

## 遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞を用いた中空糸型 バイオ人工肝臓装置の設計および評価

藤井, 祐輔

<https://hdl.handle.net/2324/4474953>

---

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (システム生命科学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

令和2年度博士論文

遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞を用いた  
中空糸型バイオ人工肝臓装置の設計および評価

令和3年2月

指導教員 水本博准教授

九州大学大学院 システム生命科学府

システム生命科学専攻

藤井 祐輔

# 目次

第1章 緒言 .....	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 .....	4
1.4 本論文の構成 .....	5
第2章 既往の研究 .....	6
2.1 肝臓 .....	6
2.1.1 肝臓 .....	6
2.2 急性肝不全 .....	6
2.2.1 急性肝不全の治療法 .....	6
2.2.2 血漿交換法(plasmas exchange: PE) .....	6
2.2.3 高効率血液浄化方法 .....	7
2.2.4 血液透析法(MARS, Prometheus) .....	7
2.3 バイオ人工肝臓 .....	8
2.3.1 HepatAssist .....	8
2.3.2 BHS (Bioartificial Hepatic Support System) .....	8
2.3.3 BLSS (Bioartificial Liver Support System) .....	8
2.3.4 TECA-HALSS (TECA-Hybrid Artificial Liver Support System) .....	8
2.3.5 HBAL (Hybrid Bioartificial Liver) .....	9
2.3.6 Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD) .....	9
2.3.7 Modular Extracorporeal Liver System (MELS) .....	9
2.3.8 Academic Medical Center BAL (AMC-BAL) .....	9
2.4 バイオ人工肝臓の細胞源 .....	10
2.4.1 ヒト初代肝細胞 .....	10
2.4.2 ブタ初代肝細胞 .....	10
2.4.3 腫瘍由来肝細胞株 .....	10
2.4.4 不死化ヒト肝細胞株 .....	11
2.4.5 成体幹細胞 .....	11
2.4.6 胚性幹細胞 (ES 細胞) .....	11
2.4.7 多能性肝細胞 (iPS 細胞) .....	11
2.4.8 卵形細胞 .....	12
2.4.9 ヒト胎生肝細胞 .....	12

2.4.10 肝芽細胞.....	12
2.4.11 遺伝子導入肝様細胞(iHep).....	12
<b>2.5 本研究室でのバイオ人工肝臓に関する既往の研究.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6 Hepa/8F5 細胞.....</b>	<b>13</b>
2.6.1 Hepa/8F5 細胞の単層培養.....	13
<b>第3章 Hepa/8F5 を用いた中空糸培養.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 本章の目的.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 実験方法.....</b>	<b>16</b>
3.2.1 本研究に使用した細胞・試薬.....	16
3.2.2 培養方法.....	16
3.2.3 評価方法.....	18
<b>3.3 実験結果.....</b>	<b>19</b>
3.3.1 細胞数変化.....	19
3.3.2 肝機能評価.....	20
3.3.3 考察.....	21
<b>3.4 本章のまとめ.....</b>	<b>23</b>
<b>第4章 高酸素分圧下における Hepa/8F5 細胞の中空糸培養.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 本章の目的.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 実験方法.....</b>	<b>25</b>
4.2.1 本研究で使用した試薬.....	25
4.2.2 中空糸バンドルの作製.....	25
4.2.3 実験条件.....	25
4.2.4 評価方法.....	25
<b>4.3 実験結果.....</b>	<b>27</b>
4.3.1 細胞数及び細胞密度変化.....	27
4.3.2 HE 染色.....	28
4.3.3 肝機能評価.....	30
4.3.4 考察.....	33
<b>4.4 本章のまとめ.....</b>	<b>35</b>
<b>第5章 中空糸を用いた Hepa/8F5 細胞の至適培養条件の設計.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 本章の目的.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 実験方法.....</b>	<b>37</b>

5.2.1	本研究で使用した試薬.....	37
5.2.2	中空糸バンドル.....	37
5.2.3	実験条件.....	37
5.2.4	評価方法.....	37
<b>5.3</b>	<b>実験結果.....</b>	<b>38</b>
5.3.1	肝機能誘導のタイミングに関する検討.....	38
5.3.2	細胞数及び細胞数密度, 免疫蛍光染色による中空糸内観察.....	39
5.3.3	肝機能評価.....	40
5.3.4	考察.....	42
5.3.5	細胞の播種法に関する検討.....	43
5.3.6	細胞数および細胞密度変化, 免疫蛍光染色による中空糸内観察.....	44
5.3.7	肝機能評価.....	46
5.3.8	考察.....	48
<b>5.4</b>	<b>本章のまとめ.....</b>	<b>50</b>
<b>第6章</b>	<b>Hepa/8F5細胞を固定化した中空糸型バイオ人工肝臓装置の開発.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>本章の目的.....</b>	<b>51</b>
<b>6.2</b>	<b>中空糸型バイオ人工肝臓装置の設計.....</b>	<b>51</b>
6.2.1	中空糸型バイオ人工肝臓装置の作製方法.....	52
6.2.2	中空糸型バイオ人工肝臓装置への播種方法.....	55
6.2.3	実験条件.....	55
6.2.4	評価方法.....	56
<b>6.3</b>	<b>実験結果.....</b>	<b>57</b>
6.3.1	細胞数計測.....	57
6.3.2	肝機能評価.....	58
<b>6.4</b>	<b>考察.....</b>	<b>60</b>
<b>6.5</b>	<b>本章のまとめ.....</b>	<b>61</b>
<b>第7章</b>	<b>結言.....</b>	<b>62</b>
<b>7.1</b>	<b>本論文のまとめ.....</b>	<b>62</b>
<b>7.2</b>	<b>今後の課題と展望.....</b>	<b>64</b>
	参考文献.....	66
	謝辞.....	75

# 第1章 緒言

## 1.1 本研究の背景及び目的

近年、再生医療研究の進展により、バイオ人工臓器や細胞移植といった生細胞を利用した新たな治療法が注目を集めている。従来までの医療では、ヒト組織・臓器の機能を補うためには臓器移植や組織移植、人工物を用い作製された人工的な組織・臓器が用いられてきた。しかしながら、これらの治療法にはドナー不足や免疫応答・機能不足による予後不良、劣化による定期的な検査・交換が必要であるといった問題がある。そこで、Vacanti, Langer らによって提唱された工学的技術を応用し、臓器や組織の再生を目的とした組織工学(Tissue Engineering)が注目されている。これらの技術を用い、培養細胞と人工担体とを組み合わせたハイブリッド型の人工臓器や組織の再構築が皮膚、骨、血管などの分野において盛んに研究されている<sup>1-11</sup>。

肝臓は生体における代謝の中心臓器であり、一度肝不全状態となった場合、十分な再生が得られない限り、肝移植しか有効な治療法が存在しない。我が国では、2014年末までにおける総移植者数は7937例であり、ドナー別では、脳死移植が264例、心停止移植が3例、生体移植が7673例である。一方、肝硬変や肝細胞癌といった疾患は年間20000例の発生があり、肝移植適応者数は年間で約2200例とされている<sup>12</sup>。肝移植が必要な患者は概ね余命が1年以内であり、待機期間が長期にわたると、死に至るケースがほとんどである。深刻なドナー不足や拒絶反応等の問題により、年間の肝移植施行数は約500例程度であり、年間で2000人近くの患者が肝移植の適応でありながら受けることができず亡くなっているのが現状である。そのため、肝移植に代わる新たな治療法の開発が一日も早く望まれている。そこで、移植以外での救命の方法として、肝細胞を利用したバイオ人工肝臓の進歩と実用化は大いに期待されている<sup>13</sup>。

一方、現在のバイオ人工肝臓の実用化に向けた主な課題は、臨床用細胞源の確保である。臨床用細胞源として理想とされるのはヒト肝細胞であるが、ドナー肝臓が不足しており、肝細胞自体が増殖能を持たないため、ヒト肝細胞が最も有用な細胞源であるとは言い切れない。ヒト肝細胞以外にも様々な細胞がバイオ人工肝臓の細胞源として候補に挙がっており、ES細胞やiPS細胞等の幹細胞、ダイレクトリプログラミングによる肝細胞誘導、種々の肝細胞株の利用等が検討されている。本研究室では、肝細胞が高機能を発現する培養法として、内径300µm程度の中空糸膜の内部に細胞を充填し細胞組織体(オルガノイド)の形成を誘導する中空糸/オルガノイド培養法を確立し<sup>14</sup>、本培養法を利用したバイオ人工肝臓装置の性能評価について検討を行ってきた。その検討過程において種々の細胞源の評価も実施し、これまでに初代肝細胞、ES細胞・iPS細胞由来肝細胞の評価を進めてきた。しかし、バイオ人工肝臓用の細胞源として、性能、品質管理、大量供給、コスト等種々の要求を十分に満たす決定的な細胞源は未だ見いだせておらず、細胞源の探索とその評価は引き続き重要な検討項目である。

そこで本研究では、遺伝子工学的手法により遺伝子導入を行い、高機能発現を達成した肝がん由来細胞株（ヘパトーマ細胞）に着目した。一般的にヘパトーマは旺盛な増殖能を有しているが肝機能が極めて低いという問題がある。これに対し、本研究において着目した遺伝子導入マウスヘパトーマ（Hepa/8F5）細胞は、マウス由来ヘパトーマ Hepa1-6 細胞に対し、8種類の肝特異的転写因子遺伝子を導入した細胞である<sup>15</sup>。遺伝子導入に際し、テトラサイクリン遺伝子発現誘導系を利用することにより Doxycycline (Dox)の添加時のみ肝転写因子が活性化され、細胞増殖の停止と肝特異的機能が発現可能な細胞株として樹立された細胞株である。Hepa/8F5 細胞は無限増殖能を有しているため、細胞の大量供給が可能である。さらに、抗生物質である Dox を培地中に添加することにより、細胞増殖を停止し高い肝機能を発現するという特性を有する。このように Dox の添加により細胞増殖・肝機能発現の On/Off を容易に制御することが可能であるという点から、Hepa/8F5 細胞はバイオ人工肝臓の細胞源として期待できるのではないかと考えた。

バイオ人工肝臓装置の臨床応用のためには、 $10^{10}$  オーダーの細胞を培養することが可能な環境が必要である。この細胞を現実的な容積である数リットルスケールの装置で培養を行うためには、 $10^7$  cells 以上の高密度で肝細胞を培養する技術が必要である<sup>16</sup>。本研究では、元来、中空糸内部においてオルガノイド形成を誘導する独自の独自の培養法である中空糸/オルガノイド培養法に着目し、Hepa/8F5 細胞用に手法を改変し、最適な培養条件を見出すと共に、その技術を利用したバイオ人工肝臓装置開発及び評価を行うことを目的とした。

## 1.2 本研究の方針

前述の通り、肝移植に替わる新たな治療法の一つとして、バイオ人工肝臓による治療が期待されている。既往の研究では、装置内の中空糸内に血液を通し、中空糸の外部空間に細胞を充填するバイオ人工肝臓装置の開発が行われ、ブタ初代肝細胞やヒト肝細胞株である C3A 株が細胞源として用いられてきた。しかし、ブタ初代肝細胞の臨床応用には、異種免疫やブタ内因性レトロウイルスによる動物性疾患の危険性などの問題があり、使用が制限されている。一方で、ヒト腫瘍細胞由来である C3A 細胞では、肝特異的機能の発現が不十分である。これらのことから、十分な肝機能を保持するバイオ人工肝臓の開発には、適切な臨床用細胞源の確保が最も重要な課題であり、その候補細胞源が本来の機能を発現・維持可能な培養法を基盤とした装置開発が必要である。臨床細胞源として最も好まれている細胞はヒト初代肝細胞であるが、ドナー源不足や細胞の維持・増幅が困難であり、ヒト初代肝細胞以外の細胞源を確立する必要がある。

本研究では、バイオ人工肝臓装置の新たな細胞源の一つとして、無限増殖能を有し、薬剤添加により肝特異的機能を発現する能力を持つ、遺伝子導入肝がん由来細胞株である Hepa/8F5 細胞に着目した。

次に中空糸内部に細胞を充填し、高密度培養を行う中空糸培養法に着目した。この独自の培養法に Hepa/8F5 細胞を組み合わせ、Hepa/8F5 細胞が最も高い肝特異的機能を発現する培養条件の検討を行った。

上記の検討を基にバイオ人工肝臓装置の開発に取り組んだ。本装置は中空糸を編織りした中空糸シートを作成し、このシート内部に Hepa/8F5 細胞を充填後、灌流培養条件下で肝機能誘導を行い、肝特異的機能発現の評価を行った。

### 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] 中空糸培養法を用いた Hepa/8F5 細胞の至適培養条件の確立

バイオ人工肝臓適用を目的とした細胞源確保の検討は多くなされており、ヒト初代肝細胞やブタ初代肝細胞やヒト肝臓腫瘍由来細胞、ES・iPS 細胞や遺伝子導入細胞である iHep などを用いた、高肝機能発現への取り組みが多く報告されている。しかし、臨床応用可能なバイオ人工肝臓装置の設計には、装置体積を可能な限り小さくする必要があり、効率的な細胞の高密度培養技術が求められる。本研究では、血漿分離用中空糸内部で高密度に細胞培養が可能な中空糸培養法に注目した。また、新たな細胞源の候補の一つとして遺伝子工学的手法を用いて作製された Hepa/8F5 細胞を組み合わせ、最適な培養条件の探索を行った。

#### [2] 中空糸型バイオ人工肝臓装置の設計と Hepa/8F5 細胞の肝特異的機能発現と性能評価

本研究で開発を目指したバイオ人工肝臓装置は体外から強力なサポートを行う体外設置型のシステムである。バイオ人工肝臓装置内の Hepa/8F5 細胞の肝特異的機能を十分に反映するためには、大量の Hepa/8F5 細胞を高密度に充填する装置の開発が必須である。本研究では編織した中空糸シートを充填した中空糸型バイオ人工肝臓装置を作製した。この装置内に Hepa/8F5 細胞を播種し、灌流培養下で肝機能発現誘導を行い、肝機能評価を行った。

## 1.4 本論文の構成

第1章では、本研究の背景として、再生医療に関する現状を述べ、本研究の目的とその達成に向けた方針を示した。また、本研究のオリジナリティについて述べ、本研究の位置付けを明確にした。

第2章では、本研究の標的臓器である肝臓とバイオ人工肝臓装置の現状を概説した。さらに、バイオ人工肝臓装置の細胞源として検討されている細胞について示した。

第3章では、中空糸培養法を用い、Hepa/8F5細胞の肝機能誘導を行った。また、培養経過に伴う細胞数・密度変化、肝特異的機能の発現について評価した。その結果、肝特異的機能の一つであるアンモニア除去能の発現が見られず、さらなる条件検討の必要性が示された。

第4章では、中空糸培養におけるHepa/8F5細胞の肝機能発現誘導の試みとして、Hepa/8F5細胞のエネルギー代謝と酸素分圧の関係に着目し、高酸素分圧下においてHepa/8F5細胞を培養した。その結果、Hepa/8F5細胞はアルブミン分泌能だけでなくアンモニア除去能においてもマウス初代肝細胞と同等の肝機能レベルを示し、中空糸培養によるHepa/8F5細胞の高い肝機能発現を達成した。

第5章では、中空糸の小口径化と中空糸内細胞密度に着目し、Hepa/8F5細胞の至適培養条件の確立を試みた。その結果、小口径中空糸内で細胞密度を低くして培養を行うことで、マウス初代肝細胞と同等の肝機能を有するHepa/8F5細胞の培養に成功した。この結果、Hepa/8F5細胞がバイオ人工肝臓装置の細胞源となり得る能力を持つことを示した。

第6章では、中空糸型バイオ人工肝臓装置内を設計・作製し、Hepa/8F5細胞を播種し、灌流培養下での肝機能誘導を行った。その結果、これまでの検討と同様に、肝特異的機能の発現が確認でき、Hepa/8F5細胞を組み込んだ機能的なバイオ人工肝臓装置の開発を行い、高いアルブミン分泌能を示した。

第7章では、本論文の総括を行うと共に、本研究の今後の課題と展望について述べた。

## 第2章 既往の研究

### 2.1 肝臓

#### 2.1.1 肝臓

肝臓は、体重の約 50 分の 1 にあたる 800~1400g の重量を持つ、体内で最大の臓器であり、“生体の化学工場”とも表現される機能は 500 種類以上に及び、生体内における化学工場とも例えられる。また、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、肝細胞の肥大化・増殖により、自己修復が可能である。また、これに加え高い予備能力を持つため、肝疾患の症状が末期に至るまで無自覚で進行することが多く、重症化しやすいことから、沈黙の臓器とも呼ばれている<sup>17-19</sup>。

### 2.2 急性肝不全

肝臓は多彩な機能を保持するために、各種の中毒性因子の影響を受けやすい。肝細胞の機能異常が進行し、肝臓としての機能を保てなくなった場合に肝不全状態へと陥る。特に、肝機能が数日中に急速に悪化し、肝機能を維持できなくなる状態を急性肝不全 (Acute liver failure) と呼び、その中でも、劇症肝炎などの重篤な肝不全は死亡率が 80%を超える非常に危険な疾患である。現在、劇症肝炎などの重篤な肝不全に対する有効な治療法は肝移植のみである。これに対して、日本では、年間 2000 例以上の移植適応者がいると推定されているものの、深刻なドナー不足が課題となっている。そのため、肝移植施行例は生体肝移植を含めても 500 例ほどで、現状では肝移植が一般的な治療法とは言い難い。一方で、肝臓は極めて高い再生能力を保持している臓器であり、急性期の肝機能補助が可能になれば、肝機能補助中に患者自身の肝機能の回復や肝移植までの橋渡しが可能である<sup>20</sup>。

#### 2.2.1 急性肝不全の治療法

重篤な肝臓病患者に対して、肝臓移植が最も効果的であるが、深刻なドナー不足により制限されている。現在、肝不全に対する肝臓移植以外の治療法は、肝疾患患者の血液を血漿交換や血液ろ過透析などの機械的人工肝臓の適用により、毒性物質を除去し脳性昏睡を回避した上で、患者の自然回復を促すものである。治療後の肝不全患者に対しては、一時的に昏睡からの改善がみられるが、生存率は約 30%程度であり、根本的な治療法には至っていない。以下に、現在までに行われている血漿交換・血液透析法について示す<sup>17,21,22</sup>。

#### 2.2.2 血漿交換法(plasmas exchange: PE)

肝臓の合成能を補い、凝固因子などのタンパク質の補充や毒性物質の除去を行うため、日本では肝疾患患者の血漿を健常者の血漿と入れ替える治療が行われている。この治療法は劇症肝炎患者にも適用されており、昏睡からの覚醒や症状改善の報告がなされている。一方で、救命率では報告ごとのばらつきが大きく、全体的には 30%程度となっている。ま

た、大量の血漿を必要としており、それに伴う副作用やウイルス感染の危険性が指摘されている<sup>23-25</sup>。

### 2.2.3 高効率血液浄化方法

日本では肝性昏睡起因物質は水溶性・中分子量物質・小分子量物質との仮定の下、治療が行われてきた。そこで、前述の PE で肝臓の合成能を補い、解毒能として透析流量と濾過流量を増加させた high flow-volume continuous hemodiafiltration (CHDF)を組み合わせ治療が行われている。施行時間は 6-10 時間を基準に行われ、非常に良好な覚醒効果が報告されている。一方で、高効率血液浄化法の長時間連日施行では有用物質まで除去してしまうことや透析液の大量使用による低リン血漿・低カリウム血漿が課題となっている<sup>24, 26-28</sup>。

