 日目では高い細胞生存率が示されたが、15、20 日目ではほぼ同じ細胞生存率を示した。

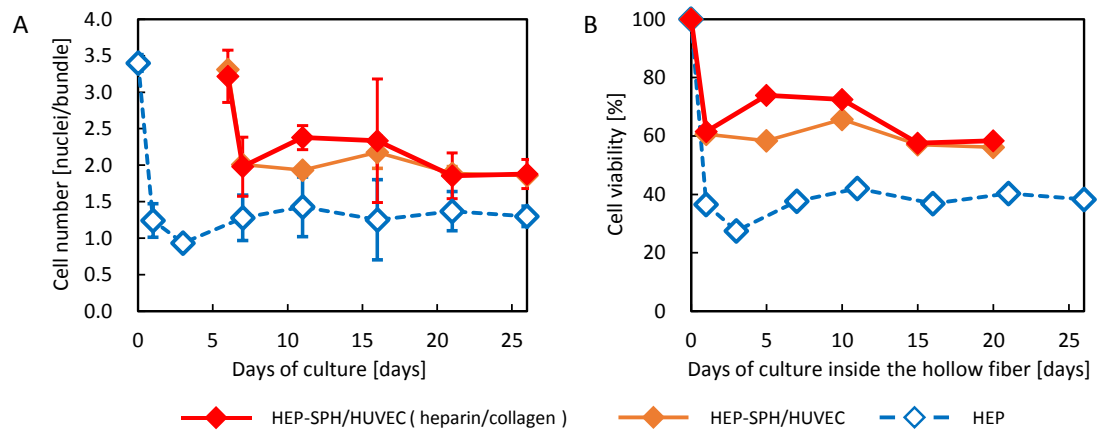


Fig. 4.3 Changes in cell number and viability in the hollow fiber bundle. Changes in (A) cell number and (B) cell viability.

4.2.3.2 作製肝組織の肝特異機能評価

(1) アンモニア代謝活性評価

中空糸内部空間で作製された肝組織のアンモニア代謝活性変化を Fig. 4.4A に示す。培養期間を通じて、高いアンモニア代謝活性を発現したが、ヘパリンを利用していない肝組織とほぼ同じ機能発現レベルを示した。また培養期間を通して大きなアンモニア代謝活性の変化はみられなかった。

(2) アルブミン分泌活性評価

中空糸内部空間で作製された肝組織のアルブミン分泌活性変化を Fig. 4.4B に示す。培養期間を通じて、ほぼ一定の高いアルブミン分泌活性を示した。また、単分散の肝細胞によって構築された肝組織と比べ約 3 倍の機能を確認した。

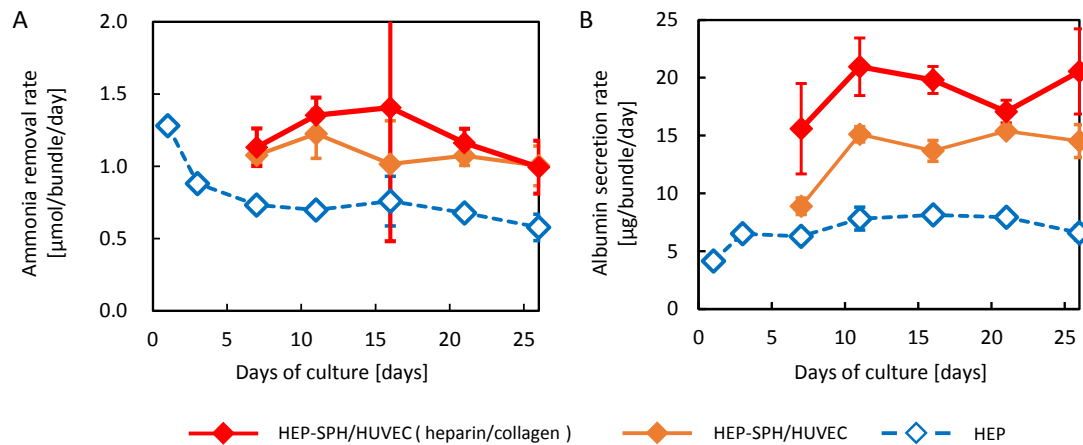


Fig. 4.4 Liver-specific functions of the four culture systems. (A) Ammonia removal and (B) albumin secretion rates of hepatocytes per hollow fiber bundle.

4.2.3.3 作製肝組織の免疫蛍光染色

増殖因子固定化ヘパリン導入コラーゲンゲルを用いて作製した肝組織の組織内部細胞分布を観察するため、免疫蛍光染色によって肝細胞（アルブミン）と HUVEC（h_vWF）を染色した。免疫蛍光染色画像を Fig. 4.5 に示す。肝組織全体における細胞核の分布が観察された。ネットワークを構築した HUVEC が肝組織中に多く観察された。また、HUVEC による径が約 5-50 μm の環状構造が組織内部で観察された。また、HUVEC の分布に偏りがあることが示唆された。

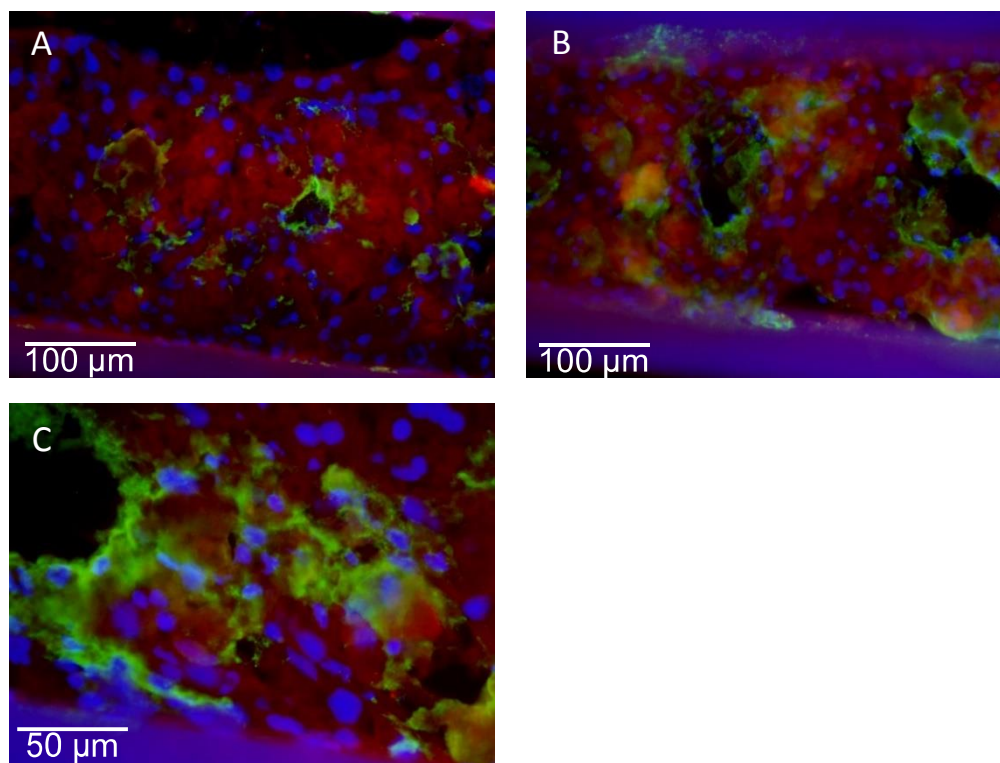


Fig. 4.5 Immunofluorescence staining of hepatic tissues using heparin-conjugated collagen formed in hollow fibers for albumin (red) and vWF (green). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). (A and B) Scale bar = 100 μm . (C) Scale bar = 50 μm .

4.2.4 考察

本実験では、ヘパリン導入コラーゲンに増殖因子を固定化することで、アルブミン分泌活性の向上が示された。増殖因子が肝細胞に継続的に徐放されることで機能が向上したと考えられる。一方、ヘパリンを導入することで、肝細胞スフェロイド表面の HUVEC 分布の偏りが示唆された。ヘパリンは負に帯電しており、これによって HUVEC の接着が阻害されたと思われる。この結果より、細胞生存率やアンモニア代謝機能に影響があったと考えられる。

また、内皮細胞による環状構造が複数観察された。しかしながら、組織中における内皮細胞の分布に偏りがみられ、内皮細胞ネットワーク構築ができていないのが現状である。ヘパリンは負に帯電しており、足場材料に導入することで細胞の接着を阻害することが報告されている⁹⁵。また、ヘパリンの導入量によって、コラーゲンゲルの強度やゲル化に影響がある。増殖因子の固定量はヘパリンの導入量に依存するため、本手法に適したヘパリンの導入量を決定し、増殖因子の徐放かつ内皮細胞の接着を補助する足場材料として有用なヘパリン導入コラーゲンを作製する条件を検討する必要がある。これによって、高機能発現かつ高密度の血管網構築の可能性はある。

4.2.5 本節のまとめ

増殖因子を固定化・徐放するはたらきのあるヘパリン導入コラーゲンゲルで肝細胞スフェロイドをコーティングし、これを足場として HUVEC で被覆した肝細胞スフェロイドを作製した。これらを中空糸内部空間に集積することで三次元肝組織を作製し、肝機能と組織構造解析を行い、本組織構築法におけるヘパリンの有効性を評価した。その結果、アルブミン分泌活性において高い機能発現がみられ、組織中における内皮細胞の環状構造が観察されたなど、肝機能と HUVEC の血管化における改善が示唆された。しかし、肝細胞スフェロイド表面における HUVEC の分布の偏りがみられ、ヘパリン導入コラーゲンゲルにおけるヘパリンの導入量やスフェロイド作製条件などに関して検討の余地があると考えられる。

4.3 間葉系細胞との共培養による高機能肝臓組織構築の試み

4.3.1 本節の目的

血管内皮細胞と間質細胞の共培養に関する研究は多く報告されており、間質細胞が血管内皮細胞の管状構造形成をサポートしていることが広く知られている。3T3 細胞や間葉系幹細胞など多種細胞によってその効果は確認されており、近年の組織工学において間質細胞との共培養は広く利用されている⁶⁶⁻⁶⁸。一方、間質細胞は肝細胞と共培養することによって、肝機能の向上や肝細胞の形質、生存の維持に効果的であることも報告されている⁶⁴。本節では、内皮細胞の管状構造形成と肝細胞の機能向上に有効である繊維芽細胞 NIH/3T3 細胞に着目した。肝細胞スフェロイド表面を HUVEC と NIH/3T3 細胞で被覆し、これを単位構造として三次元肝組織を構築した(Fig. 4.6)。この肝組織の肝機能、構造、酸素供給などを評価することで、本組織構築法における間葉系細胞の有効性を調査することを目的とした。

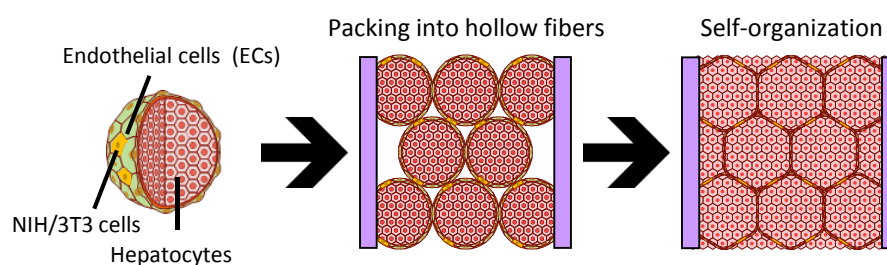


Fig. 4.6 Bottom-up method using hepatocyte spheroids covered with endothelial cells and NIH/3T3 cells.

