

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

氏 名 : 奥平 達也

論 文 名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

生体外(*in vitro*)で培養された細胞を利用し、障害を受けた臓器・組織及びその機能を回復させる再生医療が注目を集めている。再生医療の実現化に向けて、細胞と、その生存を支持する増殖因子・足場材料を組み合わせることにより様々な生体組織類似の構造物の構築について研究が推進され、一部の分野では臨床応用が実現した。一方、臨床応用されている培養組織は皮膚や角膜といった薄い組織や低細胞密度の組織など比較的栄養・酸素要求性の低い培養組織に限られている。これに対し、高細胞密度かつ厚みのある組織では、組織構成細胞に栄養・酸素を供給する毛細血管網の配置が不可欠である。培養組織中に血管網を構築するために様々な手法が試みられてきたが、未だ発展途上であり、再生医療の実現化における解決すべき課題のひとつである。

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。現在、肝硬変や肝癌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。従って、肝移植に代わる新たな治療法として、肝再生医療技術の確立が期待されている。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急務である。現在、足場材料やヒドロゲル、脱細胞化組織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。

本研究では、高細胞密度かつ毛細血管網を有する培養肝組織を構築する手段として、肝細胞の球状組織体(スフェロイド)を多数積み上げ、巨大組織を形成する手法に着目した。肝細胞スフェロイドは、生体肝臓に近い細胞密度を有し、*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。本研究では、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まず作製し、この多層型スフェロイドを多数個集積し三次元組織の形成誘導を試みた。このようなプロセスを経ることにより、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り、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って高機能かつ高密度な肝組織の構築とその肝再生医療への応用を試みた。

第1章では、再生医療分野における組織工学技術の背景と現状の課題を述べると共に、高機能かつ高密度の培養肝組織構築技術の必要性を示し、それをふまえた上で本研究の方針を述べた。

第2章では、再生医療を実現するための手段のひとつであり組織培養の基盤技術である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おいて集積し三次元組織構築を行い、組織構成細胞の生存率と肝特異機能を評価した。この結果を通じて、内皮細胞被覆型肝細胞スフェロイドを用いた組織構築の有用性を示した。

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、内皮細胞による環状構造の形成が確認され、血管網構築手法として可能性を示した。また、内皮細胞の血管化能向上を目的として間葉系細胞を肝臓組織に導入した。間葉系細胞との共培養は、内皮細胞の管腔化を促進し、肝細胞の高機能化に有効なことが報告されている。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、高密度三次元肝組織の構築方法を確立した。

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%部分肝切除した急性肝不全モデルマウスを作製した。作製した肝組織をモデルマウスに移植し、生存率を調べ移植肝組織の性能評価を行った。その結果、移植後の生存時間の延長といった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、本研究の今後の課題及び展望について述べた。