### 2.2.4 血液透析法(MARS, Prometheus)

肝臓により処理される物質は、ビリルビンや胆汁などアルブミンに結合したものが多く、欧米ではアルブミンに結合した毒素の除去をターゲットとした治療が行われている。Molecular Adsorbents Recirculating System (MARS)は、血液回路とアルブミン回路から成るシステムである。血液回路において、アルブミン不透過性膜を介し、血液とアルブミンが対向・還流し、アルブミン回路で、高濃度アルブミン液が補充される。アルブミン濃度差により、アルブミン結合毒素が高濃度アルブミンへと結合する。また、アルブミン回路内には、透析器や活性炭吸着機、イオン交換樹脂が組み合わせられており、水溶性毒素の除去とアルブミン結合毒素を除去し、再び高濃度アルブミン透析液として使用が可能である。MARS を適用した結果、肝性脳症を伴う肝硬変患者において有意な改善が報告された一方で、慢性肝不全の急性増悪に対する治療では、生存率に改善は見られなかった。

Prometheus は、アルブミンが透過する膜により血液をろ過し、アルブミン分画を分離する。このアルブミンを含むろ液は、中性樹脂吸着機とイオン交換樹脂によりアルブミン結合毒素が除去され、再び血液回路へと戻される。Model for endstage liver disease では、有意な予後治療を認めているものの、期待される結果を残すことはできなかった<sup>29-33</sup>。

## 2.3 バイオ人工肝臓

前述した機械的人工肝臓は、血液透析や新鮮血漿との交換による毒素の除去や必要因子の供給が主である。これらの治療によりある程度の救命率の改善は見られているが、根本的な治療法とはなっておらず、肝再生因子まで除去してしまうことが指摘されている。そこで、さらなる有効な治療法確立に向け、バイオ人工肝臓装置(BAL)の開発が期待されている。BALの特徴として、数百種類にも及ぶ肝機能を代替するため、肝機能の担い手である肝実質細胞をモジュール内に固定し、患者の血液を通すことで、患者の肝臓をサポートする装置である。生細胞の利用により、強力な肝機能補助が行えること、また、生体肝臓の再生が促進され、自然回復することが期待されている。現在までにいくつかのバイオ人工肝臓装置が臨床応用に適用されており、以下に代表的なものを示す<sup>22,34</sup>。

### 2.3.1 HepatAssist

HepatAssistは、中空糸型バイオリアクターの外部空間にブタ初代肝細胞を $5\sim 7\times 10^9$  cellsをマイクロキャリアに固定化した装置と活性炭カラムを組み合わせ、中空糸内部に患者の血漿を通すことにより、物質交換を行うシステムである。HepatAssistは、欧米20施設において肝不全患者に対する臨床試験が行われたが<sup>30</sup>、統計的な有意差は見られなかった。また、劇症肝炎、亜劇症肝不全患者にも適用されたが、僅かな改善が認められただけであった<sup>35-42</sup>。

### 2.3.2 BHS (Bioartificial Hepatic Support System)

基本的には、前述のHepatAssistと同様のシステムであり、 $1.5\times 10^{10}$ 個の凍結ブタ肝細胞を充填したモジュールと活性炭カラムを組み合わせたシステムである。1例の慢性肝不全の急性増悪に3回適用されたが、改善は認められなかった<sup>43</sup>。

### 2.3.3 BLSS (Bioartificial Liver Support System)

70~120 gのブタ肝細胞と20%のコラーゲンを組み合わせ、中空糸の外部空間に充填されたモジュールである。Phase Iにおいて臨床評価が行われ、急性肝不全患者に4例適用されたが、3例が死亡している<sup>44</sup>。

### 2.3.4 TECA-HALSS (TECA-Hybrid Artificial Liver Support System)

$1\sim 2\times 10^{10}$ 個のブタ肝細胞懸濁液を中空糸外部空間に充填し、活性炭と組み合わせたシステムである。6例の患者に適用し、少なくとも2例が肝移植を受けずに回復し、血中生化学の改善が報告されている<sup>45</sup>。

### 2.3.5 HBAL (Hybrid Bioartificial Liver)

1.0×10<sup>10</sup> 個のブタ肝細胞浮遊液を中空糸外部空間に充填したモジュールであり、活性炭カラムとビリルビン吸着カラムが組み込まれている。Phase I 臨床試験で 12 例 (B 型肝炎) に適用された。血中生化学などの改善効果は見られたが、詳細な予後は不明である<sup>46</sup>。

### 2.3.6 Extracorporeal Liver Assist Device (ELAD)

中空糸型のモジュールの外側にヒト肝芽腫由来である C3A 株を充填したバイオ人工肝臓装置である。Phase I 臨床試験では、急性肝疾患 10 例、primary non function で 1 例適用された。この試験では、58 時間以内の適用がなされ、4 例が肝移植成功、6 例が肝移植前に死亡、1 例が肝移植なしでも回復した。また、Pilot-controlled trial では、予測死亡率 50% のグループ 17 例と測死亡率 10% のグループ 7 例において、ELAD と一般治療の比較がなされた。ELAD 治療群でアンモニアやビリルビンなどの毒性物質の除去や肝性脳症からの回復が報告されたものの、統計学的な有意差は確認されなかった<sup>47,48</sup>。

### 2.3.7 Modular Extracorporeal Liver System (MELS)

3 次元に編み込まれた中空糸が血漿流入・血漿流出・ガス交換を担い、中空糸の外側にブタ肝細胞やヒト肝細胞が利用されるバイオリクターであり、急性肝不全 8 例に適用された。その結果、移植への橋渡しに成功したものの、stand-by 治療であり、コストが高いこと、ドナー肝に頼らなければならないことが課題である<sup>49,50</sup>。

### 2.3.8 Academic Medical Center BAL (AMC-BAL)

ブタ初代肝細胞をらせん状親水性ポリエステル不織布に 3 次元的に充填し、酸素供給のための中空糸が配置されたリアクターである。患者血漿と肝細胞が直接接し、生体内のかん流状態を再現していることが特徴である。移植待機中の肝不全患者の Phase I 試験が行われ、12 例の急性肝不全患者に適用された。7 例は肝移植に橋渡しされ、1 人の患者が 2 回の治療後に肝機能改善を示し、移植を必要としなかった。しかしながら、4 例が primary non function や多臓器不全により死亡している<sup>51-54</sup>。

## 2.4 バイオ人工肝臓の細胞源

バイオ人工肝臓のヒトへの応用には、十分な肝特異的機能を保持した大量の細胞を確保しなければならない。また、細胞の安全性や倫理的な問題、長期間の肝機能保持といった課題もあり、現在までにこれらの要件全てを満たす細胞は存在しない。本節では、現在までにバイオ人工肝臓への応用がされた、または期待されている細胞源を示す。

### 2.4.1 ヒト初代肝細胞

ヒト初代肝細胞は肝臓本来の多くの機能を保有しており、ヒト由来のタンパク質も供給可能であることから人工肝臓への応用に最も好まれる細胞源である<sup>55</sup>。しかし、ヒト初代肝細胞の主な供給源は処分された死体から単離されるため、使用に制限があり、獲得できる細胞数にも限りがある。また、生体外では肝臓の全ての機能を再現できず、長期間の機能維持も困難となっている<sup>56</sup>。

### 2.4.2 ブタ初代肝細胞

ブタ初代肝細胞は大量供給が可能であること、ヒト初代肝細胞と生理的特徴が似ていることより、従来から有力な細胞源として候補に挙げられてきた。しかし、ブタの細胞内に存在する内因性レトロウイルス (Porcine Endogenous Retrovirus : PERV) の危険性が問題となっている<sup>57-59</sup>。1997年に *in vitro* においてブタ腎臓細胞からヒト細胞へと PERV が感染したとの報告がされ、異種ウイルスの感染による新しい病原体が産生されることが危惧されている。現在までに臨床応用で用いられたブタ肝細胞を使用した BAL において、PREV 感染の報告はないものの、明確な安全性を示すことは不可能であり、ブタ細胞の使用には大きなハードルとなっている。

また、ブタの細胞を使用した場合、免疫応答の問題も避けることができない。ブタの細胞とヒト血漿が接触することにより超急性拒絶反応が引き起こされ、患者体内で急激なアレルギー性ショックが生じ、患者の生命を危険に晒してしまう可能性がある。

### 2.4.3 腫瘍由来肝細胞株

*In vitro* での増殖能を確保するために、腫瘍由来の肝細胞株を用いた研究が盛んに行われている。腫瘍由来細胞の最大の特徴は、無限増殖能を保持していることであり、代表的な細胞株として ELAD に使用されてきた C3A 細胞が挙げられる。C3A 細胞はヒト肝がん細胞株である HepG2 から単離され、旺盛な増殖能を持ち、タンパク質合成、窒素代謝に優れている。しかしながら、シトクロム P450、アンモニア除去、アミノ酸代謝が低レベルであるといった課題が挙げられる<sup>48,60</sup>。加えて、腫瘍由来の細胞株を使用する際の最大の問題点である腫瘍形成の危険性を考慮しなければならない。誤って腫瘍由来細胞がヒト体内に流入すると腫瘍化する危険性があることや、腫瘍形成性物質の伝達、それに伴う合併症誘発のリスクも危惧されている<sup>61</sup>。

#### 2.4.4 不死化ヒト肝細胞株

肝細胞を不死化することで初代肝細胞の欠点である脆弱な増殖性を克服する目的より、SV40T やリポフェクション法により不死遺伝子を導入する研究が行われている<sup>62-66</sup>。これらの細胞には潜在的な腫瘍化の懸念があるが、最近では安全性の追求のため Cre/loxP 原理を用いて導入したがん遺伝子を取り除く技術や HSVTK のような自殺遺伝子を導入する技術が開発されている<sup>67</sup>。しかし、メチル化により自殺遺伝子の転写が阻止される場合があること、Cre/loxP 組み換えにより DNA が損傷を受ける可能性があることなど、長期的な安全性の検討が不可欠となっている。

#### 2.4.5 成体幹細胞

生体幹細胞は生体内に存在する細胞であり、間葉系幹細胞 (MSC) や骨髄由来造血幹細胞などが挙げられる。腫瘍形成のリスクも小さく、倫理的懸念も少ない。*in vitro* で MSC の肝細胞への分化が報告されており、アルブミン産生能や尿素分泌能、シトクロム P450 活性等の肝特異的機能を示した<sup>68-71</sup>。しかしながら、分化プロトコルが未確立であり、筋繊維芽細胞への分化リスクがある。また、現在の分化誘導プロトコルは複雑であり多量の成長因子及び添加因子を必要とするため、コスト面でも解決すべき点が多く存在する<sup>72,73</sup>。

#### 2.4.6 胚性幹細胞 (ES 細胞)

ES 細胞 (Embryonic Stem cells : 胚性幹細胞) は、受精後 5、6 日目の胚盤胞の内部細胞塊に由来する幹細胞であり、全ての種類の細胞に分化できる全能性を保持している。また、フィーダー細胞との共培養により無限に増殖させることが可能であり、再生医療への応用にも期待されている<sup>74-79</sup>。しかし、ES 細胞にはテラトーマ形成の危険性や目的細胞への効果的な分化方法の確立が必要である<sup>80</sup>。さらにフィーダー細胞を使用しているため臨床応用に制限がかかること、受精卵が細胞源であるため倫理的な問題が避けられないことが課題である。

#### 2.4.7 多能性肝細胞 (iPS 細胞)

ES 細胞に替わる分化多能性幹細胞として、体細胞に 4 つの遺伝子 (*Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4*) を導入することで、様々な細胞に分化可能な iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell : 人工多能性幹細胞) が挙げられる<sup>81,82</sup>。ES 細胞と同様に多分化能を維持したまま、長期培養でき幅広い分野への応用が研究されている。ウイルスベクターの使用による安全性の問題が指摘されているが、現在ではウイルスベクターを使用せずに iPS 細胞が樹立可能であり、より安全な iPS 細胞が作成も可能となっている。ES 細胞のように受精卵を使用しないため倫理的問題を回避できること、患者自身から iPS 細胞を作成できるため免疫反応

のない組織や臓器を作製が期待されている<sup>83,84</sup>。一方で、分化効率が大きな課題として挙げられ、今後の応用に向け、さらなる分化効率の改善が必須である。

#### 2.4.8 卵形細胞

卵形細胞(Oval Cells)は肝臓が障害を受けた際に現れる幹細胞である。肝障害中に増殖し、肝細胞と胆管細胞を増加させるという特徴を持つ<sup>85</sup>。しかし、障害中の肝臓にしか存在しないこと、細胞数が少ないことが単離・精製の妨げになっており、腫瘍形成の危険性もあることから、卵形細胞の応用は困難となっている<sup>86</sup>。

#### 2.4.9 ヒト胎生肝細胞

ヒト胎生肝細胞は成熟肝細胞と違い *in vitro* では数か月間は細胞分裂を行う、増殖性を保持している<sup>87</sup>。現在、さらなる増殖のためにヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)<sup>88</sup>やSV40 ウイルスを用いた不死化の研究<sup>89</sup>が行われており、肝不全モデル動物への不死化ヒト胎生肝細胞の移植による治療効果の報告もされている<sup>90,91</sup>。しかし、細胞源がヒト胎児であるため倫理的に大きな問題があること、バイオ人工肝臓に適用した際、ヒト初代肝細胞と比べると大きく機能が劣ってしまう問題が挙げられる。また、腫瘍化や分化不十分などの安全性の問題により応用が制限されている<sup>92</sup>。

#### 2.4.10 肝芽細胞

肝芽細胞は妊娠の初期段階で胎生肝細胞から単離され、胎生肝細胞より旺盛な増殖性を保持し、*in vivo* で肝細胞と胆管細胞に分化可能である<sup>93</sup>。疾患モデル動物への移植研究では、肝臓内に組み込まれ増殖することが示されている<sup>94-96</sup>。しかし、胎生肝細胞と同様に倫理的問題や安全性の問題を解決する必要がある。

#### 2.4.11 遺伝子導入肝様細胞(iHep)

成熟細胞に複数の肝転写因子を遺伝子導入し、肝特異的機能を発現させる肝様細胞(iHep)の樹立に関する研究が着目されている<sup>97,98</sup>。動物実験では肝疾患モデルマウスに生着し肝組織が再構築された報告やバイオ人工肝臓に応用し、大型動物の治療効果を報告した例もある<sup>99</sup>。iHepの利点は、iPS細胞の作製・分化という複雑な過程を回避できる点であり、時間的な短縮が期待される。欠点として機能が不安定であることや長期的な安全性の問題が挙げられ、今後も継続し研究を行う必要がある。

## 2.5 本研究室でのバイオ人工肝臓に関する既往の研究

本研究室ではこれまでに、血漿分離用中空糸の内部空間に細胞を充填し、細胞組織体（オルガノイド）を形成する中空糸/オルガノイド培養法を確立し、本培養法を応用したバイオ人工肝臓装置の性能評価について検討を行ってきた。その検討においては、初代肝細胞<sup>99</sup>やES細胞由来肝細胞<sup>100</sup>が用いられてきたが、性能、品質管理、大量供給、コスト等の要求を十分に満たす決定的な細胞源は未だ見いだせておらず、細胞源の探求とその評価は引き続き重要な検討項目である。

## 2.6 Hepa/8F5 細胞

本研究では、バイオ人工肝臓の細胞源として、Hepa/8F5 細胞<sup>15</sup>に着目した。Hepa/8F5 細胞は、マウスヘパトーマ細胞株に8種類の肝特異的転写因子遺伝子とテトラサイクリン遺伝子発現誘導因子を導入し樹立された細胞株である。Hepa/8F5 細胞は通常の培養においては無限増殖能を示し、細胞の大量獲得が可能である。一方、培地中へ抗生物質である Doxycyclin (Dox) を添加した場合、肝転写因子群が活性化され高い肝特異的機能を発現するという特長を持つ。このように増殖能と肝機能発現能を有した Hepa/8F5 細胞はハイブリッド型バイオ人工肝臓の新たな細胞源として期待される。

### 2.6.1 Hepa/8F5 細胞の単層培養

Hepa/8F5 細胞を単層で培養したときの細胞数 (Fig. 2-1) および肝機能発現(Fig. 2-3)の変化を示す。培地中に Dox を添加しない培養条件 (Dox-) においては、細胞は旺盛に増殖し、代表的な肝機能の指標であるアンモニア除去能とアルブミン除去能の発現は認められなかった。一方、培養開始1日目より培地中に Dox を添加した場合 (Dox+)、旺盛な細胞増殖は確認されなかったが、アンモニア除去能とアルブミン分泌能の発現は培養経過とともに向上した。

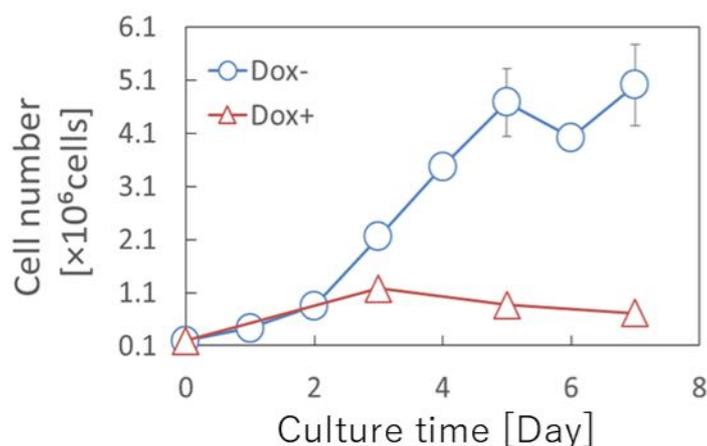
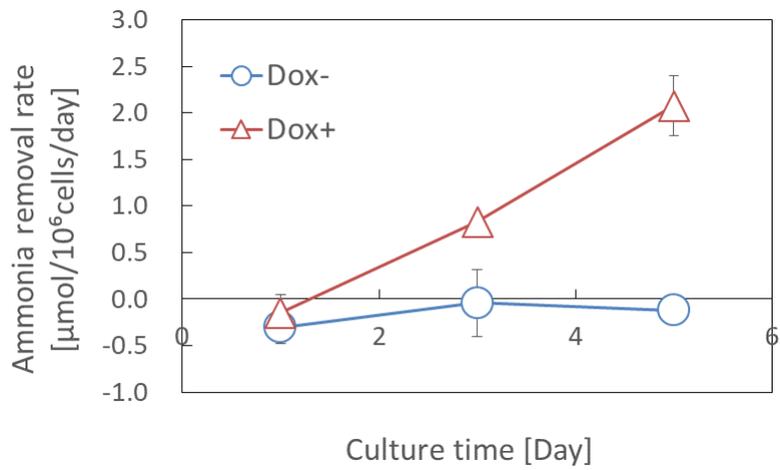
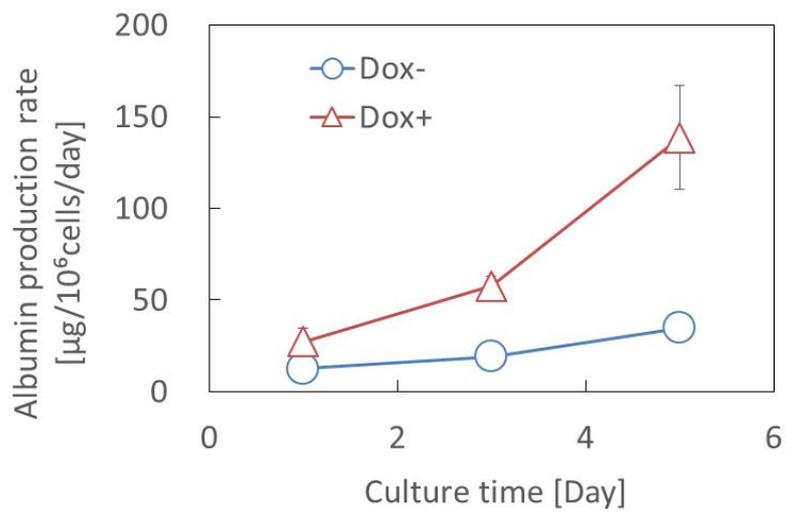