4.3.2 実験方法

4.3.2.1 NIH/3T3 細胞継代培養法

NIH/3T3 細胞は理化学研究所から購入し、培養培地には、DMEM (Life Technologies Japan) に 10 % FBS (HyClone) と Penicillin/Streptomycin Solution (DS ファーマ) を添加して使用した。

(1) NIH/3T3 細胞の解凍と継代培養

凍結保存状態の NIH/3T3 細胞(1×10^6 cells / mL)を 37 °C の恒温槽で解凍し、バイアル中の氷塊が 5 mm 大になった時点で 70 %エタノールをかけクリーンベンチ内に素早く持ち込んだ。静かにバイアルを開封し、バイアル中の NIH/3T3 細胞懸濁液をピペッティングし、15 mL 遠沈管に分注した培養培地 (10 mL) に懸濁した。遠心分離した後、上清を除去して 18 mL の培養培地に懸濁し、60 mm 細胞培養ディッシュ 3 枚に播種した。その後、NIH/3T3 細胞を播種した細胞培養ディッシュをインキュベーター内に移動した。80 - 90 %コンフルエントになるまで 3 日程度培養した。

(2) 継代培養した NIH/3T3 細胞の回収と凍結保存

NIH/3T3 細胞が 80 - 90 %コンフルエントになったことを確認して、ディッシュをクリーンベンチ内に入れた。ディッシュ内の培地を捨てた後、各ディッシュを CMF-PBS 3 mL で 2 回洗浄し、25 % Trypsin , 0.02% EDTA 溶液を 1 mL 加え、3 分間インキュベートした。NIH/3T3 細胞がディッシュ底面からはがれたことを確認した後、各ディッシュに培養培地を 3 mL 加え Trypsin の反応を停止させた。15 mL 遠沈管へ NIH/3T3 細胞懸濁液を回収し、遠心分離した。遠心分離後、上清を捨てて培養培地を 10 mL 添加しピペッティングして NIH/3T3 細胞を再懸濁させた。その後、懸濁液を 100 μ L サンプリングして冷蔵庫保存した。サンプリングした懸濁液 100 μ L にトリパンブルー溶液 100 μ L を混合し、血球計算盤を用いて細胞数および生存率の測定を行った。本研究では生存率が 95 %以上のものを実験に用いた。

NIH/3T3 細胞を凍結保存させる場合には培養培地の代わりにセルバンカーを用いて NIH/3T3 細胞懸濁液を 1×10^6 cells/mL の細胞密度で調製した。容量 2 mL のクライオバイアルを用意し、調製した NIH/3T3 細胞懸濁液を 1 mL ずつ分注してディープフリーザー内に移動し、翌日以降に液体窒素中に保存した。

4.3.2.2 肝細胞スフェロイドと HUVEC、NIH/3T3 細胞の共培養

HUVEC と NIH/3T3 細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを作製するため、アガロースで非接着処理した培養ディッシュ上に肝細胞スフェロイドと HUVEC、NIH/3T3 細胞を播種した。詳細は次の通りである(Fig. 4.6)。

事前に 3.3.2.5 の方法でアガロースコーティングした 100 mm 培養ディッシュを用意した。細胞播種時にディッシュ内の置換用培地を捨てた。

アガロースコートしたディッシュにコラーゲンコートした肝細胞スフェロイド(1×10^6 cells / 8 mL / dish)と HUVEC(2×10^6 cells / 8 mL / dish)、NIH/3T3 細胞(2×10^4 cells / 8 mL / dish)懸濁液を播種した。ディッシュ内の細胞を均等に分散させインキュベーター内に入れて培養した。2 日に 1 回培地を 4 mL 加えた。

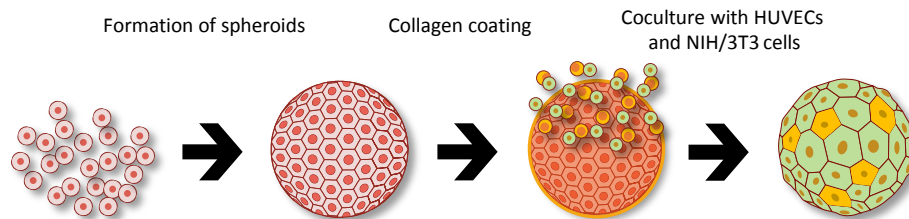


Fig. 4.7 Fabrication of hepatocyte spheroids covered with HUVECs and NIH/3T3 cells.

4.3.2.3 多層型スフェロイドの集積による肝組織の構築法と培養法

3.3.2.8 と同様の方法で、血漿分離用中空糸の内部空間に HUVEC と NIH/3T3 細胞で被覆された肝細胞スフェロイドを播種し三次元肝組織を構築し、培養した。以下に細胞播種条件を示す。

HUVEC と NIH/3T3 細胞で被覆された肝細胞スフェロイド懸濁液を 4.0×10^5 cells/mL に懸濁し、1 mL シリンジで懸濁液を 1 mL 取り、ルーアーフィッティング部分に接続した。ルーアーフィッティング部分にたまっている気泡を抜いた後、細胞懸濁液をゆっくりと充填し、遠心機にセットし遠心播種を行った。中空糸バンドルの先端から 1.5 cm の部分をピンセットで摘みメスで切断した。切断箇所を半田鋏で封止し、12 well プレートに移し、培地量 1 mL、45 rpm で旋回培養を行った。培養培地には D-HDM + GrowthFactor を用い、2 日に 1 回培地交換を行った (HEP-EC-3T3 培養系)。

また、細胞数と肝機能、組織構造の比較検討を行うため、肝細胞スフェロイド (HEP)、HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイド (HEP-EC)、NIH/3T3 細胞被覆型肝細胞スフェロイド (HEP-3T3) をそれぞれ 4.0×10^5 cells/bundle で中空糸に播種し肝組織を作製、培養した。更に、組織中細胞分布変化を確認するため、単分散の肝細胞、HUVEC、NIH/3T3 細胞を播種し (2.9×10^5 hepatocytes, 8.3×10^4 HUVECs, 2.7×10^4 NIH/3T3 cells/bundle)、肝組織を作製、培養した (MONO-HEP-EC-3T3)。

4.3.2.4 作製肝組織の肝特異機能測定法

本節では、作製肝組織の肝機能を評価するため、アンモニア代謝活性、アルブミン分泌活性、尿素合成活性、EROD 活性を調査した。

アンモニア代謝活性、アルブミン分泌活性については3.3.2.10と同様の方法で測定した。以下に尿素合成活性、EROD 活性の概容と測定法を示す。

(1) 尿素合成活性

尿素はたんぱく質などの分解によって発生したアンモニアが肝臓によって変換されたものである。アンモニアから尿素への変換は肝細胞で行われており、この合成回路は尿素回路と呼ばれている。この回路が機能していない場合、体内アンモニア濃度が高まり肝性脳症の要因となる。

培養培地に 1 mM となるよう塩化アンモニウムを添加し、その後、24 時間における培地中尿素濃度を測定した。測定には、QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems)を用いた。

(2) EROD 活性

薬物代謝の指標として EROD 活性を測定した。薬物代謝とは薬物や毒物などの代謝反応であり、対象物質を体外へ排出しやすくすることが多い。肝細胞において主に薬物代謝に関与する酵素は CYP450 である。CYP450 には多くの種類があり、現在ではおよそ 200 種類が確認されている。本節では、CYP 酵素の脱アルキル化について調査した。Ethoxyresorufin の脱アルキル化反応である EROD(Ethoxyresorufin-O-deethylase)活性は CYP1A1 活性の指標として用いられている。これは脱アルキル化された Resorufin が蛍光を示すことを利用し代謝活性を評価する。

培養培地に Ethoxyresorufin を 40 μ M で添加し 1 時間インキュベートを行った。その後、培地を回収し蛍光強度を測定し活性を評価した。

4.3.2.5 作製肝組織の免疫蛍光染色

本節では、組織中細胞分布を確認するため肝細胞（アルブミン）と HUVEC（vWF）の免疫蛍光染色を行った。また、組織構成細胞への酸素供給を確認するため、低酸素誘導因子（Hypoxia Inducible Factor、HIF-1 α ）の免疫蛍光染色を行った。3.3.2.11 と同様の方法で中空糸を凍結し、3.3.2.7 と同様の方法で凍結切片の免疫蛍光染色を行った。HIF-1 α 染色における抗体と反応条件を Table 4.1 に示す。

Table 4.1 Immunoreaction conditions and antibodies.

Manipulation	Antibody (Manufacturer)	Dilution ratio	Condition
Primary reaction	Anti HIF-1 α (H-206) (Santa cruz)	1:100	Overnight, 4 °C
Secondary reaction	Swine anti-rabbit IgG FITC-conjugated antibody (Dako)	1:100	1 hour, room temperature
	Hoechst 33342 (Dojindo)	1:1000	

4.3.2.6 NIH/3T3 細胞の蛍光標識

本節では、組織中の NIH/3T3 細胞の分布を調査するため、NIH/3T3 細胞の蛍光標識を行った。細胞播種前に NIH/3T3 細胞の懸濁液を Qtracker 655 Cell Labeling Kit (Molecular Probes) と混合し、インキュベートを行った。45 分後、上清を取り除き、培養培地で 3 回洗浄を行った。その後播種密度に懸濁し、浮遊培養に用いた。

4.3.2.7 組織回収用中空糸バンドルの作製法及び細胞播種、培養法

本節では、中空糸内部空間で作製された肝組織を回収する方法を検討した。肝組織を中空糸から回収することで、三次元組織解析や生体内への作製組織の移植など各種解析、応用範囲が広がることが期待される。以下に回収用中空糸バンドルの作製法、播種培養法を示す。

(1) 回収用中空糸バンドルの作製

中空糸を 2 本ずつにまとめ、片端を半田鋺で焼き封止した。封止部分から 1.5 cm の部分を 1 cm に切断した ϕ 2-4 mm のシリコンチューブに入れ、チューブ内をシリコンで包埋した。1 日乾燥させ、シリコンチューブごと中空糸を切断し、細胞の播種口となる穴を開け、切断面に気泡がないことを確認した。 ϕ 2-4 mm のシリコンチューブの外側に 1.5 cm に切断した ϕ 4-6 mm のシリコンチューブを接続し、再び 1 日乾燥させチューブ同士をシリコンで固定した。ルーアフィッティングに ϕ 2-4 mm のシリコンチューブをつけ、作製した中空糸バンドルを接続した(Fig. 4.8)。

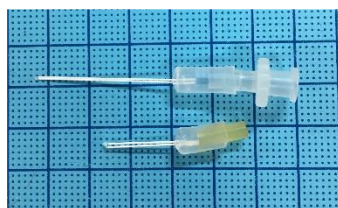


Fig. 4.8 Photograph of hollow fiber bundles. Upper bundle is for functional evaluation and lower bundle is for collection.

(2) 回収用中空糸バンドルへのスフェロイド播種、培養法

4.3.2.3 と同様の方法でスフェロイドを中空糸内部空間に充填、遠心播種した。中空糸バンドルからルアーフィッティングを取り外し、シリコンチューブ内部の気泡をピンセットで取り除いた。シリコン製の栓をシリコンチューブに差し込み栓をすることで、培養中に細胞が中空糸外部に漏れ出ないようにした。35 mm 培養ディッシュに回収用中空糸バンドルを2バンドル移し、培地量 2 mL、45 rpm で旋回培養を行った。この時、中空糸が培地中に完全に浸らない場合、適宜培地を追加した。培養培地には D-HDM + Growth Factor を用い、2 日に 1 回培地交換を行った。

4.3.2.8 中空糸バンドルからの作製肝組織の回収法

100 mm 培養ディッシュに新鮮培地を 20 mL 入れた。回収用中空糸バンドルを 100 mm ディッシュに移し、中空糸が完全に培地に浸るようにした。中空糸の封止部を鉗で切断した。ピンセットで $\phi 4-6$ mm のシリコンチューブを固定し、栓をピンセットで取り外した。2.5 mL シリンジ（テルモ）を $\phi 4-6$ mm のシリコンチューブに取り付け、ゆっくり肝組織を引き抜いた(Fig. 4.9)。シリンジ中に引き抜いた肝組織を、培地を入れた 35 mm 培養ディッシュに移した。

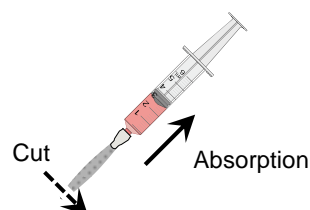


Fig. 4.9 Method of collecting hepatic tissues.

4.3.3 実験結果

4.3.3.1 作製肝組織の細胞数変化

中空糸内部空間で作製された肝組織の細胞数変化を Fig. 4.10 に示す。全ての培養系において中空糸播種後 1 日目に細胞数の減少がみられた。NIH/3T3 細胞を含む 2 つの培養系 (HEP-EC-3T3、HEP-3T3) では培養 1 日目以降、細胞数の継続的な増加がみられ、培養 15 日目では播種直後の約 2 倍になった。NIH/3T3 細胞を含む 2 つの培養系 (HEP-EC、Hep) では培養 1 日目以降、細胞数に大きな変化は無くほぼ一定の値を示した。また、HEP-EC 培養系では培養 1 日目以降、播種直後の約 60 % の値を示し、HEP 培養系では約 40 % の値を示した。

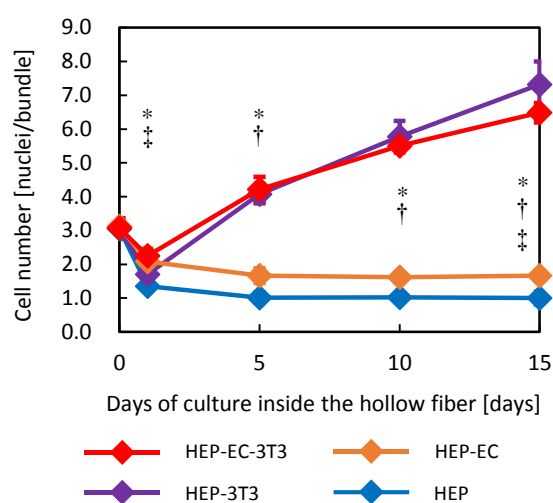


Fig. 4.10 Cell numbers and viability in hollow fiber bundles. Data are means \pm standard deviation. *, † and ‡ denote significant differences in HEP, HEP-EC and HEP-3T3 culture systems, respectively, compared with in the HEP-EC-3T3 culture system at the same timepoint ($P < 0.05$).

4.3.3.2 作製肝組織の肝特異機能評価

(1) アンモニア代謝活性変化

中空糸内部空間で作製された肝組織のアンモニア代謝活性変化を Fig. 4.11A に示す。HEP-EC-3T3 培養系では培養 5 日目まで最も高いアンモニア代謝活性を示したが、培養経過に伴って機能の低下がみられた。HEP-EC 培養系では培養期間を通じて高いアンモニア代謝活性を示した。HEP-3T3、HEP 培養系は培養 1 日目ではほぼ同じ機能を示した。HEP 培養系はその後機能を維持したが、HEP-3T3 培養系は培養経過につれて機能の低下がみられた。

(2) アルブミン分泌活性評価

中空糸内部空間で作製された肝組織のアルブミン分泌活性変化を Fig. 4.11B に示す。HEP-EC-3T3 培養系では培養期間を通じて最も高いアルブミン分泌活性を示し、培養経過に伴って機能の向上がみられた。その他 3 つの培養系は、培養 1 日目ではほぼ同じレベルの機能を示したが、HEP-EC、HEP-3T3 培養系では機能の向上がみられたのに比べ、HEP 培養系は培養期間を通じてほぼ同じ機能を示した。

(3) 尿素合成活性評価

中空糸内部空間で作製された肝組織の培養 10 日目における尿素合成活性を Fig. 4.11C に示す。培養 10 日目において、HEP-EC-3T3 培養系で最も高い尿素合成がみられた。また、HEP-EC 培養系において、HEP 培養系より有意に高い尿素合成がみられた。

(4) EROD 活性評価

中空糸内部空間で作製された肝組織の培養 10 日目における EROD 活性を Fig. 4.11D に示す。培養 10 日目において、HEP-EC-3T3 培養系で最も高い EROD 活性がみられた。また、HEP-EC 培養系において、HEP-3T3、HEP 培養系より有意に高い EROD 活性がみられた。

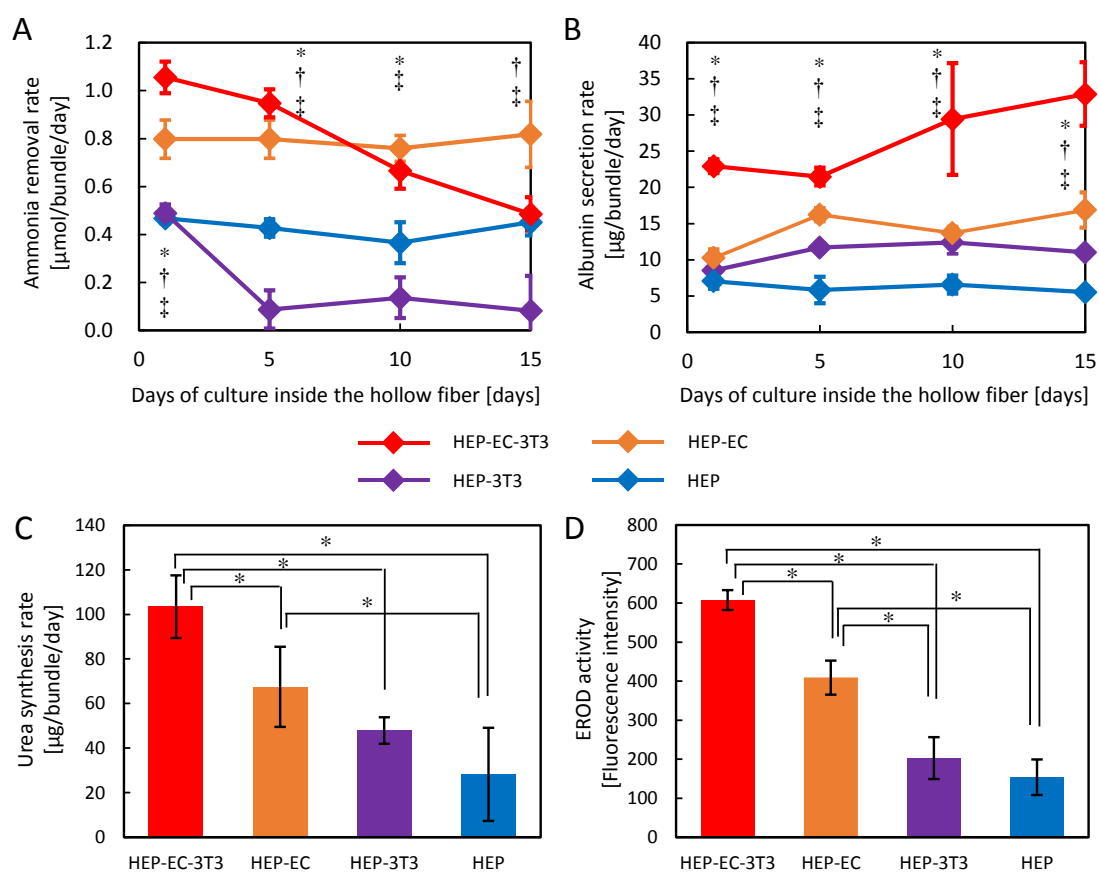


Fig. 4.11 Liver-specific functions in the four culture systems. Data are means \pm standard deviation. (A) Ammonia removal and (B) albumin secretion and rates of hepatocytes per hollow fiber bundle. (C) urea synthesis rates and (D) EROD activity at 10 d. (A, B) *, † and ‡ denote significant differences in HEP, HEP-EC and HEP-3T3 culture systems, respectively, compared with in the HEP-EC-3T3 culture system at the same timepoint ($P < 0.05$). (C, D) * $P < 0.05$.

4.3.3.3 作製肝組織の免疫蛍光染色

(1) 肝組織中の肝細胞・HUVEC 細胞分布

HUVEC と NIH/3T3 細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを用いて作製した肝組織の組織内部細胞分布を観察するため、免疫蛍光染色によって肝細胞（アルブミン）と HUVEC（vWF）を染色した。免疫蛍光染色画像を Fig. 4.12 に示す。HEP-EC-3T3 培養系では、組織構築時点で規則的な HUVEC のネットワーク構造が観察された。培養経過後において、大きな構造変化は見られなかった。MONO-HEP-EC-3T3 培養系では、細胞播種直後において中空糸膜付近において HUVEC の多くが分布していた。培養経過後では、細胞核が組織表面付近にのみ分布しており、HUVEC のネットワーク構造は観察されなかった。

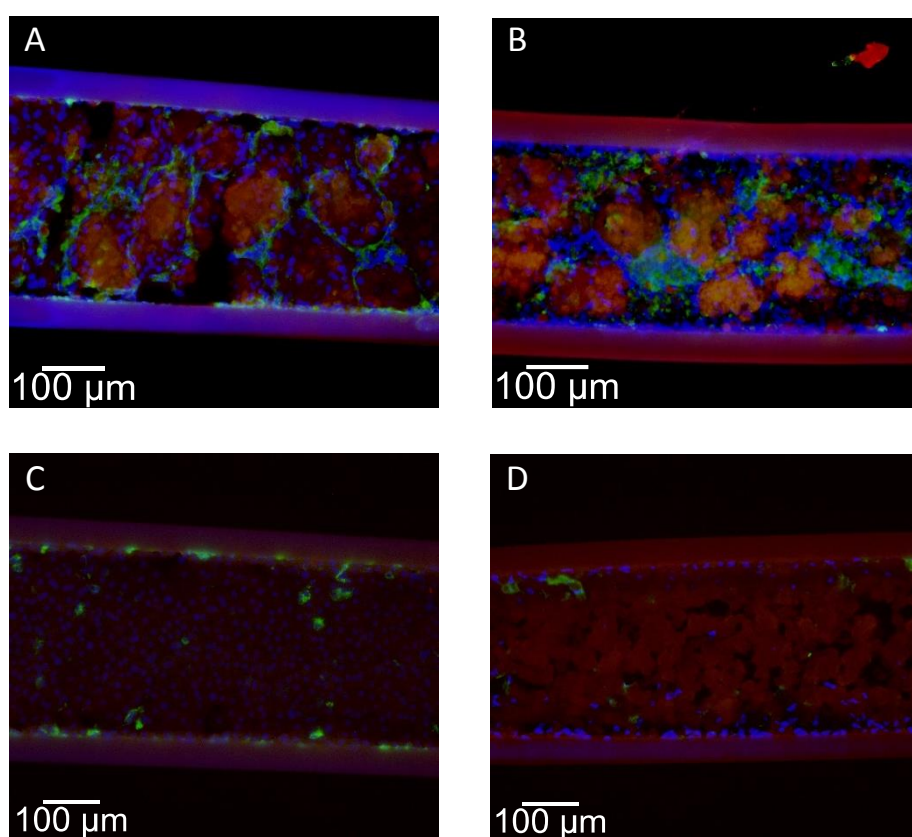


Fig. 4.12 Immunofluorescence staining for albumin (red) and vWF (green) in hepatic tissues formed in hollow fibers. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar = 100 μ m. (A and B) Images of the HEP-EC-3T3 and (C and D) MONO-HEP-EC-3T3 culture systems. (A and C) Immediately after and (B and D) 5 d after seeding into the hollow fiber bundle.