Fig. 2-1 Changes in cell number of Hepa/8F5 cells in monolayer culture



**Fig. 2-2 Changes in ammonia removal rate of Hepa/8F5 cells in monolayer culture**



**Fig. 2-3 Changes in albumin secretion rate of Hepa/8F5 cells in monolayer culture**

## 第3章 Hepa/8F5 を用いた中空糸培養

### 3.1 本章の目的

本章では、中空糸培養法を用いて Hepa/8F5 細胞の培養を行い、高い肝機能が発現する培養条件の検討を行った。具体的には、Hepa/8F5 細胞と中空糸培養を組み合わせ、高い肝機能を発現する培養条件の探索を行った。同時に中空糸培養での肝機能発現レベルを明らかにし、バイオ人工肝臓装置設計の指標とすることを目的とした。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 本研究に使用した細胞・試薬

#### Hepa/8F5 細胞

Hepa/8F5 (RCB4661) は上平 正道 教授 (九州大学大学院工学研究院化学工学部門) より  
供与いただいた細胞を使用した。

#### 継代培養培地 (細胞増殖用培地)

Hepa/8F5 細胞の継代培養培地には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose  
(DMEM high glucose ; Life Technologies Japan : 11971-025)を基礎培地として使用した。Fetal  
Bovine Serum (FBS ; Japan Bioserum)、Penicillin/Streptomycin (Merck Millipore : R-TMS-  
AB2C) を以下の濃度で添加した。

Table 3-1 Composition of the culture medium

DMEM	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (DMDM)	
Fetal Bovine Serum (FBS)	10%
Penicillin	100 unit/ ml
Streptomycin	100 µg/ ml

#### 肝機能誘導培地

上記の継代培養培地 1 mL に対して、Doxycycline 溶液を 0.1 µL 添加した。

#### Doxycycline 溶液

2 次蒸留水 1 ml に対して、Doxycycline hyclate (SIGMA-ALDRICH : D9891-1G) を 1 mg 溶  
解した。ミニザルトフィルター pore size 0.20 µm ( AS ONE : 16534K ) を用い濾過した。

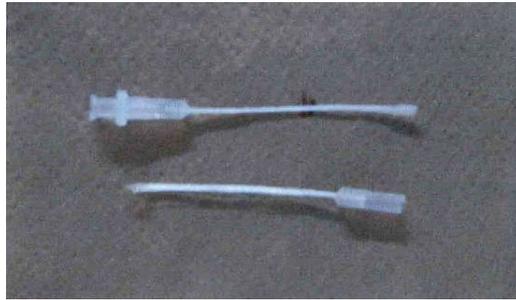
### 3.2.2 培養方法

#### Hepa/8F5 細胞の継代培養

本実験に必要な細胞数を獲得するために、Hepa/8F5 細胞の継代培養を行った。継代はタ  
イプ I コラーゲンをコートしたディッシュを用いた単層培養にて行った。

#### 中空糸培養法

セルローストリアセテート (CTA) 製の血漿分離用中空糸 (東洋紡績) を用いて中空糸 6  
本×3 cm からなるバンドを作製した。使用した中空糸は内径 : 285 µm、膜厚 : 50 µm、膜  
径 : 0.2 µm である。この中空糸 6 本を束ね、中空糸バンドルを作製した。中空糸長さは 5  
cm であり、細胞播種用にメスルアーを備えている (Fig. 3-1)。

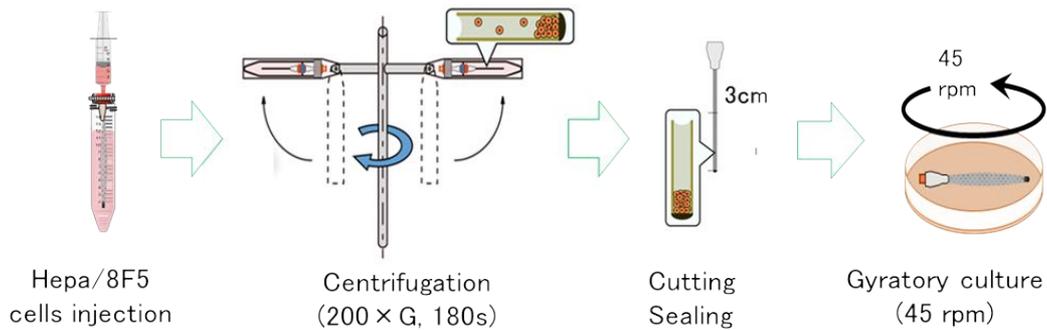


**Fig. 3-1 The hollow fiber bundle**

作製した中空糸バンドルは、70%エタノールにて親水化処理後、オートクレーブ滅菌を行った。その後、中空糸内部を DMEM にて置換し、培養に使用した。

細胞播種方法 (Fig. 3-2)

1 mL シリンジが接続可能な自作の播種装置に中空糸バンドルを接続した。所定の密度の Hepa/8F5 細胞懸濁液を調製後、1 mL の懸濁液をバンドル内に注入した。その後遠心機にて遠心力( $200 \times g$ , 3 min)を付加した。遠心力付加後に中空糸バンドルを後端から 3 cm の部分で切断し、端部を封止後、培養ディッシュ内に収めた。培養は 45 rpm にて旋回培養を行った。



**Fig. 3-2 Method for cell inoculation inside hollow fibers**

## 実験条件

中空糸培養において Hepa/8F5 細胞が高機能を発現する培養条件を調査するために、以下の条件で検討を行った。

① Hepa/8F5 細胞の肝機能を誘導しない系では、中空糸バンドルあたり  $1.0 \times 10^6$  cells を播種した。

② Hepa/8F5 細胞の肝機能を誘導する系では、バンドルあたり  $1.0 \times 10^6$ 、 $3.0 \times 10^6$  cells を播種した。

また、肝機能を誘導する系では、培養 1 日目から Dox を培地中に添加し、5 日間培養を行った。

## 3.2.3 評価方法

### 細胞数計測

中空糸内部の細胞の核数を計測した。核数計測には NucleoCounter™ (Chemometric), NucleoCasset™ (Chemometric : 941-0002) を用いた。

### 肝機能評価 (アンモニア除去能)

アンモニアは、劇症肝炎の主な死因となっている肝性昏睡を引き起こす原因物質の一つであり、肝不全時に急激に上昇するアンモニアを代謝し、正常な濃度を維持することは人工肝臓にとって重要な役割の一つである。また、肝細胞のアンモニア解毒反応は応答が早く、数時間という短時間の体外循環中の人工肝臓機能の指標としても有効である。

アンモニア除去能を評価するために、培養培地中 1 mM となるようアンモニアを添加し、その後、6 時間目及び 24 時間目までの除去量を測定し評価した。測定には、市販のアンモニアテストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いた。

### 肝機能評価 (アルブミン分泌能)

アンモニア除去能に加えて、たんぱく質合成能の評価としてアルブミン分泌能を調査した。アルブミンは、肝臓で生産され、血中に最も多く含まれるたんぱく質である。アルブミンは、浸透圧の調整・物質の輸送などの役割を持つ。新鮮培地に交換後 24 時間でのアルブミン分泌量を評価した。アルブミン濃度の測定には、ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 法を用いた。

### 3.3 実験結果

中空糸培養法を Hepa/8F5 細胞に適用し、肝機能誘導の検討を行った。実験結果を以下に示す。

#### 3.3.1 細胞数変化

中空糸内部における Hepa/8F5 細胞の細胞数変化と中空糸単位体積当たりの細胞密度変化を Fig.3-3 及び Fig.3-4 に示す。Dox を添加していない系では、培養経過とともに中空糸内で細胞増殖が示された。この結果、培養 5 日目までに細胞数は約 3 倍となった。一方、培養 1 日目に Dox を添加した系では、播種細胞数に関わらず、細胞増殖は抑制された。この結果、中空糸培養においても Hepa/8F5 細胞は旺盛な増殖能を示すが、Dox に応答することにより、その増殖能が抑制されることが示された。

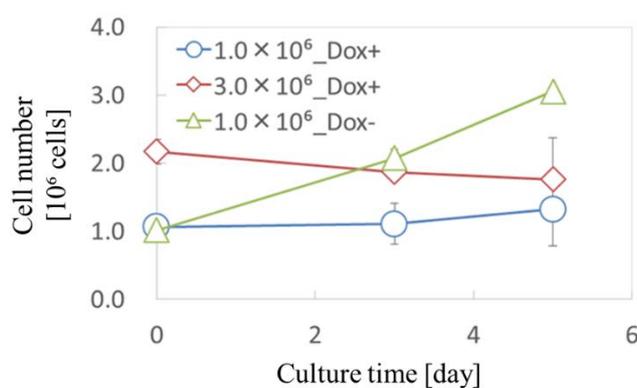


Fig. 3-3 Changes in cell number of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

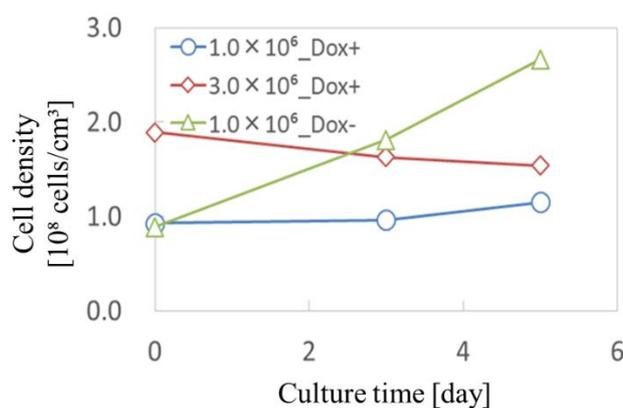


Fig. 3-4 Changes in cell density inside hollow fibers

### 3.3.2 肝機能評価

#### アンモニア除去能

Dox を添加し、肝機能を誘導した系において、アンモニア除去能を評価した。培養 3 日目以降の細胞数当たりのアンモニア除去能と中空糸単位体積当たりのアンモニア除去能を Fig.3-5 及び Fig.3-6 に示す。3.0×10<sup>6</sup> cells 播種した系では、培養 3 日目に 0.52 μmol/10<sup>6</sup> cells/day、25.60 μmol/cm<sup>3</sup>/day のアンモニア除去速度を示した。しかしながら、この時のアンモニア除去速度は、単層培養時(2.19 μmol/10<sup>6</sup> cells/day)やマウス初代肝細胞を中空糸内で培養した場合(1.48 μmol/10<sup>6</sup> cells/day, 128.55 μmol/cm<sup>3</sup>/day)より低く十分な機能発現とはいええず、培養 5 日目にはアンモニア除去能の低下が示された。また、1.0×10<sup>6</sup> cells 播種した系では、培養期間を通じアンモニア除去能の発現は認められなかった。

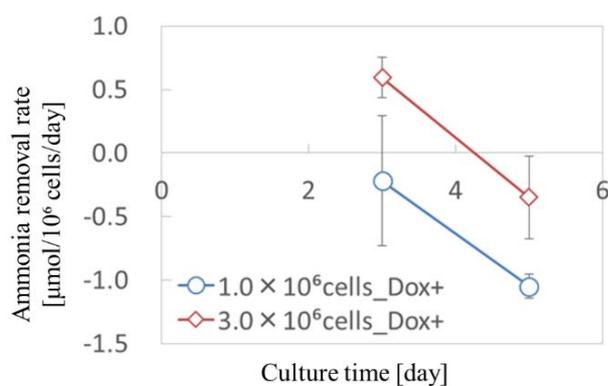


Fig. 3-5 Ammonia removal rates of Hepa/8F5 cells normalized by unit cell number

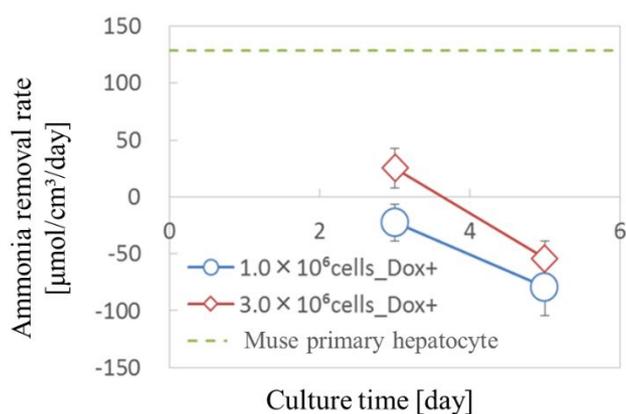


Fig. 3-6 Ammonia removal rates of Hepa/8F5 cells normalized by unit volume of hollow fibers

### 3.3.3 考察

本項目では、培養 1 日目から Dox 添加による肝機能誘導を行い、Hepa/8F5 細胞のアンモニア除去能について調査した。今回の検討では、中空糸バンドルあたり  $1.0 \times 10^6$ 、 $3.0 \times 10^6$  cells の 2 条件で播種し、培養を行った。

まず細胞増殖について、中空糸内の Hepa/8F5 細胞は単層培養と同様、Dox 添加にตอบสนองし、細胞増殖の抑制が確認された。一方で、重要な肝機能の指標であるアンモニア除去能では、 $3.0 \times 10^6$  cells の系において 3 日目に機能発現が認められた ( $0.52 \mu\text{mol}/10^6$  cells/day,  $25.60 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ )。一方、その機能発現レベルはマウス初代肝細胞 ( $1.48 \mu\text{mol}/10^6$  cells/day,  $128.55 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ ) と比較すると、著しく低いレベルであった。また、 $1.0 \times 10^6$  cells の系では、培養期間を通してアンモニア除去能の発現が確認されなかった。

この原因として、まず中空糸内での三次元培養であり、中空糸膜を介していることから Dox の添加量の不足が考えられたが、両培養系で細胞増殖の抑制が確認されており、この原因は考えにくい。そこで、別の可能性として、Dox の添加前後におけるエネルギー代謝の変化とそれに伴う酸素要求性の増大が考えられた。

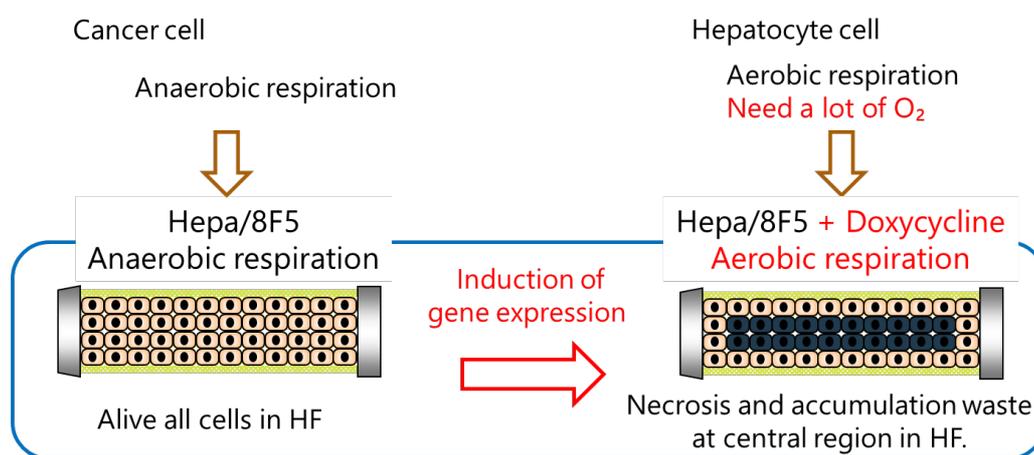
一般的ながん細胞の特徴として、好气的環境下においても嫌気呼吸を行うことが知られている<sup>102</sup>。Hepa/8F5 細胞もがん由来の細胞株であるため、通常の培養条件下では嫌气的呼吸を行うことでエネルギーを獲得していると考えられる。しかし、Dox を添加し肝機能誘導を行った状態での代謝経路は不明である。そのため、Dox 添加により Hepa/8F5 細胞内で嫌气的呼吸から好气的呼吸に切り替わり、Dox 添加前より大量の酸素を要求している可能性が考えられた (Fig.3-7)。また、一般に生体内の細胞は毛細血管から  $200 \mu\text{m}$  以内に存在しているとされ、 $200 \mu\text{m}$  を超えると酸素不足により細胞が壊死してしまうことが報告されている<sup>103</sup>。本検討で用いた中空糸の内径は  $285 \mu\text{m}$  である。このため、酸素が中空糸中心部の細胞まで浸透せず、細胞の壊死や老廃物の蓄積が起り、培養環境が著しく悪化している可能性が考えられた。実際に、同中空糸内で Hepa/8F5 細胞に Dox を添加すると、培養経過に伴い低酸素誘導因子である HIF-1 $\alpha$  が誘導されることが確認されている (Fig. 3-8)<sup>104</sup>。

加えて、HIF-1 $\alpha$  の発現は細胞に多大な影響を与えていることが現在までに知られている。具体的には、hepatoma のアポトーシスを防ぎ、増殖を促進すること<sup>105</sup>、また、エネルギー代謝に関与する遺伝子の発現をも制御も行っており、低酸素により解凍系の酵素の mRNA が上昇し、逆に糖新生や呼吸鎖などに関するタンパク質の mRNA レベルは低下することが確認されている<sup>106</sup>。さらに、膵島  $\beta$  細胞ではあるが、HIF が HNF-4 $\alpha$  の発現を減少させることが明らかとなっている<sup>107</sup>。HNF-4 $\alpha$  は尿素サイクル中のオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼの制御を司っており、アンモニアから尿素への合成に重要な役割を担っている<sup>108</sup>。加えて、生体内肝臓では、酸素濃度が豊富な領域で尿素合成が行われていることも明らかになっている。以上のことから、低酸素誘導因子である HIF-1 $\alpha$  の発現

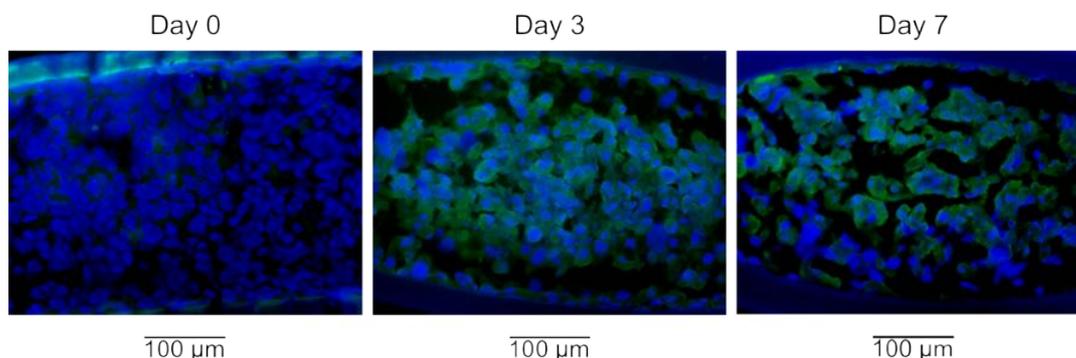
が、Hepa/8F5 細胞の肝機能発現、特にアンモニア除去能に大きく関与していることが推察された。

これらを踏まえると、1)Dox 添加による肝成熟化(肝機能発現)が促進される。2)がん細胞から成熟肝細胞へと形質が変化し、嫌気代謝から好気代謝へとスイッチする。3)好気代謝へのスイッチにより酸素要求量が増大するが、中空糸内の細胞層の厚みが大きく、要求される酸素が供給されないため HIF-1 $\alpha$  の発現が増す。4)発現した HIF-1 $\alpha$  の働きにより、代謝経路のスイッチングの抑制・HNF-4 $\alpha$  の発現が低下し、結果として肝機能発現、特にアンモニア除去能が制限された。以上が Hepa/8F5 細胞の肝機能発現が達成されなかった原因として考えられた。従って、HIF-1 $\alpha$  の発現を防ぐことが出来れば、円滑な好気代謝へのスイッチに繋がり、肝機能が発現されることが予想された。

そこで、次章では、Hepa/8F5 細胞の呼吸代謝に着目し、酸素不足による中空糸内部の HIF-1 $\alpha$  の発現を防ぐため、高酸素分圧下での検討を行った。



**Fig. 3-7 Schematic illustration of the environmental changes of Hepa/8F5 cells inside the hollow fiber**



**Fig. 3-8 Expression of HIF-1 $\alpha$ (green) of Hepa/8F5 cells inside hollow fibers after adding Dox. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue) <sup>104</sup>**

### 3.4 本章のまとめ

本章では、中空糸培養法において、Hepa/8F5 細胞が高い肝機能を発現する培養条件の検討を行った。得られた結果を以下に記す。

- 中空糸内部空間を利用した Hepa/8F5 細胞の培養を行った。
- 作製した中空糸バンドルに  $1.0 \times 10^6$  cells/bundle、 $3.0 \times 10^6$  cells/bundle の 2 条件で細胞播種を行い、培養 1 日目から Dox を添加した結果、細胞は両条件で増殖を停止した。
- 肝機能の指標の一つであるアンモニア除去能の測定を行ったが、機能発現はほとんど見られなかった。
- アンモニア除去能が発現しなかった理由として、Dox 添加による Hepa/8F5 細胞の肝転写因子誘導を基とした呼吸代謝の変化と、これに起因した中空糸内部の酸素枯渇の可能性が考えられた。

## 第4章 高酸素分圧下における Hepa/8F5 細胞の中空糸培養

### 4.1 本章の目的

第3章の検討より、中空糸培養法では Hepa/8F5 細胞の肝機能が誘導されないことが示された。原因として、Dox 添加による Hepa/8F5 細胞の代謝経路のスイッチが考えられた。好気代謝へと移行した結果、中空糸の中心部に存在する Hepa/8F5 細胞に必要な量の酸素が供給されず、低酸素誘導因子である HIF-1 $\alpha$  が発現し、肝機能発現が抑制されたことが考えられた。

そこで本章では、中空糸内部の酸素枯渇を防ぐため、Dox 添加と同時に酸素分圧 70%条件下で Hepa/8F5 細胞の培養を行い、酸素分圧が肝特異的機能発現に与える影響について検討した。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 本研究で使用した試薬

本章で使用した試薬については第3章と同様とした。

### 4.2.2 中空糸バンドルの作製

本章での中空糸バンドル作製については第3章と同様とした。

### 4.2.3 実験条件

3 cm の中空糸 6 本から成る中空糸バンドルに対して、 $1.0 \times 10^6$  cells の Hepa/8F5 細胞を播種した。その後、培養 5 日目までは通常条件で培養を行い、培養 5 日目から Dox を添加し、肝機能誘導を促した。また、これと同時に中空糸バンドルを酸素分圧 70% 条件下のインキュベーターに移し、酸素分圧 20% 条件下(通常酸素分圧)での培養と比較した。細胞増殖の促進には細胞増殖用培地を、肝機能誘導には肝機能誘導培地をそれぞれ 3 mL 使用した。

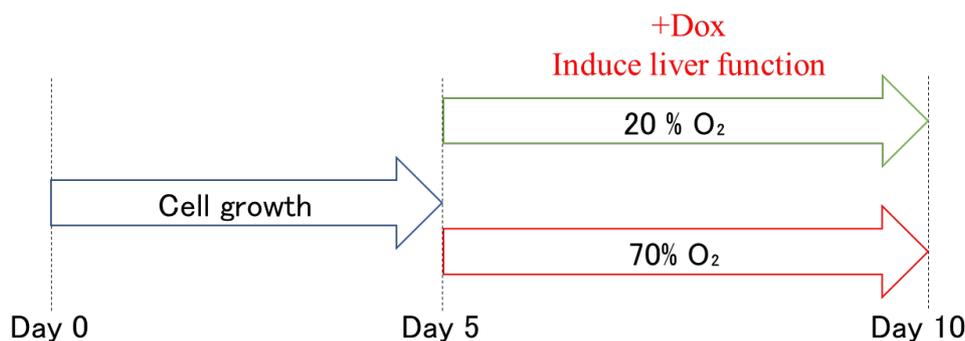


Fig.4-1 Experimental condition

### 4.2.4 評価方法

#### 細胞数計測

細胞数測定については第3章と同様とした。

#### 肝機能評価 (アンモニア除去能、アルブミン分泌能)

肝機能評価については第3章と同様とした。

#### ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

培養終了後の中空糸バンドルを回収し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で細胞を固定した。固定した中空糸をパラフィンで包埋し、薄切片を作製後 HE 染色を行った。

## グルコース測定

グルコースは、解糖系の初期においてアセチル CoA を生成し、その後の ATP 生産に欠かせない物質である。好气的条件では 1 mol のグルコースから 38 mol の ATP が生産され、嫌气的条件では 1 モルのグルコースから 2 モルの ATP が生産される。そのため、グルコースの消費量は代謝経路の重要な指標の一つとなっている。また、肝臓では必要に応じグルコースを産生し、血液中の血糖値を正常に保つ糖新生が行われており、肝機能の指標の一つともなり得る。加えて、がん細胞は好气的条件下であっても、嫌気代謝より ATP を産生することが知られている。

グルコースの消費量を評価するため、培養培地の 0 時間目から 24 時間目までのグルコースの減少量を測定した。測定には、市販のグルコース CII-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いた。

## 乳酸測定

乳酸は解糖系で生じたピルビン酸から生じる最終生成物の一つである。好气的代謝では、ピルビン酸からアセチル CoA が生成されるため、乳酸は生産されない。一方で、嫌气的条件下では、ピルビン酸から乳酸が生じ細胞外へと排出される。このため、乳酸の生成は嫌气的条件下での細胞培養の指標となる。

乳酸の生成量を評価するため、培養培地の 0 時間目から 24 時間目までの乳酸の増加量を測定した。測定には、市販のグダタミナーLA(協和メデックス株式会社)を用いた。

### 4.3 実験結果

#### 4.3.1 細胞数及び細胞密度変化

培養過程における細胞数変化と細胞密度変化を Fig.4-2 と Fig.4-3 に示す。培養 5 日目まで Hepa/8F5 細胞は旺盛な細胞増殖を示した。培養 5 日目より Dox を添加し、肝機能誘導を促した。通常酸素分圧下及び高酸素分圧下の両系で細胞数の減少が見られたが、特に高酸素分圧下において著しく細胞数が減少した。

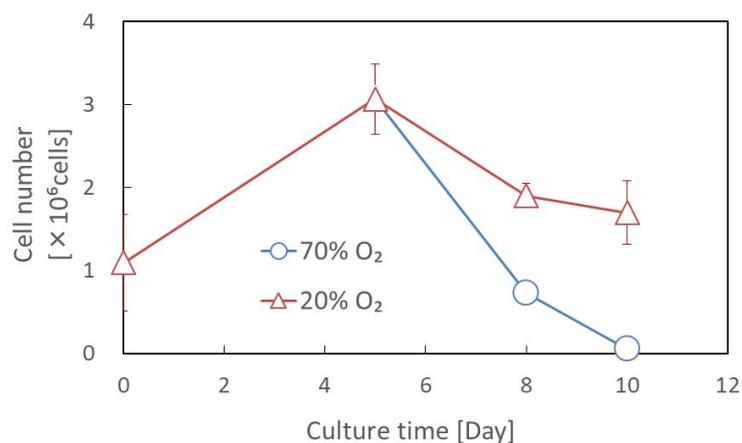


Fig.4-2 Changes in cell number of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

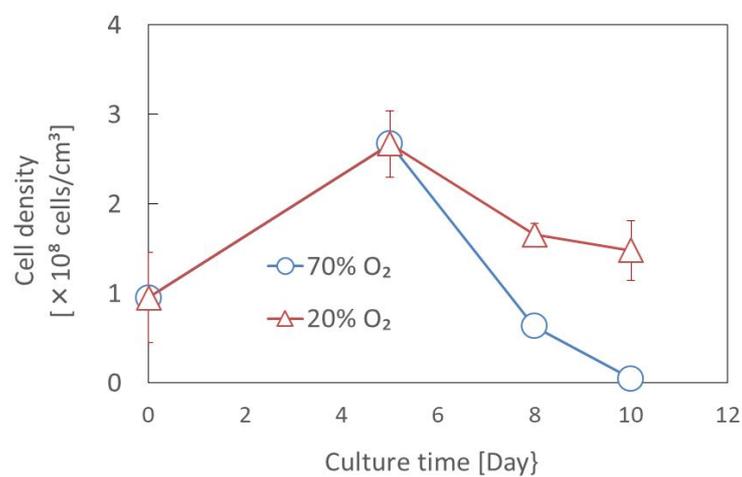
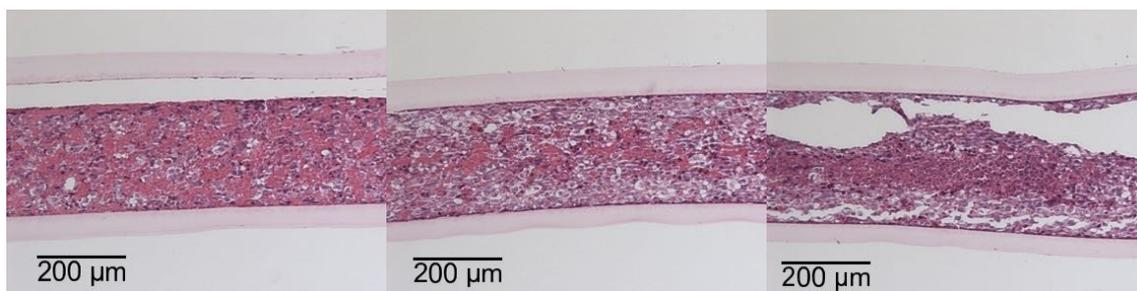


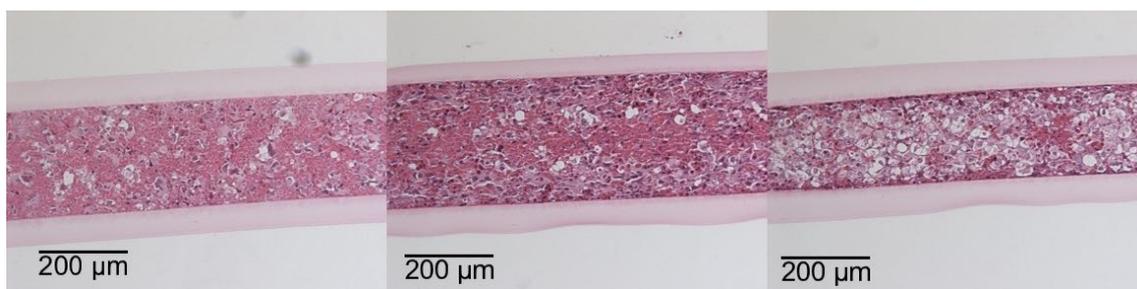
Fig.4-3 Changes in cell density of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

### 4.3.2 HE 染色

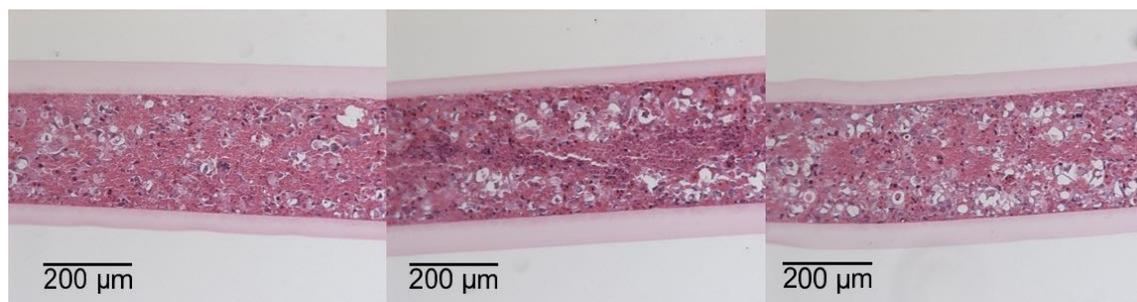
中空糸内部の細胞状態を観察するため HE 染色を行った。その結果を Fig.4-4 ~ Fig.4-8 に示す。培養 5 日目では中空糸内全体に核が存在していることが確認された。その後、通常条件下では徐々に核の減少が見られた。一方で、酸素分圧 70%条件下では著しい核の減少が確認された。HE 染色を行った結果、細胞数計測との相関がみられた。



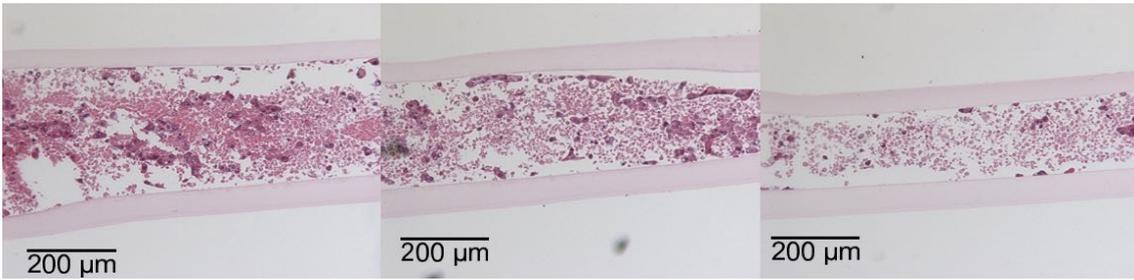
**Fig.4-4 Cross-section of hollow fiber (20% O<sub>2</sub>, Day 5). Cells were stained by H&E staining**



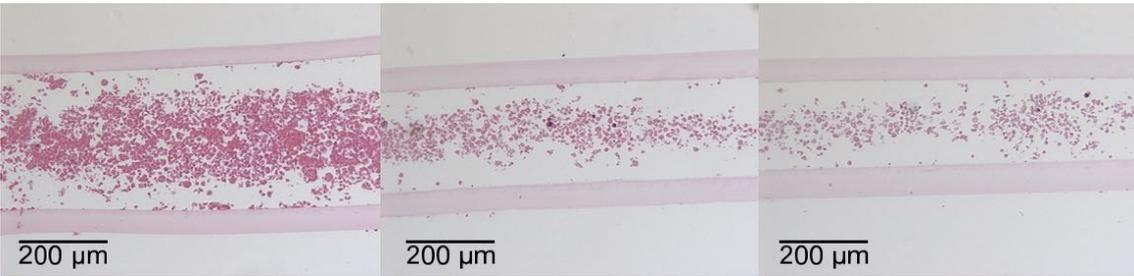
**Fig.4-5 Cross-section of hollow fiber (20% O<sub>2</sub>, Day 8). Cells were stained by H&E staining**



**Fig.4-6 Cross-section of hollow fiber (20% O<sub>2</sub>, Day 10). Cells were stained by H&E staining**



**Fig.4-7 Cross-section of hollow fiber (70% O<sub>2</sub>, Day 8). Cells were stained by H&E staining**



**Fig.4-8 Cross-section of hollow fiber (70% O<sub>2</sub>, Day 10). Cells were stained by H&E staining**

### 4.3.3 肝機能評価

#### アンモニア除去能

単位細胞数あたりのアンモニア除去速度と単位体積あたりのアンモニア除去速度を Fig.4-9 及び Fig.4-10 に示す。通常酸素分圧下では、アンモニア除去能の発現は認められなかった。一方で、高酸素分圧下では、非常に高いアンモニア除去能を示した。単位細胞あたりでは培養 8, 10 日目でそれぞれ 1.15, 24.23  $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$  とマウス初代肝細胞以上のレベルを示し、単位体積当たりにおいても培養 8 日目で 73.72  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ 、培養 10 日目で 119.54  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$  とマウス初代肝細胞とほぼ同等の発現レベルを示した。

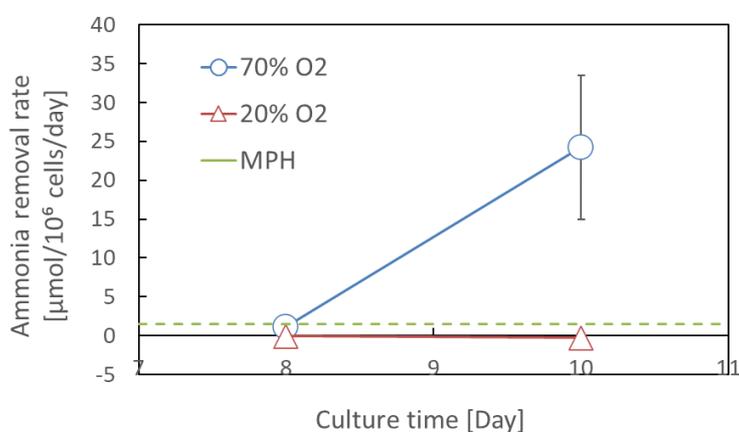


Fig.4-9 Ammonia removal rates of Hepa/8F5 cells normalized by unit cell number

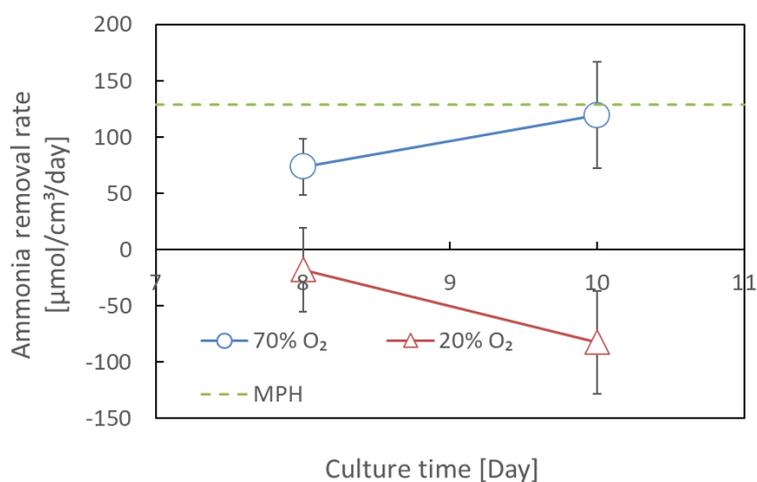


Fig.4-10 Ammonia removal rates of Hepa/8F5 cells normalized by unit volume of hollow fibers