(2) 肝組織中の NIH/3T3 細胞分布

HUVEC と NIH/3T3 細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを用いて作製した肝組織の組織内部細胞分布を観察するため、NIH/3T3 細胞を蛍光標識し、培養 10 日目の凍結切片を観察した。培養 10 日目における NIH/3T3 細胞分布を Fig. 4.13 にしめす。HEP-EC-3T3 培養系では NIH/3T3 細胞が組織全体の均一な分布が観察された。一方、HEP-3T3 培養系において NIH/3T3 細胞は組織内部で局在し偏った分布をとっていることが確認された。

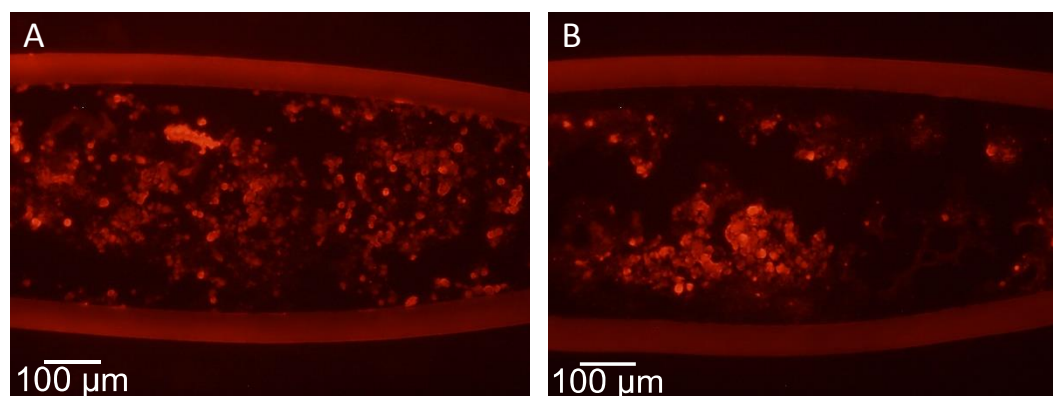


Fig. 4.13 Labeled NIH/3T3 cells in the hepatic tissues at 10 d. (A) HEP-EC-3T3 and (B) HEP-3T3 culture systems. Scale bar = 100 μ m.

(3) 肝組織中の HIF-1 α 分布

HUVEC と NIH/3T3 細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを用いて作製した肝組織における組織内部細胞への酸素供給を確認するため、免疫蛍光染色によって HIF-1 α を染色した。免疫蛍光染色画像を Fig. 4.14 に示す。HEP-EC-3T3 培養系では、播種直後に少量の HIF が観察され、培養経過後でも HIF-1 α の増加は見られなかった。一方、HEP-EC 培養系において、播種直後に HEP-EC-3T3 培養系と同様の少量の HIF が観察された。培養経過後では、組織内部に HIF-1 α の分布が観察された。また、組織全体における細胞核の分布が確認された。また、MONO-HEP-EC-3T3 培養系では、播種直後に HIF-1 α がほぼ観察されなかったが、培養経過後では組織中心部に帯状の HIF-1 α 分布が観察された。

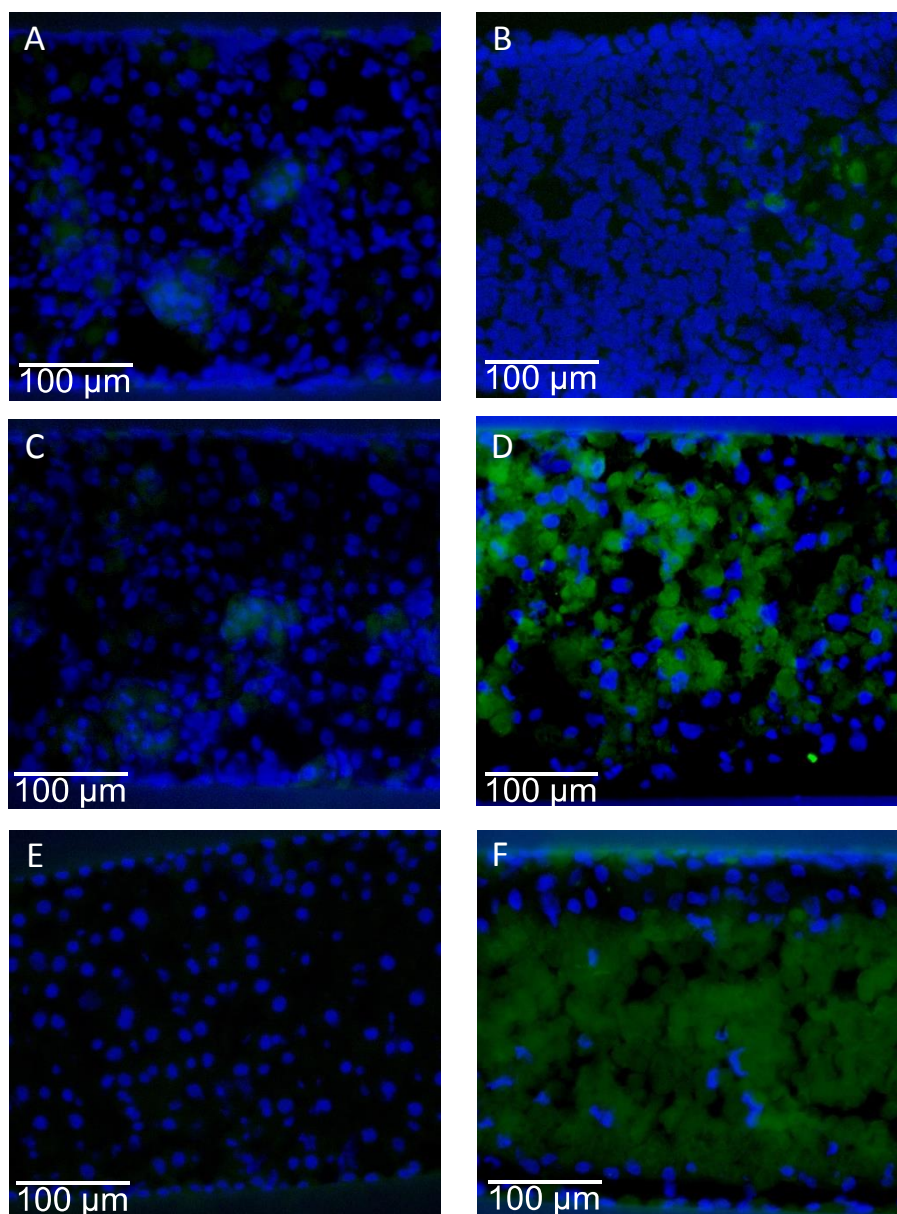


Fig. 4.14 Immunofluorescence staining for HIF-1 α (green) in hepatic tissues formed in hollow fibers. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar = 100 μ m. Images of (A and B) HEP-EC-3T3, (C and D) HEP-EC and (E and F) MONO-HEP-EC-3T3 culture systems; (A and C and E) immediately after and (B and D and F) 5 d after seeding into the hollow fiber bundle.

4.3.3.4 回収した肝組織の外観

各培養系における回収した肝組織の外観を Fig. 4.15 に示す。HEP-EC-3T3 培養系では、表面が滑らかな長さ約 1.5 cm の紐状肝組織が回収された。また、この肝組織はピンセットで持ち上げるのに十分な強度を有していた。その他の 3 つの培養系では、回収中に肝組織が切れ、約 5 mm 程度の肝組織が回収された。また、HEP-EC、HEP 培養系では、組織表面に凹凸がみられた。

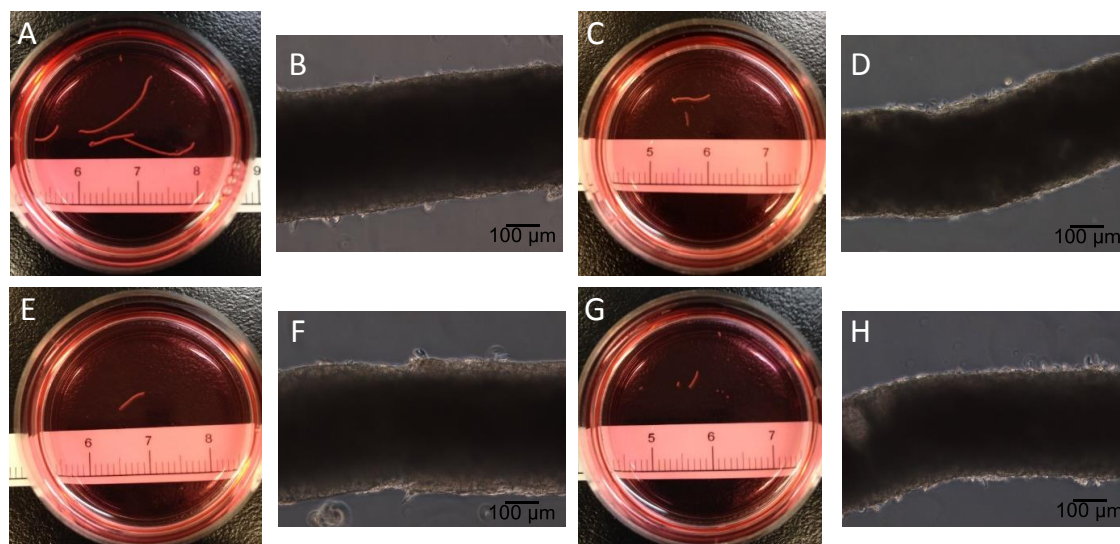


Fig. 4.15 Hepatic tissues recovered from hollow fibers. (A, C, E and G) In the 35-mm dish. (B, D, F and H) Photomicrograph. (A and B) The HEP-EC-3T3 (C and D) the HEP-EC (E and F) the HEP-3T3 (G and H) the HEP culture system.

4.3.4 考察

4.3.4.1 作製肝組織の細胞数

培養 1 日目において、全ての培養系で細胞数の減少がみられた。これは、3.3.4.2 で述べたように十分な栄養・酸素が届かない組織中心部の細胞の壊死によると考えられる。HEP-EC-3T3 と HEP-3T3 の NIH/3T3 細胞を含む 2 つの培養系では、培養経過に伴う細胞数の増加がみられた。HEP-EC と HEP 培養系において細胞数の増加がみられないことから組織中 NIH/3T3 細胞の増加によるものだと考えられる。一方、HEP-EC、HEP 培養系の細胞数から算出される細胞生存率はそれぞれ約 60%、40%となった。これは 3.3.3.3 の結果と合致し、HEP-EC 培養系では組織表面からの拡散の他に酸素を供給する経路が構築された可能性が考えられる。

4.3.4.2 作製肝組織の肝特異機能

アンモニア代謝活性において、HEP-EC-3T3 と HEP-3T3 の NIH/3T3 細胞を含む 2 つの培養系では、培養経過に伴い機能の低下がみられた。4.3.4.1 の考察より、この 2 つの培養系では NIH/3T3 細胞の増殖が予想されるため、NIH/3T3 細胞が排出するアンモニアにより培地中アンモニア濃度が上昇したことが考えられる。これによって、みかけのアンモニア代謝速度の低下が示されたことが示唆される。この問題を解決するため、増殖速度が速い NIH/3T3 細胞に Mitomycin C 処理を施すことで増殖を停止させる手法や、血管組織構築にひろく用いられている間葉系幹細胞を利用する手法が考えられる⁶⁹。これらのように 3 種細胞の共培養において、使用する細胞種や細胞割合など細かい条件を設定することで使用細胞によるデメリットを最小限にすることが可能になる。また、培養 10 日目における尿素合成量において、HEP-EC-3T3 培養系で最も高い機能が示されたことより、アンモニア除去量は減少していないことが示されている。一方、蛋白合成の指標であるアルブミン分泌活性、薬物代謝の指標である EROD 活性において、3 種細胞の共培養である HEP-EC-3T3 培養系では、HEP-EC、HEP-3T3 培養系に比べ高い機能を示した。他研究者より、肝細胞の共培養において内皮細胞と間葉系細胞の 3 種共培養の方が、それぞれ 2 種共培養よりも高い機能が発現することが報告されている⁶⁴。本実験では HUVEC と NIH/3T3 細胞による共培養の相乗効果により最も高い機能が発現したと考えられる⁶⁴。

4.3.4.3 作製肝組織中の細胞分布

HEP-EC-3T3 培養系では、組織構築時点において約 100 μm 間隔で HUVEC の規則的なネットワーク構造が観察された。培養経過後において HUVEC の分布に大きな変化はみられなかった。これは、3.3.3.5 に示される HEP-EC 培養系における HUVEC 分布とほぼ同じだった。また、HEP-EC-3T3 培養系において、NIH/3T3 細胞の組織全体における均一な分布が観察された。一方 HEP-3T3 培養系では、NIH/3T3 細胞の局所的な分布が観察された。この結果より、HUVEC による NIH/3T3 細胞分布への影響が示唆される。また、