## アルブミン分泌能

単位細胞数あたりのアルブミン分泌能と単位体積あたりのアルブミン分泌能を Fig.4-11 及び Fig.4-12 に示す。通常酸素分圧下・高酸素分圧下の両系で高いアルブミン分泌能が確認された。また、細胞あたりのアルブミン分泌能は通常酸素分圧下で培養 8 日目で  $12.14 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells}/\text{day}$ 、培養 10 日目で  $10.94 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells}/\text{day}$  を示し、高酸素分圧下の培養 8 日目 ( $8.92 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ )、培養 10 日目 ( $7.02 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ ) よりも高いレベルを示した。

単位体積あたりでのアルブミン分泌能も通常酸素分圧下で培養 8 日目で  $969.20 \mu\text{g}/\text{cm}^3/\text{day}$ 、培養 10 日目で  $10.94 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$  とマウス初代肝細胞以上の機能レベルを示した。一方で酸素分圧 70% 条件下では培養 8 日目で  $607.21 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$  とマウス初代肝細胞と同レベルであったが、培養 10 日目は  $36.28 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$  と機能レベルが低下した。

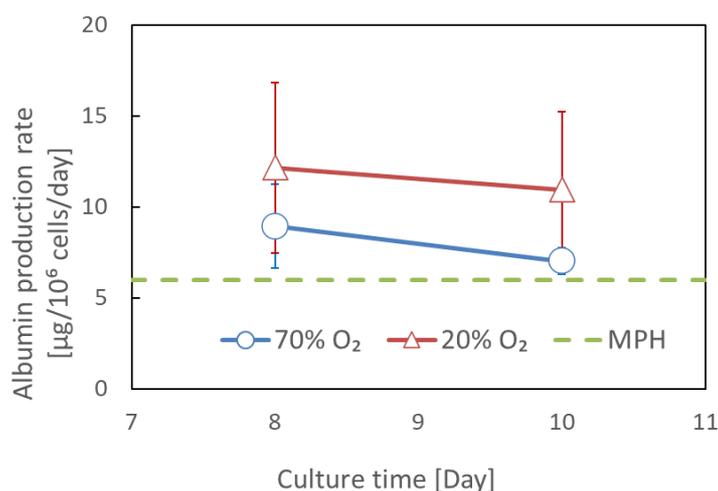


Fig.4-11 Albumin secretion rates of Hepa/8F5 cells normalized by unit cell number

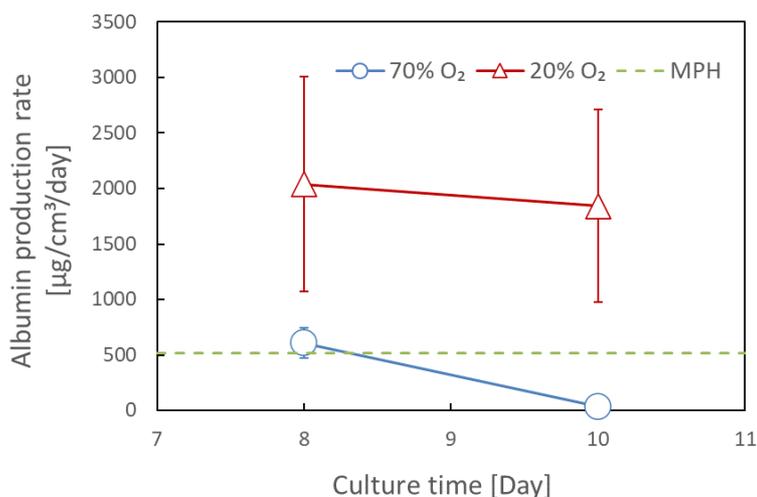


Fig.4-12 Albumin secretion rates of Hepa/8F5 cells normalized by unit volume of hollow fibers

### グルコース消費速度

単位細胞数あたりのグルコース消費速度を Fig.4-13 に示す。通常酸素分圧下では、培養 8 日目で  $0.97 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ 、培養 10 日目で  $1.41 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$  のグルコース消費速度を示した。高酸素分圧下では、培養 8 日目で  $6.63 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$  と通常酸素分圧下での培養よりも多くグルコースを消費していたが、培養 10 日目では  $-42.07 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$  とグルコース産生に転じ、肝細胞の機能の一つである糖新生が示された。

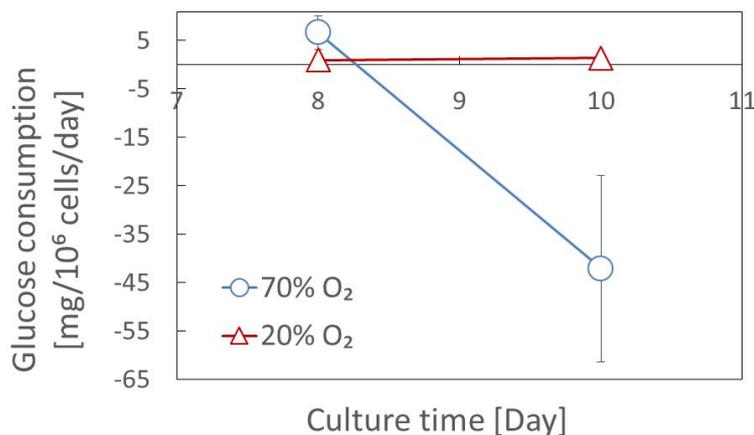


Fig.4-13 Changes in glucose consumption rate of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

### 乳酸生成速度

単位細胞数あたりの乳酸生成速度を Fig.4-14 に示す。通常酸素分圧下では、培養 8 日目で  $1.87 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ 、培養 10 日目で  $1.33 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$  の乳酸生成を示した。一方で、高酸素分圧下では、培養 8 日目では通常酸素分圧下より多くの乳酸を生産したが ( $1.87 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ )、培養 10 日目では乳酸の生成はほとんど確認されなかった ( $-0.51 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ )。

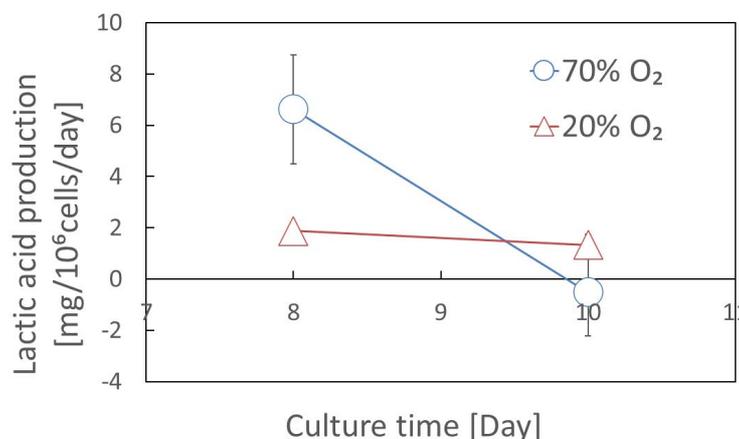


Fig.4-14 Changes in lactic acid production rate of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

#### 4.3.4 考察

前章より、Hepa/8F5 細胞の肝機能誘導後に、中空糸内中心部で酸素枯渇が生じている可能性が示唆された。そこで本章では酸素枯渇の防止を目的とし、培養培地中への Dox 添加による肝機能誘導と同時に酸素分圧 70%条件下での培養を行った。

培養 5 日目まで Hepa/8F5 細胞は旺盛な細胞増殖を見せた。培養 5 日目より Dox を添加し、肝機能誘導を促した結果、両酸素分圧条件下で細胞数の減少が見られた。通常酸素分圧下では、Hepa/8F5 細胞は緩やかに減少し、HE 染色からも核の減少が確認された。この細胞減少は、中空糸中心部の酸素枯渇や乳酸の蓄積による培養環境悪化に起因する細胞死だと考えられる。一方で、高酸素分圧下での培養では著しく細胞が減少した。HE 染色の結果からも中空糸内部全体で細胞が減少し、細胞密度が非常に低くなっていた。高酸素分圧下での培養により、細胞から生じた反応性の高い活性酸素が細胞障害を引き起こした可能性が示唆された。

次に肝特異的機能を評価したが、通常酸素分圧下では Hepa/8F5 細胞のアンモニア除去能は発現せず、アルブミン分泌能のみ発現した。高酸素分圧下の条件では、アンモニア除去能・アルブミン分泌能共にマウス初代肝細胞以上の機能レベルを示した。この結果は、Hepa/8F5 細胞のアンモニア除去能の発現には酸素供給が必要不可欠であることを示している。逆にアルブミン分泌に関しては、酸素分圧に関わらずマウス初代肝細胞以上のレベルを示した。これは、Hepa/8F5 細胞が元々高いアルブミン分泌能を持っているためである。Hepa/8F5 細胞は単層培養条件下で Dox を添加せずともアルブミン分泌能を発現する。各培養条件下での肝特異的機能の比較を Table 4-1 に示した。

続いて、Hepa/8F5 細胞呼吸代謝について調査した。通常酸素分圧下では、Dox 添加後においてもグルコース消費量・乳酸生産量共に day 8 から day 10 にかけても大きな変化は見られなかった。これは、Hepa/8F5 細胞が肝機能誘導されたにも関わらず、がん細胞の特徴である嫌気代謝を維持しており、好気代謝への切り替えが進んでいないことを示唆している。この結果より、通常酸素分圧下では好気代謝へと切り替わりが行われず、肝機能発現に必要な ATP を得られず、乳酸アシドーシスなどによる培養環境の悪化も重なった結果、肝機能の誘導が達成されなかったと考えられる。

一方で、高酸素分圧培養下での Hepa/8F5 細胞は、day 8 では通常酸素分圧下以上のグルコース消費及び乳酸生産を示したが、day 10 ではグルコース消費がマイナスに転じ肝特異的機能のひとつである糖新生が発現し、同時に乳酸生成の減少を確認した。これらの結果は、高酸素分圧下での肝機能誘導により好気代謝への切り替わりが進行し、day 10 には好気代謝への切り替わりが完了したことが示されている。Day 8 において、通常酸素分圧下と比較し高酸素分圧下の系でより多くのグルコース消費量及び乳酸生産量を示した原因については以下が可能性として挙げられる。高酸素分圧下での培養により細胞が減少し、肥大化(肝機能化)のための空間が確保される。Hepa/8F5 細胞が肥大化(肝機能化)するため、大量の ATP が必要となりグルコース消費量と乳酸生産が増大する。そのため、肥大化(肝

機能化)があまり進まない通常酸素分圧下での培養と比べ、day 8 の時点では高酸素分圧下でより多くのグルコース消費と乳酸生産が起こったと考えられる。

これらの結果より、十分な酸素供給が満たされれば、Hepa/8F5 細胞がバイオ人工肝臓の細胞源としての十分な肝機能を保持していることが示された。酸素供給と肝機能発現の関係については、現在までに多くの研究が報告されている。初代肝細胞においては、十分な酸素供給が ATP 生産を促進し、肝機能レベルを上昇させることが示されている<sup>108, 109</sup>。また、腫瘍由来の肝がん細胞においても、酸素の供給により嫌気代謝から好気代謝へと移行し、肝機能レベルも約 10 倍にまで上昇することが報告されている<sup>109</sup>。これらのことから、肝細胞の機能発現と酸素供給は密接な関係があることは明らかである。

本章の検討より、Hepa/8F5 細胞の高肝機能化には、酸素供給が不可欠であり、それに伴う好気代謝への移行が重要であることが明確となった。また、培養条件の最適化により、Hepa/8F5 細胞がマウス初代肝細胞と同等の機能を発現可能であることが示された。一方で、高酸素環境下での細胞培養は活性酸素種発生のリスクを伴う。本検討においても、活性酸素種が原因と思われる著しい細胞減少が確認されている。仮にバイオ人工肝臓を高酸素分圧下で運用を行ったとすると、患者の体内に Hepa/8F5 細胞より発生した活性酸素種が大量に流入することとなる。これは、患者の細胞を著しく傷つける可能性があり、バイオ人工肝臓の運用法として現実的ではない。そのため、酸素分圧を高める以外の手法で Hepa/8F5 細胞に十分な酸素を供給する手法の確立が必要である。そこで第 5 章ではこの手法の確立を目指し、検討を行った。

**Table 4-1 Comparison of liver-specific functions of Hepa/8F5 cells in different culture conditions.**

Culture	Ammonia removal rate ( $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ )	Albumin production rate ( $\mu\text{g}/10^6 \text{ cells/day}$ )
Mono culture, Dox-	$-0.12 \pm 0.01$	$5.9 \pm 2.4$
Mono culture, Dox+	$2.1 \pm 0.32$	$19.3 \pm 3.8$
Mouse primary hepatocyte, HF/organoid culture,	1.48	5.96

#### 4.4 本章のまとめ

本章では、高酸素雰囲気が中空糸培養下での Hepa/8F5 細胞の肝機能発現に与える影響について検討した。得られた結果を以下に記す。

- ・ 高酸素分圧下での培養により、初代マウス肝細胞以上のアンモニア除去能の発現を示し、Hepa/8F5 細胞がバイオ人工肝臓の細胞源としてのポテンシャルを保持していることを示した。また、アンモニア除去能・アルブミン分泌能だけでなく、糖新生の発現と乳酸産生の減少を示し、好気代謝へと移行していることが示唆された。これらの結果より、Hepa/8F5 細胞の高肝機能発現には酸素の供給が不可欠であることが明らかとなった。
- ・ 一方で、高酸素分圧下での培養は活性酸素種の発生が懸念され、実際に活性酸素種の影響と思われる著しい細胞減少が認められた。今後、装置へのスケールアップと臨床応用を考えると活性酸素のリスクは非常に高く、酸素分圧を高める以外での酸素供給法の確立が必要である。

## 第5章 中空糸を用いた Hepa/8F5 細胞の至適培養条件 の設計

### 5.1 本章の目的

前章では、高酸素分圧下で Hepa/8F5 細胞の中空糸培養を行い、マウス初代肝細胞と同等レベルの肝機能発現を達成した。このことから、Hepa/8F5 細胞の酸素要求を満たせば、バイオ人工肝臓の細胞源として利用可能なポテンシャルを有していることを示した。しかしながら、高酸素分圧下でのバイオ人工肝臓装置の運用は活性酸素発生リスクを伴い困難である。そのため、酸素分圧を高める以外の方法で、中空糸内部の Hepa/8F5 細胞に酸素を供給する必要がある。

そこで、本章では3章で用いた中空糸(内径 285  $\mu\text{m}$ 、セルローストリアセテート製)より内径の小さい中空糸(内径約 145  $\mu\text{m}$ 、ナイロン製)を使用し、中空糸内部まで酸素を供給しやすくすることで、Hepa/8F5 細胞の肝機能発現を目指した。また、中空糸内部での細胞密度変化にも着目し検討を行った。具体的には、①肝機能誘導のタイミングに関する検討、②中空糸内部への細胞の播種方法に関する検討を実施した。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 本研究で使用した試薬

本章で使用した試薬については第3章と同様とした。

### 5.2.2 中空糸バンドル

中空糸は、ナイロン製の外径 240  $\mu\text{m}$ 、内径 140  $\mu\text{m}$  の小口径中空糸（ユニチカ）を用いた。1.5 cm の中空糸 7 本からなる中空糸バンドルを作製し、以後の操作は第3章と同様とした。

### 5.2.3 実験条件

中空糸培養において Hepa/8F5 細胞が高機能を発現する培養条件を調査するために、2 つの検討を行った。各実験の詳細な条件については後述する。

1.5 cm の小口径中空糸 7 本から成る中空糸バンドル（培養体積 0.00162  $\text{cm}^3$ ）に対して、 $1.0 \times 10^5$ 、 $3.0 \times 10^5$  cells の Hepa/8F5 細胞を播種し培養を行った。細胞増殖の促進には細胞増殖用培地を、肝機能誘導には肝機能誘導培地をそれぞれ 1 mL 使用した。

### 5.2.4 評価方法

#### 細胞数計測

細胞数測定については第3章と同様とした。

#### 肝機能評価（アンモニア除去能、アルブミン分泌能）

肝機能評価については第3章と同様とした。

#### 免疫蛍光染色

遠心の有無による Hepa/8F5 細胞の中空糸内分布を観察するため、免疫蛍光染色により核を染色し、評価を行った。

Hepa/8F5 細胞を中空糸に播種後、中空糸を回収し、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)に包埋後、液体窒素により凍結した。凍結した中空糸を凍結マイクローム(Leica Microsystems)により切り出し、凍結切片を準備した。切片をスライドガラス上に乗せたのち、4 °C、10 min の条件でアセトン中に浸漬し、PBS で 5 回洗浄した。PBS を乾燥させた後、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、ブロッキング液(PBS containing 10% skimmed milk powder and 6% glycine)をサンプル上に滴下して室温で 20 分間ブロッキングした。その後、PBS を用い 5 回洗浄を行い、Hoechst 33342 (1:1000)を含んだブロッキング液に浸し、1 時間、室温でインキュベータした。サンプルは IX71 蛍光顕微鏡 (オリンパス) を使用し、観察した。

## 5.3 実験結果

### 5.3.1 肝機能誘導のタイミングに関する検討

本検討では、Dox 添加のタイミングに関する検討を行い、Hepa/8F5 細胞の肝機能発現のための最適な培養条件の探索を行った。

具体的には、Hepa/8F5 細胞を中空糸へ播種した直後に肝機能を誘導する系と 5 日間増殖用培地を用いて細胞を増殖させ、5 日目から肝機能誘導培地に切り替え肝機能発現を誘導する系との比較を行った(Fig. 5-1)。評価項目として、核数計測と肝機能発現（アンモニア除去能、アルブミン分泌能）の解析を行った

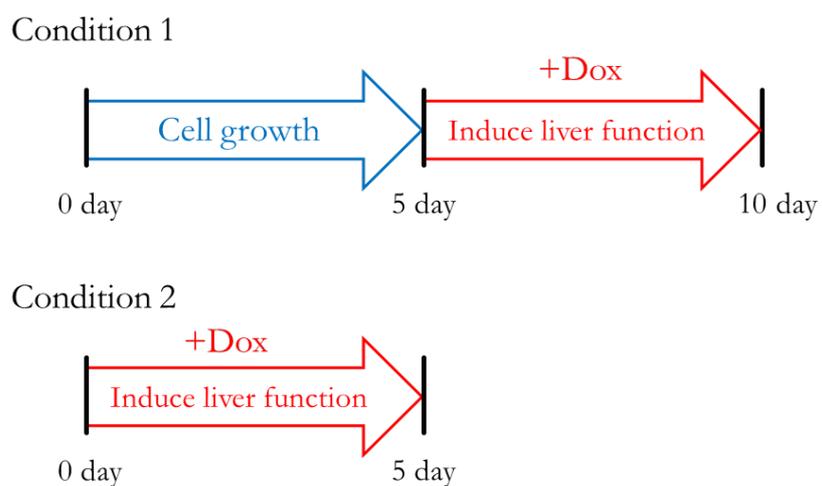


Fig. 5-1 Culture condition

### 5.3.2 細胞数及び細胞数密度，免疫蛍光染色による中空糸内観察

培養過程における細胞数変化と細胞密度変化を Fig.5-2 と Fig.5-3 に示す。培養 0 日目から Dox を添加し、肝機能を誘導した系では、培養 1 日目まで細胞が増殖したものの、その後は細胞増殖が停止し、細胞数は減少した。培養 5 日目から肝機能を誘導した系では、培養 5 日目まで旺盛な細胞増殖を示し、Dox 添加後に細胞増殖の停止が確認された。

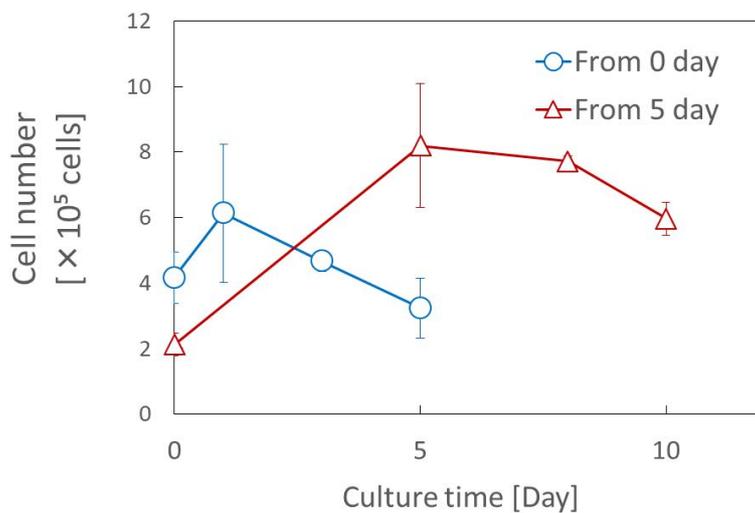


Fig. 5-2 Changes in cell number of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

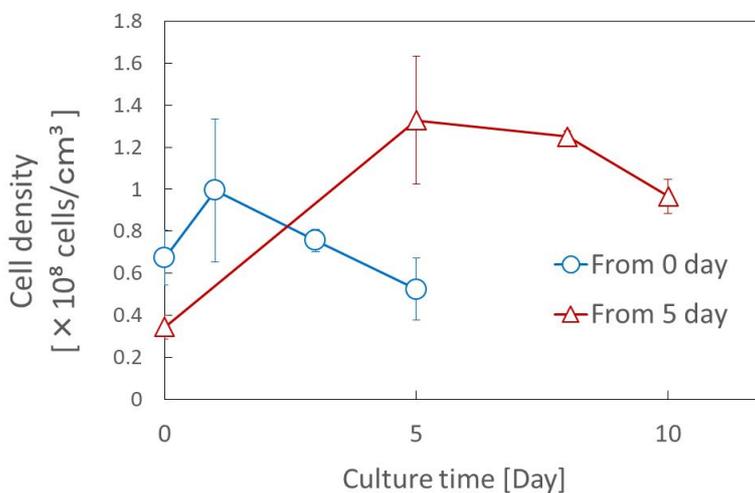
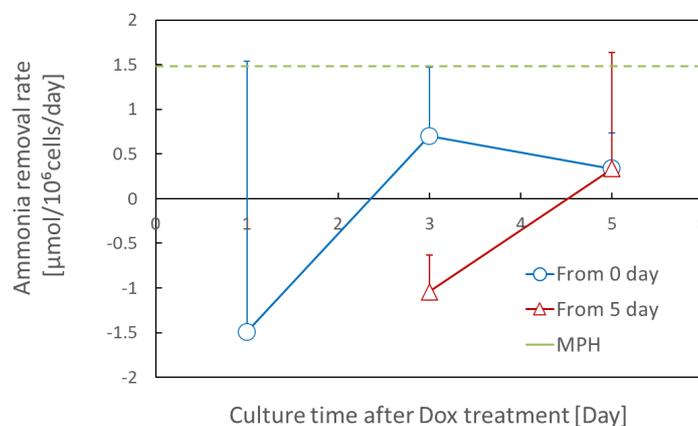


Fig. 5-3 Changes in cell density of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

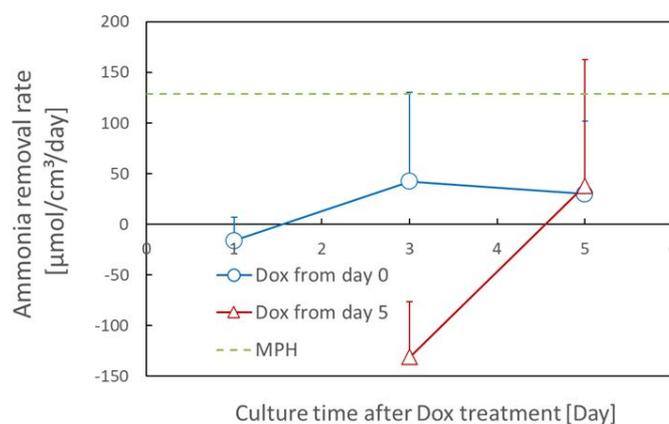
### 5.3.3 肝機能評価

#### アンモニア除去能

Dox 添加後の培養日数における単位細胞数あたりのアンモニア除去速度と単位体積あたりのアンモニア除去速度を Fig.5-4 及び Fig.5-5 に示す。培養 0 日目から Dox を添加し肝機能を誘導した系では、Dox 添加後 3 日目に最も高いアンモニア除去能を発現した(0.70  $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ , 42.08  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ )。しかし、マウス初代肝細胞のレベル(1.48  $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ , 128.55  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ )には達せず、機能発現が非常に不安定であった。培養 5 日目から肝機能を誘導した系では、Dox 添加後 5 日目に最も高いアンモニア除去能を示した(0.33  $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$ , 38.20  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ )。しかし、機能レベルは培養 0 日目から肝機能を誘導した系の培養 3 日目より低レベルであった。



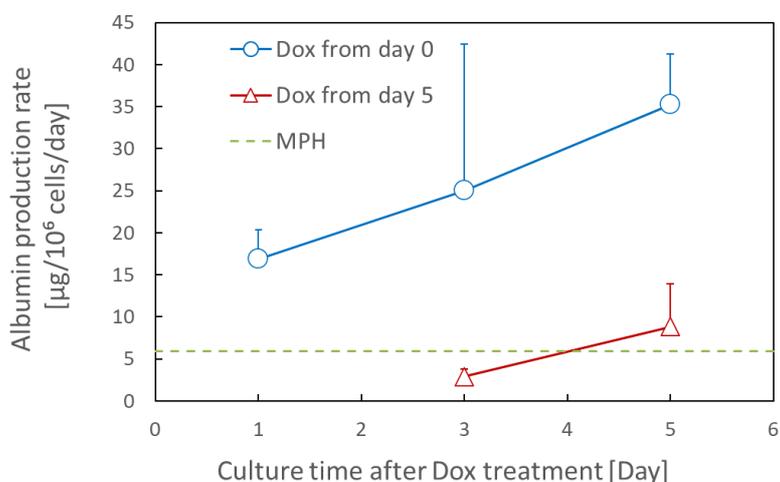
**Fig. 5-3 Comparison of the ammonia removal rate of Hepa/8F5 cells after adding doxycycline in different culture conditions (normalized by unit cell number)**



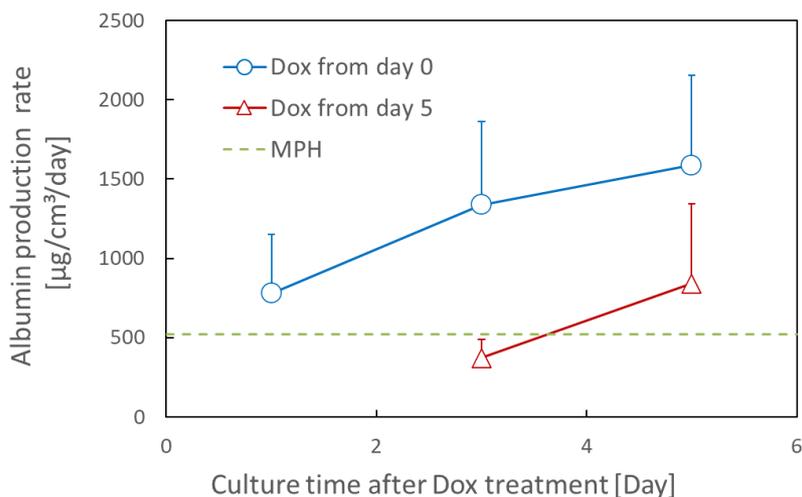
**Fig. 5-4 Comparison of the ammonia removal rate of Hepa/8F5 cells after adding doxycycline in different culture conditions (normalized by unit volume of hollow fibers)**

## アルブミン分泌能

Dox 添加後の培養日数における単位細胞数あたりのアルブミン分泌能と単位体積当たりのアルブミン分泌能を Fig.5-6 及び Fig.5-7 に示す。培養 0 日目から Dox を添加し肝機能を誘導した系、培養 5 日目から肝機能を誘導した系の両系で培養経過に伴いアルブミン分泌能の発現が高くなった。また、機能レベルは培養 0 日目から Dox を添加した系では、Dox 添加後 1 日目からマウス初代肝細胞(5.96  $\mu\text{mol}/10^6$  cells/day, 519.30  $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ )以上のレベルを示し、5 日目から Dox を添加した系では、Dox 添加後 5 日目でマウス初代肝細胞以上のアルブミン分泌能を示した。



**Fig. 5- Comparison of the albumin secretion rate of Hepa/8F5 cells after adding doxycycline in different culture conditions (normalized by unit cell number)**



**Fig. 5-7 Comparison of the albumin secretion rate of Hepa/8F5 cells after adding doxycycline in different culture conditions (normalized by unit volume of hollow fibers)**

### 5.3.4 考察

本節では、小口径中空糸である Nylon6(内径 140  $\mu\text{m}$ )の利用により、酸素供給の向上と肝機能発現を目指した。また、Dox の添加時期を最適化することにより、中空糸内での Hepa/8F5 細胞の肝機能向上を目指した。中空糸に Hepa/8F5 細胞を播種した直後に Dox を添加する系、中空糸内で 5 日間 Hepa/8F5 細胞を増殖させた後に Dox を添加する系で比較を行った。細胞数計測より、両系で細胞増殖の停止が確認された。0 日目から Dox を添加する系では、培養 1 日目まで細胞増殖が見られた後に増殖は停止した。これは、Dox が添加され肝転写因子が発現するまでのタイムラグによるものと考えられる。また、Dox 添加時の細胞密度の差は、約 2 倍であった。これらの結果の通り、小口径中空糸内でも Hepa/8F5 細胞は旺盛な増殖を示し、Dox 添加による増殖の抑制も見られた。

肝特異的機能レベルでは、アンモニア除去能・アルブミン分泌能共に 0 日目から肝機能を誘導した系で発現レベルが高くなった。アルブミン分泌能では、マウス初代肝細胞以上のレベルを示したものの、アンモニア除去能はマウス初代肝細胞の 1/3 程度であり、また、発現レベルが非常に不安定であった。培養 5 日目から肝機能を誘導した系では、Dox 添加後 5 日目にアンモニア除去能を発現したものの、マウス初代肝細胞と比較すると 1/5 程度の発現レベルであった。アルブミン分泌能においても、0 日目から肝機能誘導した系でその機能レベルは高くなった。これらの結果を踏まえ、5 日目から Dox を添加し肝機能を誘導する系において、3 章及び 4 章と比較すると、今回使用した小口径中空糸内での細胞密度が約  $1.0 \times 10^8 \text{ cells/cm}^3$  条件下(condition 1)でのアンモニア除去速度は  $38.20 \mu\text{mol/cm}^3/\text{day}$  であった。前章までの検討における同細胞密度条件下でのアンモニア除去速度は  $-76.53 \mu\text{mol/cm}^3/\text{day}$  (3 章)、 $-82.36 \mu\text{mol/cm}^3/\text{day}$  (4 章) であった。このことから今回使用した小口径中空糸は、マウス初代肝細胞のレベルには達しないものの、前章まで使用した中空糸よりも Hepa/8F5 細胞の中空糸培養に適していることが示された。

一方で、アンモニア除去能がマウス初代肝細胞のレベルまで達しない原因について、酸素供給だけでなく、中空糸内部での細胞密度が肝機能発現に大きな影響を与えていることが示唆された。この理由として、本検討ではいずれの細胞密度においても、培地量を 1 mL で統一しており、細胞密度が高い条件ほど細胞の中心部で栄養不足や老廃物の蓄積が生じたことが考えられる。細胞密度が小さい条件では、細胞-細胞間に隙間が生じたために培地が組織中心部まで十分に行き渡ることが可能となり、酸素や栄養、Dox 等の物質供給効率が向上したことが原因として挙げられる。これらの理由より、細胞密度が低い系でより高い肝機能が発現されたと考えられる。さらに、Dox 添加による Hepa/8F5 細胞の肝機能誘導は、同時に細胞のサイズ(体積)を変化させている可能性が大きい。従って中空糸内部という閉鎖空間で培養する場合、細胞密度が機能発現レベルに影響し、またその発現条件が不安定であった可能性が大きい。

以上より、安定的に高い肝機能発現を達成するためには中空糸内部での細胞密度の制御が重要であるとし、次節の検討を行った。

### 5.3.5 細胞の播種法に関する検討

前節の検討において、細胞密度が小さいほど細胞数あたりの肝機能が向上することが示唆された。しかし実際には、播種直後に遠心力を付加し細胞を中空糸の先端部分に充填しているため、先端部での細胞密度はいずれの条件においても同程度であると思われる。したがって本検討では、Hepa/8F5 細胞の肝機能発現に対する細胞密度の影響をより詳細に調査するために、播種直後の遠心充填を行わない検討を行った(Fig. 5-8)。播種細胞数は  $1.0 \times 10^5$  cell/bundle とし、播種直後から Dox を培地に添加した。培養は5日間行い、評価項目として核数計測と肝機能評価を行った。また、コントロールとして、播種直後に遠心充填を行う実験系を用いた。

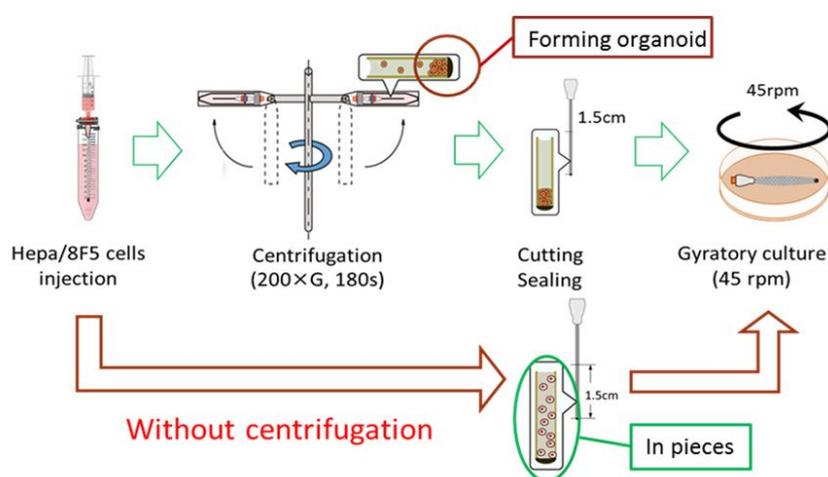


Fig. 5-8 Cell inoculum condition

### 5.3.6 細胞数および細胞密度変化, 免疫蛍光染色による中空糸内観察

培養経過に伴う細胞数変化と細胞密度変化を Fig.5-10 と Fig.5-11 に示す。また、播種直後の中空糸内の免疫蛍光染色による核の分布を Fig.5-12 に示す。遠心充填を行った実験系 (With centrifugal) と比較して、遠心充填を行わなかった場合 (Without centrifugal) の固定化細胞数は低下した(Figs-5-10, 11)。また、0 日目から培地中に Dox を添加し肝機能発現を誘導しているため、両系で細胞は増殖しなかった。

また、免疫蛍光染色による観察から、播種後に遠心を行った系では、遠心方向に細胞が密集していた。一方で、遠心をしなかった系では、中空糸の先端部に細胞の凝集は見られず、中空糸内に均一に Hepa/8F5 細胞が分布していた。

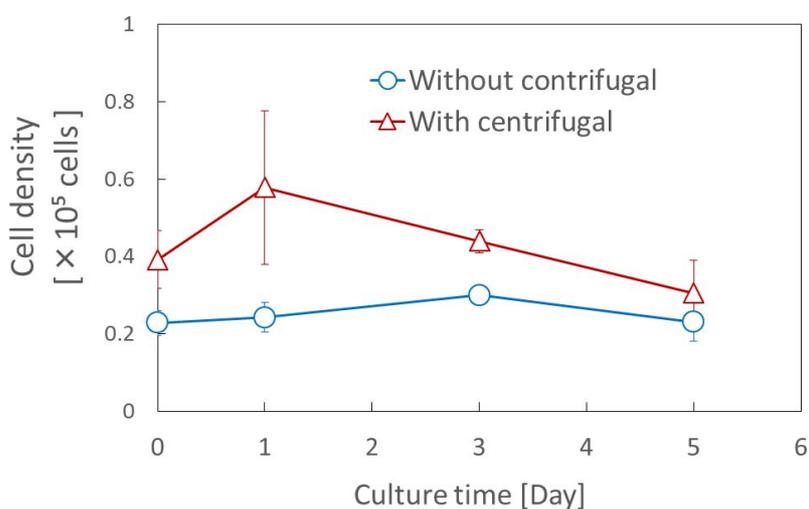


Fig. 5-10 Changes in cell number of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture

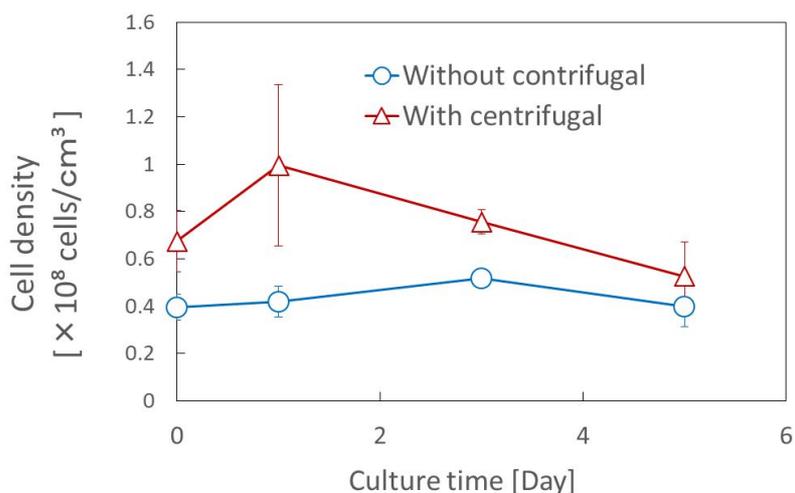
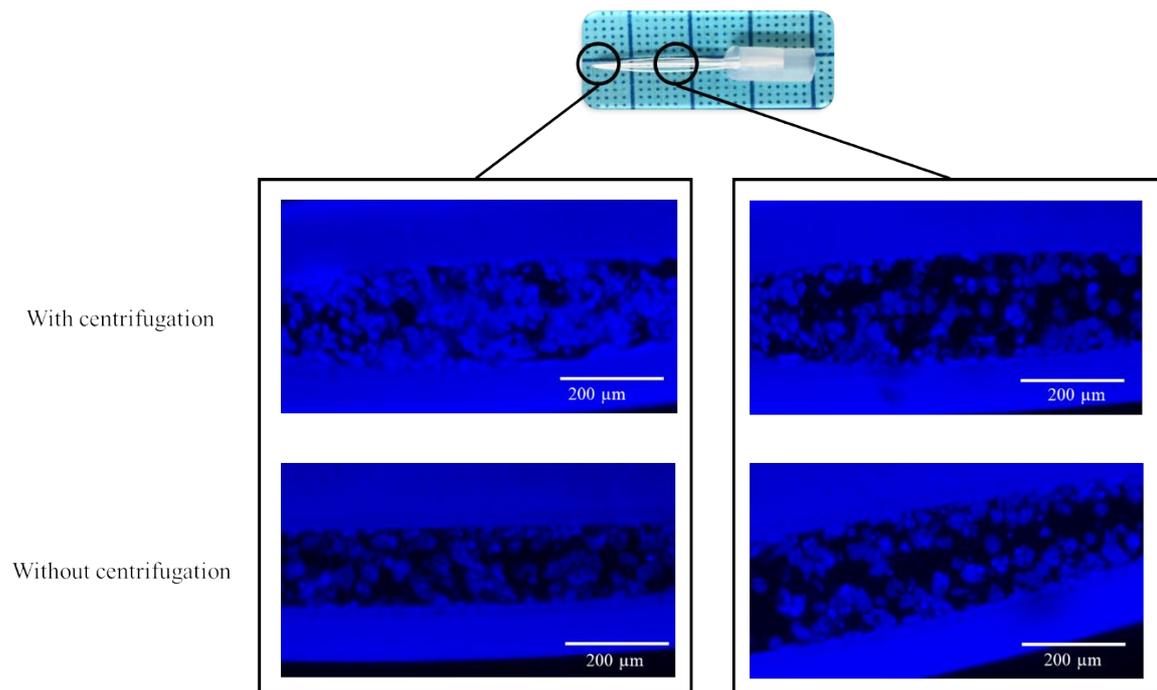