MONO-HEP-EC-3T3 培養系では、培養期間を通じて分散した HUVEC 分布が観察され HUVEC によるネットワーク構築が確認されなかった。これは 3.3.3.5 における単分散肝細胞と HUVEC による肝組織の結果と同様だった。これらの結果から、単分散細胞播種による中空系内肝組織の構築では HUVEC のネットワーク構築が困難なことが考えられる。

4.3.4.4 作製肝組織中の HIF-1 α 分布

スフェロイドを中空系内部に充填した直後において、組織中にわずかな HIF-1 α の分布が観察された。スフェロイド作製中において粒径 100 μm 以上のスフェロイドの場合、表面からの分子拡散のみでは中心部細胞に十分な酸素が供給できない場合があることが示唆される。HEP-EC-3T3 培養系において、培養経過後においてわずかな HIF-1 α の分布が観察された。一方 HEP-EC 培養系では組織中心部において HIF-1 α と細胞核の分布が観察された。この結果より、HEP-EC 培養系では組織中心部の細胞は生存維持できるが不十分な酸素供給が行われており、一方 HEP-EC-3T3 培養系では組織中心部において良好な酸素供給が行われていることが考えられる。これより HEP-EC-3T3 培養系では組織中への酸素供給経路が構築されていることが示唆された。

4.3.4.5 作製肝組織の中空系からの回収

HEP-EC-3T3 培養系の肝組織は中空系の長さとはほぼ同じ長さの紐状肝組織を回収できた。一方、他の培養系では回収時に組織が細かく分断された。HEP-EC-3T3 培養系では、本実験によって、組織全体における高い細胞密度と NIH/3T3 細胞の均一な分布が確認されている。NIH/3T3 細胞が分泌した細胞外マトリクスにより組織強度が増したと考えられる。それに比べ、他の 3 条件では、組織内部に細胞の壊死層がある、または NIH/3T3 細胞の不在により組織強度が不足しているため、吸引圧によって組織が分断されたと考えられる。

4.3.5 本節のまとめ

NIH/3T3 細胞と HUVEC で被覆された多層型肝細胞スフェロイドを中空系内部に充填し三次元肝組織を作製し、肝機能と構造に関する評価を行った。その結果、肝機能の向上と組織内部への酸素供給の改善が示された。また、培養担体である中空系からの回収が可能となり、センチメートルオーダーの長さを有する紐状肝組織が回収された。一方、NIH/3T3 細胞の増殖によるアンモニア濃度が確認された。使用細胞や組織構築・培養条件などを最適化する必要がある。

4.4 本章のまとめ

本章では以下の事項を示した。

1. 増殖因子を徐放するヘパリン導入コラーゲンゲルで肝細胞スフェロイドをコーティングし、これを足場として HUVEC 被覆型肝細胞スフェロイドを形成、それらを集積して三次元肝組織を作製した。その結果、アルブミン分泌活性において高い機能発現がみられ、組織中における内皮細胞の環状構造が観察されたなど、肝機能と HUVEC の血管化における改善が示唆された。
2. ヘパリン導入コラーゲンゲルは HUVEC の足場として、HUVEC が接着しにくい可能性が示唆され、ゲルの作製法や多層型スフェロイドの作製法について検討する必要がある。
3. NIH/3T3 細胞と HUVEC で被覆された多層型肝細胞スフェロイドを中空糸内部に充填し三次元肝組織を作製し、肝機能と構造に関する評価を行った。その結果、肝機能と組織構成細胞への酸素供給に改善がみられた。しかし、NIH/3T3 細胞の増加によるアンモニア代謝活性の低下が考えられ培養条件など検討を行う必要がある。
4. NIH/3T3 細胞と HUVEC で被覆された多層型肝細胞スフェロイドによって作製された肝組織は培養担体である中空糸から容易に回収することができ、移植や解析を行うのに十分な強度を有していた。

第5章 スフェロイド集積法によって作製された肝臓組織の性能評価

5.1 本章の目的及び概要

第4章において、多層型スフェロイドを利用した肝細胞スフェロイドの集積によって作製した肝組織の更なる高機能化を試みた。その結果、間質細胞である NIH/3T3 細胞と HUVEC によって肝細胞スフェロイドを被覆し肝組織を構築することで、肝機能の向上と組織中への酸素供給の改善がみられた。更に、NIH/3T3 細胞の存在によって肝組織の組織強度が増したことで、培養担体である中空糸から紐状の肝組織を回収することが可能となった。これによって、作製肝組織の生体内移植が容易となった。しかし、これまでの検討では、生体外 (in vitro) での評価に限られており、肝再生医療へ応用するためには生体内 (in vivo) での性能評価を行う必要がある。

そこで本章では、肝細胞、HUVEC、NIH/3T3 細胞の3種細胞によって構築された肝組織の性能評価を行うため、免疫不全マウスの体内へ作製肝組織の移植を行った。まず、急性肝不全モデルとして90%部分肝切除した免疫不全なマウスを作製し、この体内に作製した肝組織を移植し、治療効果と移植組織の組織学的な評価を行った。

5.2 肝不全モデルマウスを用いた作製肝臓組織の治療効果の検証

5.2.1 本節の目的

第3、4章の検討により、十分な肝機能を発現し生体内に移植可能な肝組織を作製する手法を確立した。しかし、これまでの肝組織の評価は *in vitro* に限られており、それらの機能発現レベルが肝不全状態の回復に十分なレベルであるかは不明である。そこで本節では、作製肝組織の生体内性能評価を行うため、肝不全モデル動物を作製し、その体内に肝組織を移植することで、作製した肝組織の治療効果の検証を行うことを目的とした。

5.2.2 実験方法

5.2.2.1 肝不全モデル動物の作製法

本研究では、急性肝不全モデル動物として、免疫不全マウスに対して90%部分肝切除を行った。以下に、詳細なモデル動物作製法について示す。

本検討には8週齢のSCIDマウス（オス、体重20-24 g）（SLC）を使用した。マウスを麻酔導入用のボックスに入れ、4% イソフルラン/96% O₂ を1 L/min で流し、麻酔の導入を行った。麻酔が効いたことを確認し、ラットを術台に乗せた。この時点でイソフルラン濃度を2.5%に下げた。体温低下を防ぐため、加温可能な手術台を使用した。

腹部を70%エタノールで消毒した。手術用ハサミを用いて、胸骨剣状突起から約2 cm 下まで正中切開した。マウスの呼吸に合わせて、左手親指と人差し指で肋骨を挟み込みながら押さえ、中間葉と左葉を露出させた。露出が不十分な場合は、生理食塩水で濡らした綿棒で鬱血しないように注意しながら肝臓を掻き出した。露出した肝葉の根元を縫合糸でループをかけ、結紮した。縫合糸の結び目の少し上で、他の肝葉を傷つけないように中間葉と左葉を切除した。切り口やそれ以外から出血が無いことを確認するとともに、残存肝に鬱血が無いことを確認した。右葉を同様に左手で押さえながら綿棒で掻き出した。尾状葉を傷つけないように注意しながら縫合糸でループをつくり結紮し、切除した。出血が無いことを確認し、腹腔内に生理食塩水を数滴滴下した。綿棒で内臓や脂肪を腹腔内に収め、再開腹部を縫合した。以上の操作を1時間以内で行った。

5.2.2.2 作製肝組織の移植法

5.2.2.1 の手法で90%部分肝切除を行い、急性肝不全モデルマウスの生体内部に作製肝組織を移植した。以下に詳細を示す。

移植には、4章3節で記した3種細胞混合肝組織を利用した。4.3.2.5 で示した手法により、中空糸内部で肝組織を構築し10日程度培養した後、4.3.2.6 で示した手法により中空糸から肝組織を回収した。1匹のマウスあたり、中空糸3バンドル分の肝組織（6本の紐状肝組織）をCM(+)-PBSに浸した後、残存の尾状葉に貼付け移植した。その後、腹腔内に生理

食塩水を数滴滴下した。綿棒で内臓や脂肪を腹腔内に収め、閉腹し経過を観察した。

5.2.2.3 生存曲線

90 %部分肝切除した時を $t = 0$ として移植適応群、Control 群（90 %部分肝切除のみ）において Kaplan-Meier 生存曲線を示した。

5.2.2.4 血中アルブミン濃度の測定法

マウスを固定アジャスターで固定し、尾をアジャスターの外部に出した。尾の両側にある尾静脈を上にし、メスで尾の先端から約 5 mm の部分を傷つけた。尾の付け根から傷をつけた部位に向かって指で押し付け、出血させた。5 μL をサンプリングし、素早く 995 μL のウシ血清アルブミン溶液(BSA)(KPL)で希釈した。溶液中のラットアルブミン濃度を ELISA 法で測定した。

5.2.2.5 残存肝の摘出

マウスを麻酔導入用のボックスに入れ、イソフルランで過麻酔し安楽死させた。死亡確認後、閉腹部の縫合糸を鉗で切断し糸を解いた。腹部を開き、残存肝を生理食塩水で濡らした綿棒で掻き出して鉗で切除した。摘出した残存肝は 15 mL 遠沈管に分注した 10 %緩衝ホルマリンに入れ保存した。

5.2.3 実験結果

5.2.3.1 肝組織移植後の生存時間

肝組織移植適応群と 90 % 部分肝切除モデル(Control 群)の生存曲線を Fig. 5.1 に示す。Control 群では肝切除後 200 min で生存率が 50 % に低下した。その後生存率は徐々に低下し、肝切除後 1700 min に全モデルが死亡した。移植適応群では、肝切除後 2000 min まで全モデルが生存したが、その後生存率が低下し最終的な生存率は 25 % だった。

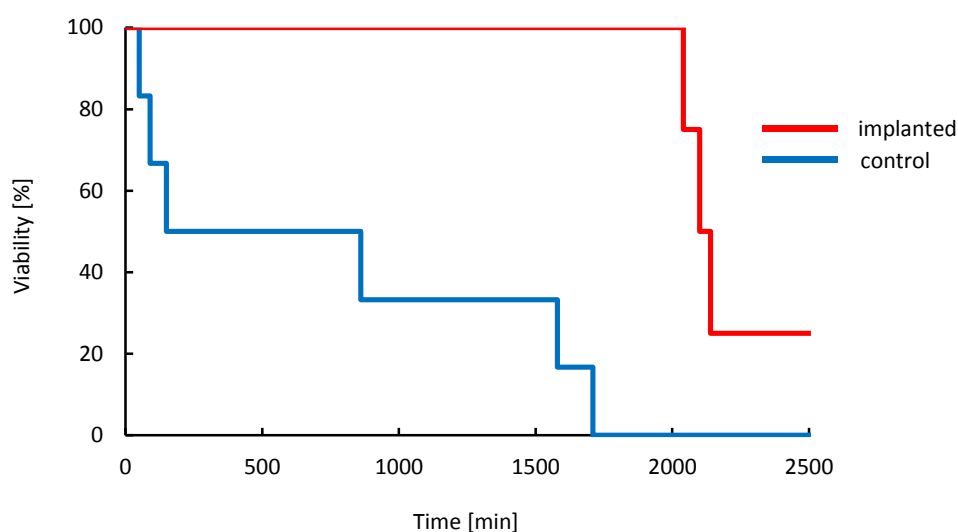


Fig. 5.1 Viability after 90 % hepatectomy.

5.2.3.2 血中ラットアルブミン濃度

最終的に生存維持した移植適応マウスにおいて、血中ラットアルブミン濃度を測定した。肝組織移植後のマウス血中ラットアルブミン濃度を Fig. 5.2 に示す。部分肝切除・肝組織移植直後において血中にラットアルブミンは測定されなかった。移植後 4、7 日目において、マウスの血中におよそ 20 $\mu\text{g/mL}$ のラットアルブミンが確認された。

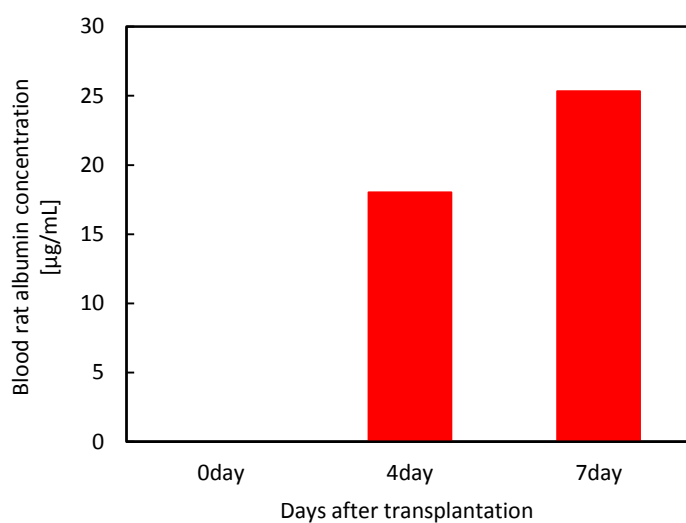


Fig. 5.2 Blood rat albumin concentration of implanted SCID mouse.

5.2.3.3 肝切除後のマウス肝臓変化

Control 群の死亡直後の残存肝臓、移植適応生存例の移植後 7 日目の肝臓を摘出した(Fig. 5.3)。Control 群の死亡直後肝臓は肝切除後とほぼ同じ大きさだった。生存例の肝臓は移植後 7 日目において、肝切除直後のおよそ 10 倍程度の大きさになり、肝切除前の大きさにほぼ戻っていた。

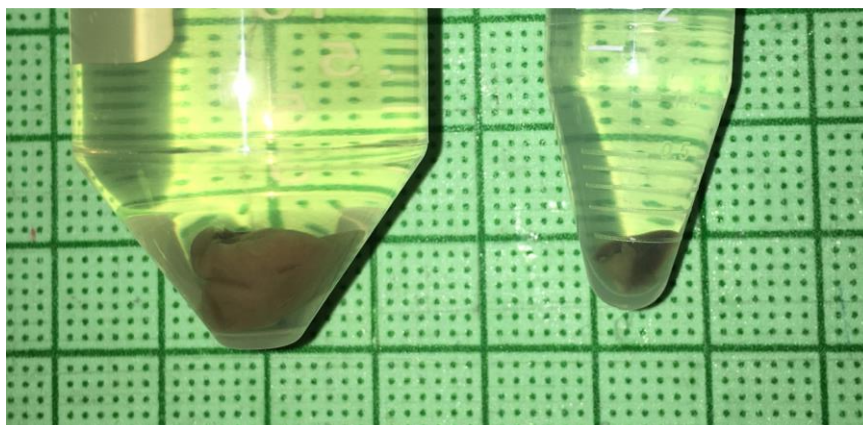


Fig.5.3 Isolated livers from survived mouse (Left) and control group mouse (Right).

5.2.3.4 移植後の肝組織

移植適応生存例マウスの移植後 7 日目において、移植肝組織を採取し HE 染色後観察した。移植肝組織の HE 染色画像を Fig. 5.4 に示す。移植した肝組織は繊維芽細胞様細胞の層に包まれており、肝組織との明確な境界が観察された。また、移植肝組織内部において血球成分の存在が確認された。

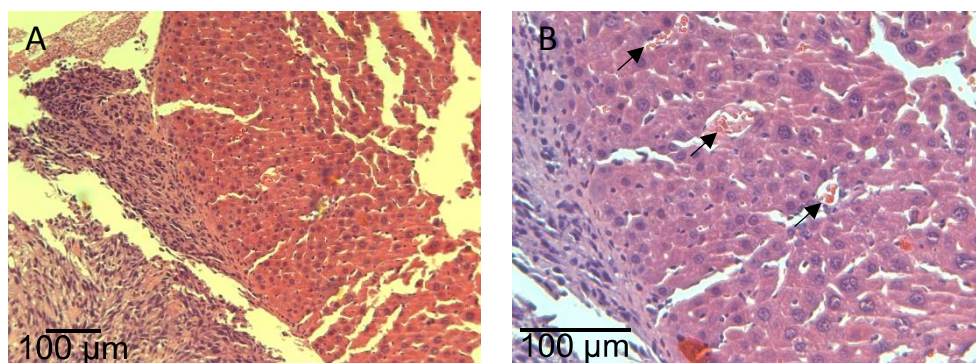


Fig. 5.4 HE staining of implanted hepatic tissue. Scale bar = 100 μm. Arrows indicate blood cell components.

5.2.4 考察

本章では、急性肝不全モデルとして 90% 部分肝切除マウスの作製を行った。物理的な肝切除は薬物投与と比較し、個体差が出にくい手法である。本研究におけるモデルマウスは、肝切除後 1700 min に全モデルが死亡した。この結果は他者の同様の手法とほぼ同じ結果を示し、施術の妥当性が示された。

本実験では肝組織を 3 バンドル分回収し移植を行った。この量は第 4 章における肝機能評価において、肝臓の約 20% 分の機能にあたる。しかしながら、3 バンドル分の肝組織は約 10^6 cells 分に相当し、細胞数は約 5% の量となる。肝臓は約 3 割の機能で回復すると言われており、移植組織が速やかに生着し、機能を発現することで治療が可能になると考えられる。一方、マウス血中に存在するラットアルブミン濃度は血中総アルブミンの 1000 分の 1 程度であり、移植細胞数から想定される割合より少ない値を示した。移植組織量による血中アルブミン濃度変化を調査することで、今回の結果の妥当性を考察する必要がある。

また、本実験では移植適応群において延命効果は確認されたが、最終的な生存率は 25% を示した。これは肝組織の生着率の低さが要因だと考えられる。本実験では、肝組織を残存肝に貼付け移植を行った。他者の研究では、組織を移植する際の部位と移植方法が複数報告されており、本組織に適した手法を用いることで生着率の向上が見込まれる。具体例として、ゲル包埋法や、カテーテルを用いた移植法などが考えられる^{31,68,108}。また、移植部位として、腸間膜や腎皮膜下、皮下などが選択肢としてあり、最適化を行う必要がある。

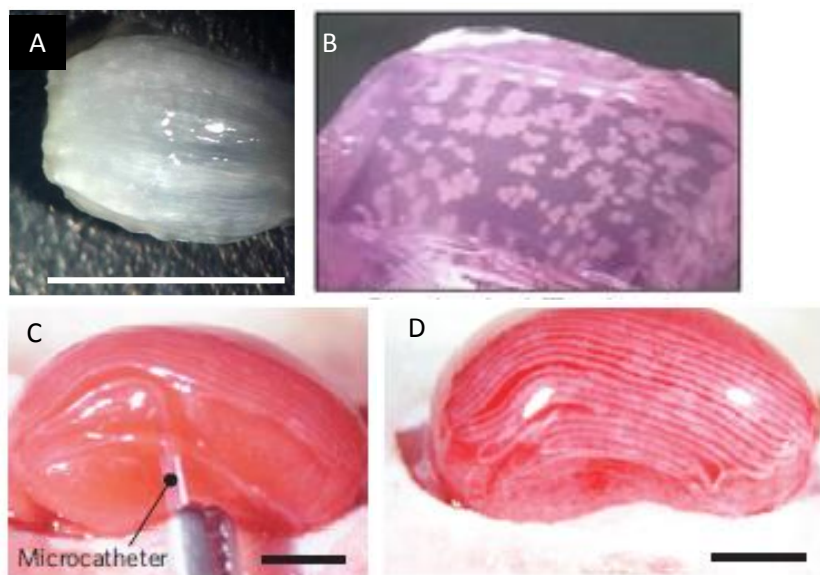


Fig 5.5 Implantation methods of 3D cultured tissues. (A) Assembled fibre-type tissue using alginate gel³¹. (B) Embedding spheroids in collagen gel⁶⁸. (C and D) Implanted fiber-type tissue by using microcatheter¹⁰⁸.

5.2.5 本節のまとめ

本節では、作製した肝組織の性能評価として急性肝不全モデル動物への移植を行った。はじめに、急性肝不全モデル動物の作製として、免疫不全マウスに対して 90%部分肝切除を施し、作製した肝組織を残存肝に貼付け移植した。その結果、移植をしていない Control 群では肝切除後 1700 min に全モデルが死亡したのに対し、移植適応群では肝切除後 2000 min まで全モデルが生存し、最終的な生存率は 25%と延命効果が確認された。また、移植後におけるマウス血中にラットアルブミンの存在が確認され、肝臓体積の回復も観察された結果から、作製した肝組織の肝再生医療への有効性が示された。しかしながら、最終的な生存率の低さから、移植組織の生着率の低さが示唆され、移植法や移植部位などより治療に適した方法を検討する必要がある。

5.3 本章のまとめ

本章では以下の事項を示した。

1. 急性肝不全モデル動物として、免疫不全マウスに 90% 部分肝切除を施した。その結果、肝切除後 200 min 後に生存率が 50% に低下し、肝切除後 1700 min に全モデルが死亡した。
2. 90% 部分肝切除マウスに対し、中空糸から回収した紐状肝組織を移植した。その結果、肝切除後 2000 min まで全モデルが生存、その後生存率が低下し最終的な生存率は 25 % を示し、移植による延命効果が確認された。
3. 移植後生存マウスにおける血中ラットアルブミン濃度を測定した結果、肝切除直後では測定されなかったが、移植 4 日目では血中にラットアルブミンの存在を確認した。
4. 移植後生存マウスでは肝切除後、移植 7 日目において肝臓の大きさの回復が確認された。

第6章 総括

6.1 本論文のまとめ

本論文では、高機能かつ高細胞密度を有する培養肝組織を構築する手法として、血管内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを基本単位としたボトムアッププロセスによる組織構築法について検討を行った。はじめに、血管内皮細胞に被覆された多層型スフェロイドを大量に作製し、それらを血漿分離用中空糸内部に集積することで三次元培養肝組織を作製した。細胞生存率、肝特異機能を評価することで本組織構築法の有用性を示した。次に、本手法により作製した肝組織の更なる高機能化と毛細血管網構築を実現するため、ヘパリン導入コラーゲンによる増殖因子の徐放と間葉系細胞との共培養を肝組織構築に組み込み、それぞれ評価を行った。更に、作製した肝組織を肝不全モデル動物に移植することで、本手法によって作製した肝組織の移植用組織としての可能性を示した。

第1章では、本研究の背景を述べ、本研究の方針を示した。

第2章では、既往の研究について述べ、組織工学と肝組織構築における他者のアプローチと現状における課題を示した。

第3章では、内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドの集積によって三次元肝組織を作製し、組織構成細胞の生存率や肝特異機能を評価した。はじめに、組織構築の基本単位となる肝細胞スフェロイドの大量培養法の検討を行い、 5.0×10^5 cells/mL の肝細胞懸濁液を2日間浮遊旋回培養し特定粒径の肝細胞スフェロイドを得た。得られた肝細胞スフェロイドの表面をコラーゲンでコーティングし、血管内皮細胞と共培養することで血管内皮細胞に被覆された多層型肝細胞スフェロイドを取得した。これらを血漿分離用中空糸内部空間に集積することで高密度の三次元肝組織を作製し、細胞生存率や肝特異機能の測定を行った。その結果、本手法によって構築された肝組織は、単分散細胞で作製された場合と比較し約20%高い細胞生存率を示した。また、単分散細胞で作製された場合と比較し約1.5倍のアンモニア代謝活性と約2倍のアルブミン分泌活性を発現し、本組織構築法の有用性を示した。また、組織内部において、規則的な内皮細胞のネットワーク構造が観察され、毛細血管網構築の可能性が示された。

第4章では、第3章で作製した肝組織において更なる高機能化、毛細血管網の構築を試みるため、2つのアプローチを行った。まず、ヘパリンを利用した増殖因子の持続徐放について検討した。静電気力によって増殖因子を固定化するはたらきを持つヘパリンをコラーゲンに導入し、肝細胞スフェロイド表面をコートすることによって、肝細胞と内皮細胞