Fig. 5-11 Changes in cell density of Hepa/8F5 cells in hollow fiber culture



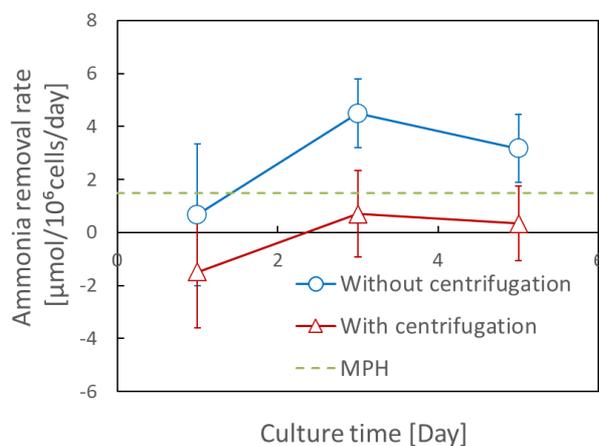
**Fig. 5-12 Morphological observation of cell nuclei inside hollow fibers**

### 5.3.7 肝機能評価

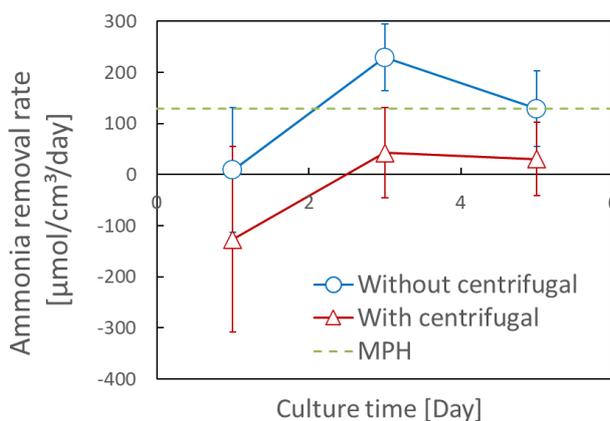
#### アンモニア除去能

培養経過に伴う単位細胞数あたりのアンモニア除去速度と単位体積あたりのアンモニア除去速度を Fig.5-11 及び Fig.5-12 に示す。

培養 1 日目より肝機能発現の評価としてアンモニア除去能の解析を行った。培養期間を通して、遠心なしの条件で高いアンモニア除去能を発現した。培養 3 日目において、遠心なしの条件で最も高いアンモニア除去能 ( $4.50 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells}/\text{day}$ ) が発現し、遠心ありの条件の 6 倍以上の除去速度であった。また、中空糸単位体積あたりでも、培養 3 日目の遠心充なし条件で、マウス初代肝細胞以上の高いアンモニア除去能を発現した( $230.62 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$ )。



**Fig. 5-11** Comparison of the ammonia removal rate of Hepa/8F5 cells in different inoculum conditions (normalized by unit cell number)

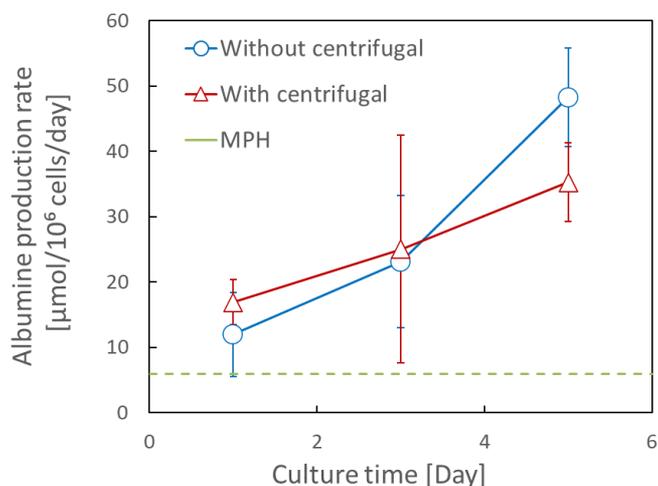


**Fig. 5-12** Comparison of the ammonia removal rate of Hepa/8F5 cells in different inoculum conditions (normalized by unit volume of hollow fibers)

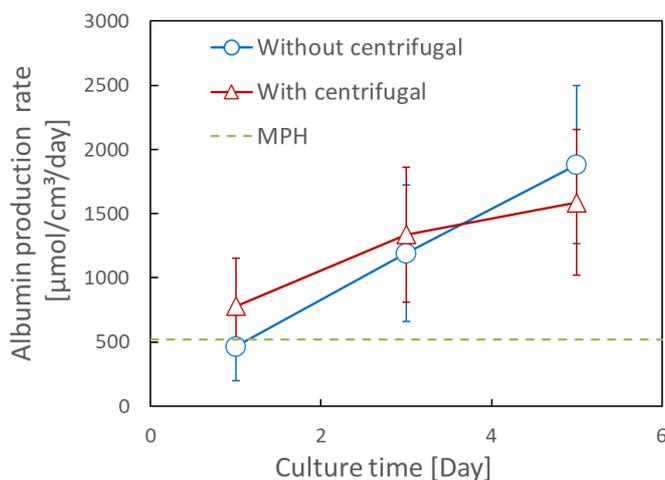
## アルブミン分泌能

培養経過による単位細胞数あたりのアルブミン分泌能と単位体積当たりのアルブミン分泌能を Fig.5-13 及び Fig.5-14 に示す。

単位細胞数あたりのアルブミン分泌能の評価においては、培養3日目までは遠心条件の有無による大きな差は確認されなかった。しかしながら、培養5日目において、遠心なし条件でアルブミン分泌が多く、両条件においてマウス初代肝細胞よりも高レベルのアルブミン分泌能を示した。また単位体積あたりのアルブミン分泌能の評価においても、同様の結果が示された。



**Fig. 5-13** Comparison of the albumin secretion rate of Hepa/8F5 cells in different inoculum conditions (normalized by unit cell number)



**Fig. 5-14** Comparison of the albumin secretion rate of Hepa/8F5 cells in different inoculum conditions (normalized by unit cell number)

### 5.3.8 考察

前節の検討において、中空糸内の Hepa/8F5 細胞の細胞密度が高い状態で Dox を添加しても、十分な肝機能誘導が得られないことが判明した。そこで、本節では、遠心操作による中空糸内での細胞密度の上昇が肝機能発現に与える影響を調査することを目的とし、Hepa/8F5 細胞を中空糸に播種した後、遠心操作を省いて培養を行い、肝機能誘導を行った。

中空糸内部での細胞核の分布を解析した結果、遠心操作を行わない系では、播種直後に遠心方向に細胞が密集しておらず、より低密度な環境であることが示された。(Fig.5-12)。また、遠心操作を行った系と異なり、培養 1 日目において細胞数の増加を示さなかった。これは、より細胞が分散した状態で中空糸内に存在するため、Dox 添加の影響を強く受けたためであると考えられる。

培養 3 日目の単位細胞数あたりのアンモニア除去速度は、遠心操作を行わなかった培養系では  $4.50 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$  であり、遠心力を付与したときよりも大幅に向上した。単位体積あたりのアンモニア除去能においても、遠心なし条件では  $230.62 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$  のアンモニア除去速度を示し、マウス初代肝細胞の約 1.7 倍のレベルを示した。また、単位細胞数あたりのアルブミン分泌能については、培養 5 日目に遠心力を付与しない条件でわずかに高くなったが、培養全体では大きな差は見られず、単位体積当たりで培養 3、5 日目にマウス初代肝細胞以上の機能レベルを示した。この検討からもアンモニア除去能の発現が細胞密度と密接に関係していることが示唆された。

この要因として、前節でも考察したとおり、Dox 添加後の Hepa/8F5 細胞の形態の変化が挙げられる。Hepa/8F5 細胞は Dox が添加され、肝機能が誘導されると、その形態も初代肝細胞へと近づき、細胞のサイズも大きくなる<sup>15</sup>。中空糸内で高細胞密度となった後に肝機能を誘導すると、細胞の形態変化が正常に行われなくなる。このため、細胞の配向に偏りが生じ、Hepa/8F5 細胞の肝機能が発現されにくかったと考えられる。

二つ目に、中空糸内部への酸素供給が要因として挙げられる。細胞密度が高くなるにつれ、中空糸中心部の細胞まで酸素が供給されず、嫌気代謝による乳酸の蓄積が進み、アシドーシスが引き起こされたことが考えられる。第 4 章の検討の通り、Hepa/8F5 細胞は代謝のスイッチングがなされなければ、大量の乳酸を生産する。尿素合成は pH 依存的であり、塩基性、酸性のどちらに傾いても尿素の合成能が低下することがラット初代肝細胞、HepG2 細胞で報告されている<sup>109, 110</sup>。これらの報告からも、中空糸内の高細胞密度状態による pH の低下がアンモニア除去能を発現しなかった理由として考えられる。

一方で、培養 3 日目以降、アンモニア除去能の発現が低下していた。この原因として、分散状態では細胞の機能維持が難しいことが理由として考えられる。多くの報告の通り、細胞は生体内に近い 3 次元組織体（オルガノイド）を形成させることで、細胞の生存や機能維持が促進されることが明らかとなっている。本検討では、もともと中空糸培養で意図していた遠心付加によるオルガノイド形成誘導を行わず、中空糸内の免疫蛍光染色の結果

からも Hepa/8F5 細胞は単分散状態に近いと推測される。この結果、一時的にはアンモニア除去能を発現するものの、培養経過とともに肝機能が低下したと思われる。しかしながら、現在のバイオ人工肝臓の運用は、患者の負担を軽減するためにも、一日当たり 6 時間の運用が目安となっており、一時的な肝機能補助という観点からは十分にその役割は果たせるものと考えられている。

以上の結果から、中空糸培養における Hepa/8F5 細胞の肝機能発現においては、中空糸内部での細胞密度および細胞分布が多大な影響を及ぼす可能性が明らかとなり、これらの制御を適切に行うことにより、バイオ人工肝臓装置の細胞源として期待できることが示された。従って次章では、Hepa/8F5 細胞の中空糸培養法を基盤としたバイオ人工肝臓モジュールの開発を行った。

## 5.4 本章のまとめ

本章では、Hepa/8F5 細胞の中空糸培養においてが高い機能を発現する条件の模索を行った。得られた結果を以下に記す。

### 肝機能誘導時期の最適化に関する検討

- ・ 培養 0 日目から肝機能を誘導した系で高い肝機能を発現した。しかし、アンモニア除去能はマウス初代肝細胞の機能レベルには及ばず、機能発現も不安定であった。
- ・ 中空糸内部での細胞密度が肝機能発現に影響している可能性が示唆された。

### 細胞の播種方法に関する検討

- ・ 培養 3 日目の単位細胞数あたりのアンモニア除去速度は、遠心操作を行わなかった培養系では  $4.50 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cells/day}$  であり、遠心力を付与したときよりも機能が向上した。単位体積あたりのアンモニア除去能においても、遠心なし条件では  $230 \mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{day}$  のアンモニア除去速度を示し、マウス初代肝細胞以上の機能レベルを発現した。
- ・ 単位細胞数あたりのアルブミン分泌能については、培養 5 日目に遠心なし条件で最も高くなったが、遠心条件の有無による差はほとんど見られなかった。
- ・ 中空糸培養での Hepa/8F5 細胞の肝機能発現においては、細胞密度および細胞分布の制御が重要である可能性が示唆された。

## 第6章 Hepa/8F5 細胞を固定化した中空糸型バイオ人工肝臓装置の開発

### 6.1 本章の目的

第5章では、中空糸培養法を Hepa/8F5 細胞に適用し、高い肝機能を発現する培養条件の検討を行った。その結果、細胞密度を制御することにより、Hepa/8F5 細胞はバイオ人工肝臓装置の細胞源となり得る能力を保持していることが示された。そこで本章では、これまでの検討で得られた知見を基にラットスケールのバイオ人工肝臓装置の開発を行った。

### 6.2 中空糸型バイオ人工肝臓装置の設計

装置の開発にあたって、編織を用いた中空糸シートを装置内に配置する人工肝臓装置を開発した(Fig. 6-1)。中空糸をシート状に編織することにより、1本1本の中空糸を規則的に配列させ、編織シートを用いることで、培地が中空糸の間を均一に流れ、それぞれの中空糸内部の細胞に酸素や栄養を均等に供給可能である。また、編織シートを積層することでスケールアップが可能である。

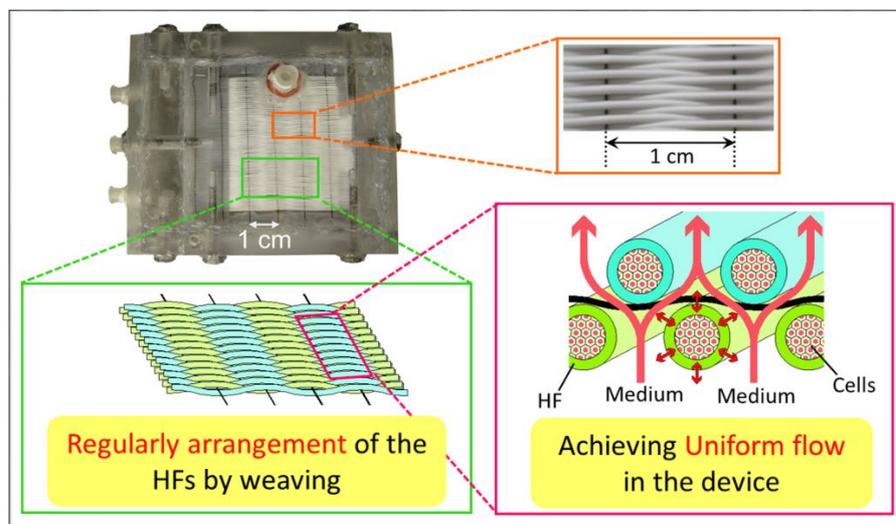


Fig. 6-1 Schematic illustration of a hollow fiber-type bioartificial liver device

第5章の培養条件と得られたアンモニア除去速度を基に、装置スケールを算出した。本研究では、患者救命のために人工肝臓装置に求められる肝機能は肝臓の5%と仮定し、ラットスケールの場合では総肝細胞の約5%に相当する  $2.5 \times 10^7$  cells 必要であると概算した。第5章の通り、Hepa/8F5 細胞の中空糸培養法ではマウス初代肝細胞の約1.7倍のアンモニア除去機能を示した。これらより、ラットスケールのバイオ人工肝臓装置には、約  $1.5 \times 10^7$  cells の Hepa/8F5 細胞が必要であると推定された。Table 6-1 にバンドル培養と装置培養の

条件比較を示した。播種細胞数が中空糸バンドルスケールの 150 倍であるため、中空糸内部総体積もバンドル培養時の 150 倍と設定し、培地液量も 150 倍とした。装置内部体積は、 $3.6 \text{ cm}^3$ （縦：6 cm、横：6 cm、厚さ：0.1 cm）である。

Table 6-1 Comparison of the specification between the small device (hollow fiber bundle) and the hollow fiber module

	Hollow fiber bundle	Hollow fiber module
Inner volume ( $\text{cm}^3$ )	0.00162 1.5 cm × 7	0.231 6 cm × 250
Immobilized cell number (cells)	$1.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$
Medium volume (ml)	1	150

### 6.2.1 中空糸型バイオ人工肝臓装置の作製方法

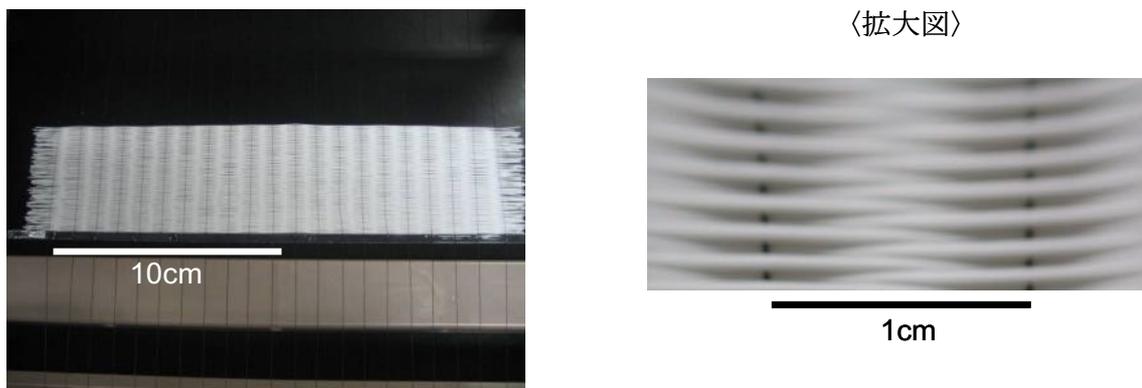
#### 中空糸シート作製方法

中空糸を以下の方法で編織し、中空糸シートを作製した。

- ・ 機織り機に中空糸固定用の縦糸（未滅菌エルシレン、DMTC501002、シラカワ株式会社）を 1 cm 間隔で 40 cm 程度張った(Fig. 6-2)。
- ・ 厚さ 100  $\mu\text{m}$  のポリカーボシート 45 cm を中空糸シート固定用の横糸として機織機に挿入し、一度織ることでポリカーボシートを縦糸に固定した。
- ・ 250 本の中空糸（幅約 5 cm）を折れないように注意して織った。途中で中空糸がよれないよう注意した。
- ・ ポリカーボシートを中空糸固定用の糸に固定した(Fig. 6-3)。
- ・ 織った中空糸を長さ 10 cm になるように 3 つに分割して使用した。