に対して継続的に増殖因子を供給した。その結果、アルブミン分泌能の向上と組織内部において内皮細胞の環状構造形成が確認された。しかし、内皮細胞の接着率の低下といった問題があり、ヘパリンの導入率などについて検討の必要がある。次に、共培養することで肝細胞の機能を向上させ内皮細胞の血管化を促進させる NIH/3T3 細胞について検討を行った。肝細胞スフェロイドの表面を HUVEC と NIH/3T3 細胞で被覆した多層型スフェロイドを作製し、肝組織構築を行った。その結果、肝特異機能の向上が示され、組織中への酸素供給が改善された。しかしながら、NIH/3T3 細胞の増殖によるアンモニア濃度の上昇が確認され、使用細胞や培養法など検討の必要がある。また、作製肝組織を中空糸から引き抜くことで紐状肝組織を回収でき、解析や移植など様々な応用の可能性が示された。

第 5 章では、第 4 章で作製、回収された肝組織の移植による性能評価を行った。急性肝不全のモデル動物として、免疫不全マウスである SCID マウスに対して 90 % 部分肝切除を行い、作製した紐状肝組織を移植した。その結果、移植しなかった Control 群において肝切除後 24 時間以内に全モデルが死亡したのに対し、移植適応群では全モデルが 24 時間以上生存し、最終的な生存率は 25 % となった。この結果より、組織移植による延命効果が確認され、本組織構築法によって構築した肝組織の肝再生医療への可能性が示された。

6.2 今後の課題と展望

本研究では、生体内へ移植可能な紐状肝組織の構築に成功した。この肝組織は、*in vitro*において高い肝機能を発現し、HIF-1 α の分布から組織内部に良好な酸素供給が行われていることが確認された。しかしながら、組織内部において血管内皮細胞の規則的なネットワーク構造は観察されているが、血管様構造の存在は確認できなかった。肝組織の細胞密度、HIF-1 α の少ない発現量から、酸素・栄養の供給路の存在が示唆されているため、毛細血管様構造の有無を確認する必要がある。他者の報告では、管状構造の組織解析において蛍光色素やマイクロビーズ、墨を流路に通すことによって構造解析をおこなっている⁵⁹。また三次元構造解析によって内皮細胞の空間配置を観察することで管状構造を確認する手法も報告されている⁶⁴。本手法は高密度かつ高機能の三次元培養組織を構築すると共に、速やかな毛細血管網の構築を目的とした組織構築法であり、血管様構造の構築を確認することで、本手法の組織工学的有用性が示され、他細胞への応用や、スケールアップした大型培養組織の構築への可能性が広がる。

また、本研究では多層型スフェロイドの集積容器として血漿分離用中空糸を用いた。中空糸膜は細胞培養の培養担体として物質交換などの面で優れた材料であり、スケールアップが容易である。作製肝組織の太さはこの中空糸の内径に依存しており本研究では330 μm の太さの組織が作製された。第5章においてマウス体内に移植された肝組織は長さ9.0 cmで細胞数約 10^6 cellsに相当する。ヒト肝臓のおよそ10%に相当する 10^{10} cellsにスケールアップした場合、肝組織の長さは900 mとなり、2970 cm^2 の移植面積が必要となる。この必要面積は限られた体内の移植スペースから現実的ではないため、移植法の工夫や組織のスケールアップ、他の手法との組み合わせによる組織構築が必要となる。仮に肝組織を4層に積層移植した場合、必要移植面積は742.5 cm^2 に減少する。これは肝臓表面に移植するために十分小さな数値である。また、Fig.6.1に示すような紐状組織を束ねる手法で肝組織10本を束ね、太さ約1 mmの組織を構築したとすると、移植に必要な貼付け面積は900 cm^2 となる。一方、肝組織の厚みが増加した場合の内部の生存状況は十分に検討する必要がある。また、肝臓の表面だけでなく、皮下や腎皮膜下といった部位を移植先として選択することも考えなければならない。一方、本手法は、他組織構築法と複合し、比較的大きな血管の周囲に肝組織を配置することで機能的な血管網を有する組織構築法への展開が期待される。例えば、脱細胞化組織を利用し肝臓の血管網を構築した後、周囲に肝組織を充填することで、肝臓の形状をもつ組織体を構築できる。また3Dプリンターなどで作製したチューブ状組織の周囲に集積することで、培地などを循環できる培養組織の作製が可能となる。これらの手法では、あらかじめ作製した血管から肝組織内部で血管網が侵入し、より密な血管網の取得が見込め、移植組織・体外循環用肝臓組織として活用できる。以上のように、紐状組織の長さだけでなく太さをスケールアップする、もしくは血管構築法と組み合わせることで、移植用組織としての実用性が見込める。

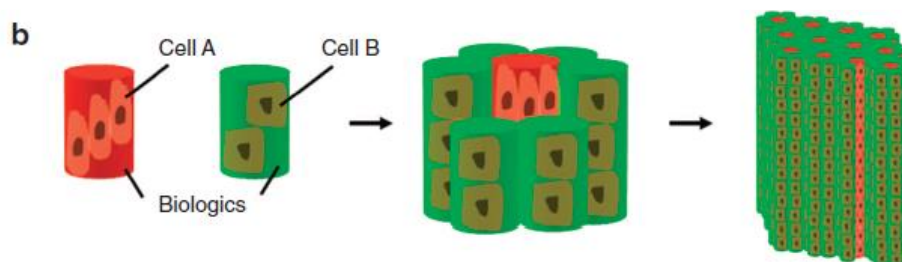


Fig. 6.1 Scale-up method by assembling the fiber-type tissue³¹.

一方、本研究では、血管化組織の構築が望まれている組織として肝組織に着目し、初代肝細胞を用いて肝組織構築を行った。しかし、本組織構築法はスフェロイドの細胞種を変更することで様々な三次元組織が構築可能である。初代細胞のみでなく株化細胞でも応用できるため、株化肝細胞や肝前駆細胞を用いて組織構築することで複数種の肝組織を作製することが可能となる。また、膵臓細胞など他臓器細胞を用いることで種々の機能を有する組織が作製可能となり、新たな可能性が広がる。更に、多能性幹細胞などの幹細胞の胚様体を用いることで幹細胞の分化と血管化を同時に行えるなどメリットが見込める。使用細胞種による培養条件の同定を行うことで、本手法が高機能血管化組織の構築における技術基盤となりうる。

参考文献

1. Rheinwald, J.G. and H. Green, "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells". *Cell*. **6**(3), 331-343, (1975).
2. Cima, L.G., et al., "Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates". *Journal of Biomechanical Engineering*. **113**(2), 143-151, (1991).
3. Vacanti, C.A., et al., "Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation". *Plast Reconstr Surg*. **88**(5), 753-759, (1991).
4. Langer, R. and J.P. Vacanti, "Tissue engineering". *Science*. **260**(5110), 920-926, (1993).
5. Fujimori, Y., et al., "Skin regeneration for children with burn scar contracture using autologous cultured dermal substitutes and superthin auto-skin grafts - Preliminary clinical study". *Ann Plas Surg*. **57**, 408-14, (2006).
6. Nishida, K., et al. "Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium". *The New England Journal of Medicine*. **351**, 1187-96, (2004).
7. O'Connor, N., et al., "GRAFTING OF BURNS WITH CULTURED EPITHELIUM PREPARED FROM AUTOLOGOUS EPIDERMAL CELLS". *The Lancet*. **317**(8211), 75-78, (1981).
8. Gallico, G.G., 3rd, et al., "Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium". *The New England Journal of Medicine*. **311**(7), 448-451, (1984).
9. Pellegrini, G., et al., "Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium". *Lancet*. **349**(9057), 990-993, (1997).
10. Ochi, M., et al., "Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee". *J Bone Joint Surg Br*. **84**(4), 571-578, (2002).
11. Ma, P.X., "Biomimetic materials for tissue engineering". *Adv Drug Deliv Rev*. **60**(2), 184-198, (2008).
12. Kelm, J.M. and M. Fussenegger, "Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly". *Trends in Biotechnology*. **22**(4), 195-202, (2004).
13. Johnson, P.C., et al., "Strategic directions in tissue engineering". *Tissue Engineering*. **13**(12), 2827-2837, (2007).
14. Tsai, A.G., P.C. Johnson, and M. Intaglietta, "Oxygen gradients in the microcirculation". *Physiol Rev*. **83**(3), 933-963, (2003).
15. Glicklis, R., J.C. Merchuk, and S. Cohen, "Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions". *Biotechnol Bioeng*. **86**(6), 672-680, (2004).
16. Hay, D.C., et al., "Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm

- requires ActivinA and Wnt3a signaling”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**, 12301-12306, (2008).
17. Hay, D.C., et al., “Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo”. *Stem Cells*. **26**, 894-902, (2008).
 18. Basma, H., et al., “Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes”. *Gastroenterology*. **136**, 990-999, (2009).
 19. Agarwal, S., Holton, K.L., Lanza, R., “Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells”. *Stem Cells*. **26**, 1117-1127, (2008).
 20. Duan, Y., et al., “Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo”. *Stem Cells*. **25**, 3058-3068, (2007).
 21. Cai, J., et al., “Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells”. *Hepatology*. **45**, 1229-1239, (2007).
 22. Doi, I., “Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma”. *Gann*. **67**, 1-10, (1976).
 23. Nyberg, S.L., et al., “Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver”. *Ann Surg*. **220**, 59-67, (1994).
 24. Miura, S., et al., “Rapid cell-fate conversion of mouse fibroblasts into hepatocyte-like cells”. *Inflamm Regen*. **34**, 211-216, (2014).
 25. Kobayashi, N., Okitsu, T., Nakaji, S., Tanaka, N., “Hybrid bioartificial liver: establishing a reversibly immortalized human hepatocyte line and developing a bioartificial liver for practical use”. *J Artif Organs*. **6**, 236-244, (2003).
 26. Wulf, G.G., et al., “Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells”. *Haematologica*. **88**, 368-378, (2003).
 27. Sakuragawa, N., et al., “Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver”. *J Hum Genet*. **45**, 171-176, (2000).
 28. Shimano, K., et al., “Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1”. *Am J Pathol*. **163**, 3-9, (2003).
 29. Schmelzer, E., Wauthier, E., Reid, L.M., “The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors”. *Stem Cells*. **24**, 1852-1858, (2006).
 30. Piryaee, A., et al., “Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model”. *Stem Cell Rev*. **7**, 103-118, (2011).
 31. Leong, M.F., et al., “Patterned prevascularised tissue constructs by assembly of polyelectrolyte hydrogel fibres”. *Nature Communications*. **4**, 2353, (2013).
 32. Shirakigawa, N., et al., “Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **114**,

- 546-551, (2012).
33. Mironov, V., et al. "Organ printing: Tissue spheroids as building blocks". *Biomaterials*. **30**, 2164-2174, (2009).
 34. Mizumoto, H., Funatsu, K., "Liver regeneration using a hybrid artificial liver support system". *Artif Organs*. **28**(1), 53-57, (2004).
 35. Huttmacher, D.W., et al., "Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication system". *Trends Biotechnol.* **22**(7), 354-362, (2004).
 36. Lutolf, M.P., Hubbell, J.A., "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering". *Nature Biotechnology*, **23**(1), 47-55, (2005).
 37. Chan, B.P., Leong, K.W., "Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations". *Eur Spine*, **17**(4), 467-479, (2008).
 38. Leferink, A., et al., "Engineered Micro-Objectes as Scaffolding Elements in Cellular Building Blocks for Bottom-Up Tissue Engineering-Approaches". *Advances Materials*, **26**(16), 2592-2599, (2014).
 39. Ma, P.X., "Scaffolds for tissue fabrication". *Mater Today*, **7**(5), 30-40, (2004).
 40. Lau, T.T., Wang, D.A., "Bioresponsive hydrogel scaffolding systems for 3D constructions in tissue engineering and regenerative medicine". *Nanomedicine*, **8**(4), 655-668, (2013).
 41. 石原一彦、埴隆夫、前田瑞夫：バイオマテリアルの基礎、(株)日本医学館 (2010).
 42. Mano, J.F., et al., "Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends". *J R Soc Interface*, **4**(17), 999-1030, (2007).
 43. Malafaya, P.B., et al., "Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications", *Adv Drug Delivery Rev*, **59**, 207-233, (2007).
 44. Geckil, H., et al., "Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics". *Nanomedicine*, **5**(3), 469-484, (2010).
 45. Dang, J.M., Leong, K.W., "Natural polymers for gene delivery and tissue engineering". *Adv Drug*, **58**(4), 487-499, (2006).
 46. 谷原正夫：コラーゲンの製造と応用展開、(株)シーエムシー出版 (2009).
 47. 小出輝、林利彦：細胞外マトリクス、(株)愛智出版 (2000).
 48. Tabata, Y., et al., "Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor". *Tissue eng*, **5**, 127-138, (1999).
 49. Middleton, J., Tipton, A., "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices". *Biomaterials*, **21**(23), 2335-2346, (2000).
 50. Daniels, A.U., et al., "Mechanical properties of biodegradable polymers and composites proposed for internal fixation of bone", *J Appl Biomater*, **1**(1), 57-78, (1990).
 51. Agrawal, C.M., et al., "Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering Part A".

- Materials*, **2**, 1055-1089, (1995).
52. Nillesen, S.T., et al., "Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF". *Biomaterials*. **28**(6), 1123-1131, (2007).
 53. Simons, M. and J.A. Ware, "Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease". *Nat Rev Drug Discov*. **2**(11), 863-871, (2003).
 54. Kellar, R.S., et al., "Scaffold-based three-dimensional human fibroblast culture provides a structural matrix that supports angiogenesis in infarcted heart tissue". *Circulation*. **104**(17), 2063-2068, (2001).
 55. Shimizu, T., et al., "Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues". *FASEB J*. **20**(6), 708-710, (2006).
 56. Arkudas, A., et al., "Combination of Extrinsic and Intrinsic Pathways Significantly Accelerates Axial Vascularization of Bioartificial Tissues". *Plastic and Reconstructive Surgery*, **129**, 55-65, (2012).
 57. Levenberg, S., et al., "Engineering vascularized skeletal muscle tissue". *Nat Biotechnol*. **23**(7), 879-884, (2005).
 58. Osaki, T., et al., "Acceleration of Vascular Sprouting from Fabricated Perfusable Vascular-Like Structures" *PLoS ONE*, **10**(4), (2015).
 59. McGuigan, A.P. and M.V. Sefton, "Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **103**(31), 11461-11466, (2006).
 60. Kushida, et al., "Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces". *J Biomed mater Res*. **45**, 355-362, (1999).
 61. Hui, E.E., et al., "Micromechanical control of cell-cell interactions". *PNAS*. **104**, 5722-5726, (2007).
 62. Cho, C.H., et al., "Layered patterning of hepatocytes in co-culture systems using microfabricated stencils". *Biotechniques*. **48**, 47-52, (2010).
 63. Harimoto, M., et al, "Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes". *Journal of Biomedical Materials Research*. **62**, 464-470, (2002).
 64. Liu, Y., et al., "Hepatocyte Cocultures with Endothelial Cells and Fibroblasts on Micropatterned Fibrous Mats to Promote Liver-Specific Functions and Capillary Formation Capabilities". *Bio macromolecules*. **15**, 1044-1054, (2014).
 65. Jun, Y., et al., "3D co-culturing model of primary pancreatic islets and hepatocytes in hybrid spheroid to overcome pancreatic cell shortage". *Biomaterials*, **34**, 3784-3794, (2013).

66. Takebe, T., et al., “Self-Organization of Human Hepatic Organoid by Recapitulating Organogenesis In Vitro”. *Transplantation Proceedings*. **44**, 1018-1020, (2012).
67. Zheng, X. F., et al., “Mesenchymal stem cells on a decellularized cartilage matrix for cartilage tissue engineering”. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **16**, 593-602, (2011).
68. No, D.Y., et al., “Immune-protected xenogeneic bioartificial livers with liver-specific microarchitecture and hydrogel-encapsulated cells”. *Biomaterials*, **35**, 8983-8991, (2014).
69. Takebe, T., et al., “Vascularized and functional human liver from an iPSC-driven organ bud transplant”. *Nature*. **499**, 481-484, (2013).
70. Mironov, V., et al., “Organ printing: Tissue spheroids as building blocks”. *Biomaterials*. **30**, 2164-2174, (2009).
71. Xu, C., et al., “Scaffold-free Inkjet Printing of Three-Dimensional Zigzag Cellular Tubes”. *Biotechnology and Bioengineering*. **109**, 3152-3160, (2012).
72. Mironov, V., et al., “Organ printing: computer-aided jet-based 3Dtissue engineering”. *TRENDS in Biotechnology*. **21**, 157-161, (2003).
73. Wang, S., et al., “Three-dimensional primary hepatocyte culture in synthetic self-assembling peptide hydrogel”. *Tissue Eng. Part A*. **14**, 227-236, (2008).
74. Cho, C.H., et al., “Layered patterning of hepatocytes in co-culture systems using microfabricated stencils”. *Biotechniques*. **48**, 47-52, (2010).
75. Hanazaki, Y., et al., “Multiscale Analysis of Changes in an Anisotropic Collagen Gel Structure by Culturing Osteoblasts”. *ACS Appl.* **5**, 5937-5946, (2013).
76. Arkudas, A., et al., “Combination of Extrinsic and Intrinsic Pathways Significantly Accelerates Axial Vascularization of Bioartificial Tissues”. *Plastic and Reconstructive Surgery*. **129**, 55-65, (2012).
77. 日本臓器移植ネットワーク ホームページより
78. 酒井清孝：人工臓器(2)代謝系人工臓器、(株)コロナ社 (2003).
79. 水野美淳、田代仁正、大河原久子：肝臓と膵臓のはなし、(株)培風館 (1990).
80. Novikoff, A.B., “Cell heterogeneity within the hepatic lobule of the rat (staining reactions)”. *J Histochem Cytochem*, **7**(4), 240-244, (1959).
81. 織田敏次：肝臓の生物学、東京大学出版 (1990).
82. Rappaport, A.M., et al., “Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology”. *Anat Rec*, **119**(1), 11-34, (1954).
83. Seal, B.L., et al., “Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration”. *Mater Sci Eng R Rep*, **34**, 147-230, (2001).
84. 中嶋俊彰：肝臓病、(株)主婦の友社 (1999).
85. Schmidt, C. E., et al., “Acellular vascular tissues: Natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering”. *Biomaterials*. **21**, 2215-2231, (2008).

86. Baptista, P. M., et al., “The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid”. *Hepatology*. **53**, 604-617, (2011).
87. Uygun, B. E., et al., “Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix”. *Nature Med.* **16**, 814-820, (2010).
88. Macchiarini, P., et al., “Clinical transplantation of a tissue-engineered airway”. *Lancet*. **372**, 2023-2030, (2008).
89. Zheng, X. F., et al., “Mesenchymal stem cells on a decellularized cartilage matrix for cartilage tissue engineering”. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **16**, 593-602, (2011).
90. Wan, A. C. A., et al., “Multicomponent fibers by multi-interfacial polyelectrolyte complexation”. *Adv. Healthcare Mater.* **1**, 101-105, (2012).
91. Aoki, N., et al., “Adipocyte-derived microvesicles are associated with multiple angiogenic factors and induce angiogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology*”. **151**, 2567-2576, (2010).
92. Yamada, M., et al., “Controlled formation of heterotypic hepatic micro-organoids in anisotropic hydrogel microfibers for long-term preservation of liver-specific functions”. *Biomaterials*, **33**, 8304-8315, (2012).
93. Yow, S. Z., et al., “Collagenbased fibrous scaffold for spatial organization of encapsulated and seeded human mesenchymal stem cells”. *Biomaterials*. **30**, 1133-1142, (2009).
94. Jeon, O., et al., “Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin”. *J. Control. Release*. **105**, 249-259, (2005).
95. Jeon, O., et al., “factor from heparin-conjugated poly(L-lactide-co-glycolide) nanospheres and fibrin gel”. *Biomaterials*. **27**, 1598-1607, (2006).
96. Kim, M., et al., “Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes”. *Biomaterials*. **31**, 3596-3603, (2010).
97. Hou, Y. T., et al., “Growth factor/heparin-immobilized collagen gel system enhances viability of transplanted hepatocytes and induces angiogenesis”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **112**, 265-272, (2011).
98. Kingston, R., et al., “A single stem cell can recolonize an embryonic thymus, producing phenotypically distinct T-cell populations”. *Nature*. **317**(6040), 811-813, (1985).
99. Yuhas, J.M., et al., “A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids”. *Cancer Res.* **37**(10), 3639-3643, (1977).
100. Glicklis, R., et al., “Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds”. *Biotechnol Bioeng.* **67**(3), 344-353, (2000).
101. Okubo, H., et al., “A novel method for faster formation of rat liver cell spheroids”. *Artif Organs*. **26**(6), 497-505, (2002).
102. Sakai, Y., Nakazawa, K., “Technique for the control of spheroid diameter using microfabricated chips”. *Acta Biomater.* **3**(6), 1033-1040, (2007).

103. 稻森雅和：九州大学博士論文 (2012).
104. Inamori, M., et al., “An Approach for Formation of Vascularized Liver Tissue by Endothelial Cell-Covered Hepatocyte Spheroid Integration”. *Tissue Engineering Part A*. **15**, 2029-2037, (2009).
105. Mizumoto, H., et al., “A new culture technique for hepatocyte organoid formation and long-term maintenance of liver-specific functions”. *Tissue Eng Part C Methods*. **14**,167-75, (2008).
106. Seglen, P.O., “Preparation of isolated rat liver cells”. *Methods Cell Biol.* **13**, 29-83, (1976).
107. China, S.-M., et al., “TGF- β 1 regulation in hepatocyte-NIH3T3 co-culture is important for the enhanced hepatocyte function in 3D microenvironment”. *Biotechnology and Bioengineering*. **89**(5), 565-573, (2005).
108. Onoe, H., et al., “Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions”. *Nature Materials*. **12**(6), 584-590, (2013).

謝辞

本研究を行うにあたり、常に幅広い視野からご指導くださり、研究に取り組む姿勢をご指導くださった九州大学大学院工学研究院化学工学部門 梶原稔尚 教授に厚く恩礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜るとともに、高い次元と広い視野に立ったものの考え方について御教示下さいました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 水本博 准教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、種々の有益な御助言を賜りました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 上平正道 教授、井嶋博之 教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、様々な研究に有益かつ的確な御指導、御助言を頂きました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 名嘉山祥也 准教授に心から感謝致します。

いつも身近な先輩として相談に乗って頂き、時には厳しく指導して下さいました網本直記氏（現 ヘリオス（株））日頃の研究において甚大な貢献をして頂いたと共に、良き学友として共に切磋琢磨した中明弘氏（現 花王（株））、馬場大輔氏（現 吉野工業所（株））、岩永慎也氏（資生堂（株））、森村馨氏（富士フイルム（株））に感謝致します。また後輩の指導にも精力的に協力し、共に研究活動に勤しんだ藤井祐輔氏、中野優氏、松下沙希子氏（本学大学院博士課程）、成尾勇希氏、東謙吾氏、劉懷旭氏、江崎哲史氏、竹光洋樹氏、Phaisan Sae-Ieo 氏、赤岡智彬氏、江本 雄一氏、藪田涼平氏、岳玥氏、王相維氏、森汐理氏、中尾建太氏、徐炎氏（本学大学院修士課程）、伊藤恵氏、大賀美帆氏、小出慎之佑氏、千歳皓平氏、吉田隆晃氏（本学4年）に感謝致します。

化学工学部門の諸先生方ならびに事務室をはじめ職員の方々には多くの面でお世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、長期に渡る大学生活を常に応援して頂いた両親、姉弟、ならびに親族の方々には感謝の意が耐えません。深くお礼申し上げます。