Fig. 6-2 Hand loom

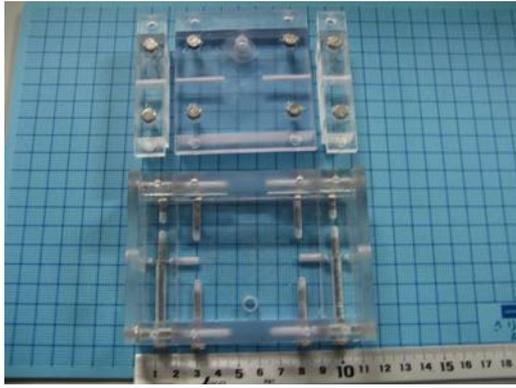


**Fig. 6-3 Hollow fibers that were woven into a textile sheet**

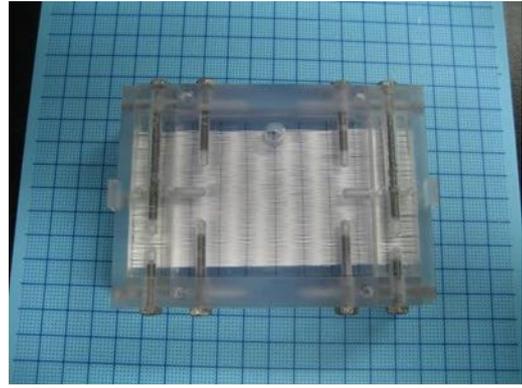
#### 中空糸型バイオ人工肝臓装置の作製方法

作製した編織シートを人工肝臓モジュールに配置してポッティングを行った。ポッティングは以下の手順で行った。ポッティング用装置はポリカーボネート製である。

- それぞれの接合面とネジ部分には液状シリコンを塗布し、完全に密着させた(Fig. 6-4-a)。
- 人工肝臓モジュール内に編織シートを配置し、その後 3 つのパーツを装置に固定することで人工肝臓モジュールを完成させた(Fig. 6-4-b)。
- 装置に内径 1 mm、外径 2 mm のシリコンチューブを 2 箇所取り付け付けた。
- 外側から接合部を液状シリコンで固定して、ポッティング剤が漏れないようにした(Fig. 6-4-c)。
- ポッティングを行った。ポッティング機の内圧は 0.06 MPa, 流量目盛は 500 に設定した。細胞播種側には、2 回に分けて樹脂を流し込むことで、細胞播種用の中空糸断面の空洞を確保した。1 回目は 0.8 sec、2 回目は 2.5 sec 吐出した。吐出後すぐに遠心充填を行った (1800 rpm、20 min)。1 回目のポッティング後、24 時間静置して樹脂を乾燥させ、2 回目を行った。
- 反対側は、吐出時間は 2.8 sec で 1 回のみポッティングを行った(Fig. 6-4-d)。
- 樹脂をよく乾燥させた後、両端をメスで切り落とし、断面を検鏡し、中空糸内部に細胞播種用の空洞があることを確認した。その後、両端にポリカーボ製の部品を取り付けた。このとき、面と面は液状シリコンで完全に密着させた(Fig. 6-4-e)。
- チューブフローシールを巻いたルアーフィッシングを取り付けた。
- 組み立て後、装置周りの接合部をバスコークで固定した。バスコークは細胞の触れる箇所には使用しないようにした(Fig. 6-4-f)。
- 乾燥した後、エタノールで親水化を行い、2 次蒸留水を用いて漏れがないかを確認した。脱気した後、オートクレーブを行った。



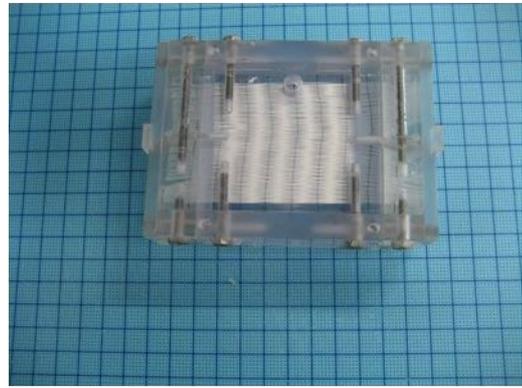
a



b



c



d



e



f

Fig. 6-4 Assembly process of the module

## 6.2.2 中空糸型バイオ人工肝臓装置への播種方法

準備段階として、培養ラインおよびモジュールを培養培地で置換をした。

- ・ 細胞を培養ディッシュより回収し、細胞懸濁液を作成した。
- ・ 播種ラインを用いてピペッティングを十分に行い、2.5 mL シリンジに 2 mL の懸濁液 ( $1.5 \times 10^7$  cells) を入れた。同様に、細胞懸濁入りシリンジを 3 本用意した。
- ・ 播種口に 3 本のシリンジを差し込み、同時にゆっくりと懸濁液を入れた。
- ・ 廃液ラインを止めて播種口をつけた。
- ・ シリンジに空気を充填し、真ん中の播種口から中空糸に入らないようにエアールを入れた。
- ・ 空気が抜けるように両端の播種口をあけて、真ん中の播種口からオートクレーブしたアガロース溶液 (4 wt%) を入れた。
- ・ 装置を氷に入れて、アガロースを固めた。
- ・ 置換しておいた培養システムラインと装置を接続し、灌流培養を行った。

## 6.2.3 実験条件

以下に示す培養システムを用いて灌流培養を行った (Fig. 6-5)。培養システムは中空糸型バイオ人工肝臓装置、リザーバー、エアトラップ、サンプリングポートで構成されており、シリコンチューブで接続されている。培地流量は 4 mL/min に設定した。培養培地は機能誘導培地を用いて培養開始時より肝機能発現の誘導を行った。

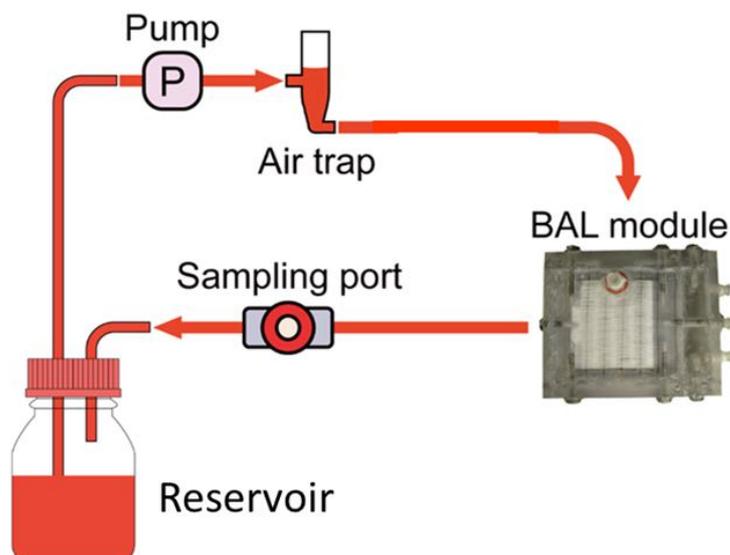


Fig. 6-5 Schematic illustration of perfusion culture system for bioartificial liver module

#### [流量の決定]

装置入口の溶存酸素濃度は、飽和酸素濃度である  $6.86 \text{ ppm} \times 0.95 = 6.52 \text{ ppm}$  である。装置出口では、細胞が機能を維持することができる最低溶存酸素濃度  $1.73 \text{ ppm}$  を達成する必要があるため、適切な培地流量を以下の計算式を用いて算出した。

$$(P_{O_2\text{-in}} - P_{O_2\text{-out}}) \times Q = W \times N_{\text{max}}$$

$P_{O_2\text{-in}}$  : 装置入り口の溶存酸素濃度 (mol/L)

$P_{O_2\text{-out}}$  : 装置出口の溶存酸素濃度 (mol/L)

Q : 流量 (mL/min)

W : 細胞の酸素消費速度 (mol/cell/hr)

$N_{\text{max}}$  : 培養中で最大となる細胞数 (cells)

それぞれのパラメータは以下のように設定した。

- $5\%CO_2$  を考慮して、 $P_{O_2\text{-in}} = 6.86 \times 0.95 = 6.52 \text{ ppm} = 2.04 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  となる。
- $P_{O_2\text{-out}}$  は文献値<sup>60</sup>を用い、 $P_{O_2\text{-out}} = 1.73 \text{ ppm} = 0.54 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  とした。
- W は、ラット初代肝細胞の酸素消費速度<sup>111</sup>を参考にして、 $W = 1.2 \times 10^{-12} \text{ mol/cell/hr}$  と仮定した。
- $N_{\text{max}}$  は、中空糸バンドルを用いた検討より、 $N_{\text{max}} = 2.7 \times 10^7 \text{ cells}$  と仮定した。

これらのパラメータを用いて計算を行い、 $Q = 3.61 \text{ mL/min}$  と算出されたため、培地流量は  $4 \text{ mL/min}$  に決定した。

## 6.2.4 評価方法

評価方法は以下の通りである。

### 細胞数計測

装置を分解後、中空糸シートを取り出し、細胞数を計測した。細胞数計測の方法は第3章で示した方法と同様である。

### 肝機能評価 (アンモニア除去能・アルブミン分泌能)

培地をサンプリングポートより  $1 \text{ mL}$  取り出し、第3章で示した方法と同様に肝機能評価を行った。

## 6.3 実験結果

### 6.3.1 細胞数計測

#### 培養 5 日目の細胞数

中空糸内での細胞の分布を詳細に調査するために、培養終了後に中空糸シートを Fig. 6-7 のように 6 分割し、各部分の細胞数を計測した。その結果を Table 6-4 に示す。

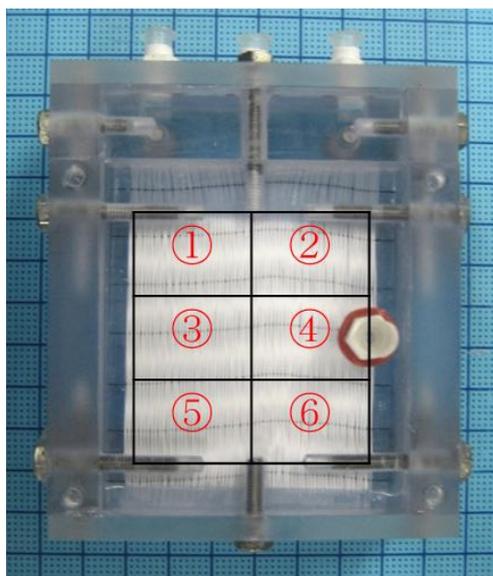


Fig. 6-7 Six partitions of the hollow fibers for cell counting

Table 6-4 Cell density in different parts of the bioreactor

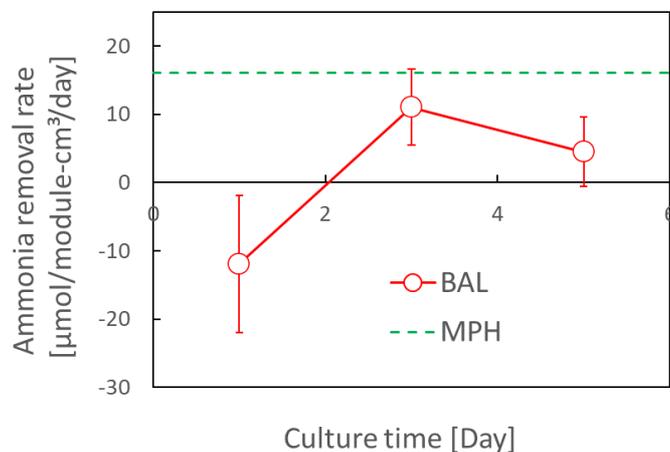
	1	2	3	4	5	6
Cell density ( $\times 10^7$ cells/cm <sup>3</sup> )	1.85	2.19	3.58	3.89	5.03	5.01

細胞播種後の装置内の総細胞数は  $8.29 \times 10^6$  cells であり、細胞密度は  $3.59 \times 10^7$  cells/cm<sup>3</sup> となった。各区画における Hepa/8F5 細胞の密度は区画⑤、⑥で最も高くなり、最も細胞密度が低かった区画①、②と比較し、約 2.5 倍の細胞密度となっており、装置の中空糸シート内での偏りが確認された。

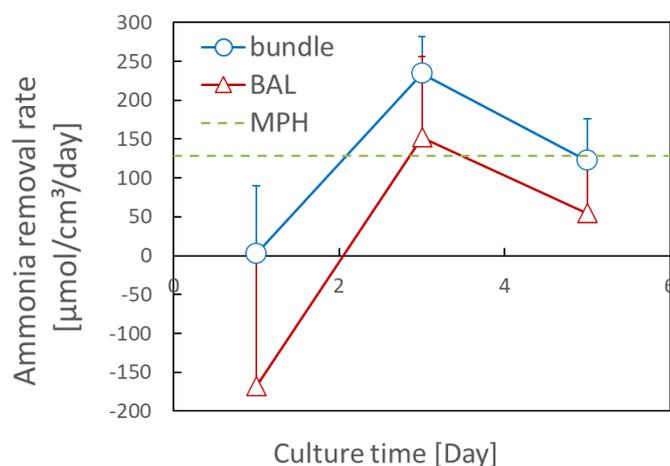
### 6.3.2 肝機能評価

#### アンモニア除去能

培養経過による装置体積当たりのアンモニア除去速度を Fig.6-8 に、装置と中空糸バンドルの中空糸単位体積当たりのアンモニア除去能の比較を Fig.6-9 に示す。装置体積あたりのアンモニア除去能の評価では、培養3日目と5日目にアンモニア除去能が確認された。また、アンモニア除去速度はそれぞれ  $11.02 \mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{-module}/\text{day}$  と  $4.51 \mu\text{mol}/\text{cm}^3\text{-module}/\text{day}$  であった。培養3日目のアンモニア除去速度を、マウス初代肝細胞を装置で培養したときの値と比較したところ、0.75 倍であった。また、中空糸単位体積当たりのアンモニア除去能をバンドル条件と比較すると、挙動はほぼ同一であったが、機能レベルは培養期間を通して低かった。



**Fig. 6-8 Ammonia removal rates of the Hepa/8F5 cells (normalized by unit volume of the bioreactor)**

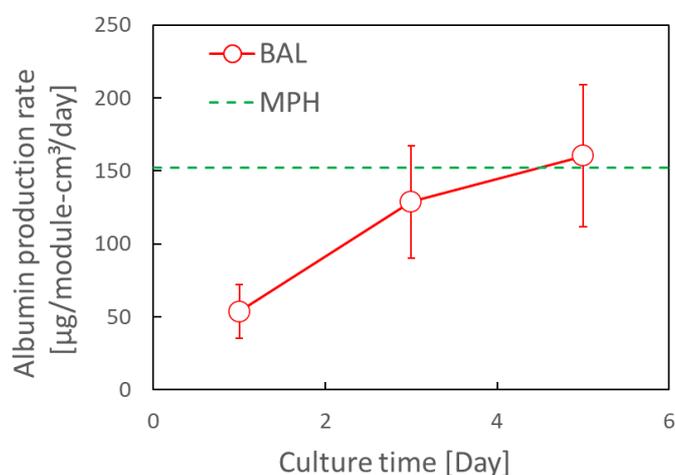


**Fig. 6-9 Ammonia removal rates of the Hepa/8F5 cells (normalized by unit volume of the hollow fibers)**

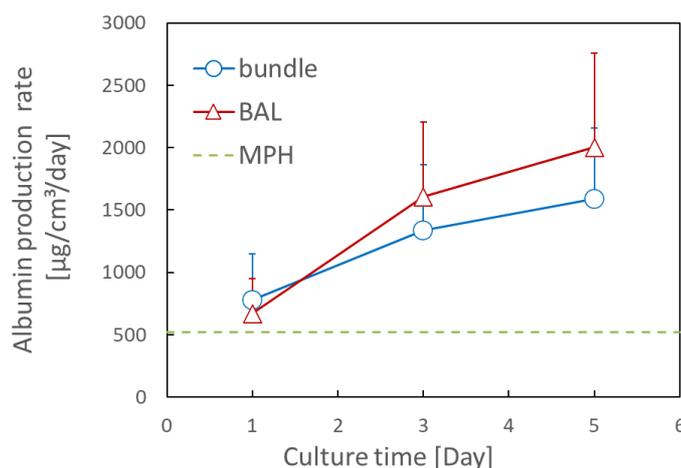
## アルブミン分泌能

培養経過による装置体積当たりのアルブミン分泌能を Fig.6-10 に、装置と中空糸バンドルの中空糸単位体積当たりのアルブミン分泌能の比較を Fig.6-11 に示す。

培養 1 日目より肝機能発現の評価として、アルブミン分泌能の解析を行った。その結果、培養を通してアルブミンの分泌が検出され、アルブミン分泌能は培養経過とともに向上した。培養 5 日目における装置体積当たりのアルブミン分泌能は、約  $160.52 \mu\text{g}/\text{cm}^3\text{-module}/\text{day}$  であり、マウス初代肝細胞を装置で培養した場合とほぼ同等であった。また、装置とバンドルのアルブミン分泌能を比較すると、その機能レベルは装置が若干高いものの、ほぼ同じレベルを示した。



**Fig. 6-10 Albumin secretion rates of the Hepa/8F5 cells  
(normalized by unit volume of the bioreactor)**



**Fig. 6-11 Albumin secretion rates of the Hepa/8F5 cells  
(normalized by unit volume of the hollow fibers)**

## 6.4 考察

本章では、第5章で決定した培養条件を基に中空糸型バイオ人工肝臓装置を設計し、Hepa/8F5を固定化後、その性能を評価した。肝機能評価の結果、培養3日目からアンモニア除去能の発現が確認された。また、培養3日目に最も高いアンモニア除去能が確認された。しかしながら、そのレベルは、マウス初代肝細胞を中空糸型バイオ人工肝臓装置に充填した場合の75%程度の機能レベルであった。また、バンドルスケールと比較するとその機能発現レベルは約65%であった。一方で、機能発現の挙動は中空糸バンドルでの培養と同様であった。アンモニア除去能を中空糸バンドルの系と比較した際に機能が低かった要因として中空糸シート内のHepa/8F5細胞の分布が挙げられる。

培養終了後、装置を分解し中空糸シート内の細胞数計測を行ったが、播種口とは反対側にHepa/8F5細胞が多く分布しており、実際に細胞密度には約2.5倍の差が生じていた。このことより、酸素・栄養供給が装置内で均一にならず、酸素供給の影響を受けやすいアンモニア除去能が低下したと考えられる。一方で、アルブミン分泌能は培養5日目にマウス初代肝細胞を中空糸型バイオ人工肝臓装置に充填した場合より高レベルであった。また、機能発現レベルとしては、中空糸バンドルとほぼ同じレベルを示し、挙動も一致していた。これは、これまでの検討と同様にHepa/8F5細胞のアルブミン分泌能が酸素の影響を受けにくいため、スケールアップ後も機能が安定していたと思われる。

今回の人工肝臓装置へのスケールアップの検討では、アンモニア除去能については小スケール（中空糸バンドル）に及ばないものの、おおよそ良好なスケールアップが達成されたと考える。また、本検討で作成されたHepa/8F5細胞を充填したバイオ人工肝臓装置の最終的な細胞密度は $3.59 \times 10^7$  cells/cm<sup>3</sup>であった。これは、最も臨床応用に使用されたバイオ人工肝臓装置であるHepatpaassistと比べ<sup>35-42</sup>、10倍以上の細胞密度であり、高細胞密度化に成功した。

我々の研究室で検討を行っているマウスES細胞を充填した同様の中空糸型BALの肝機能発現レベルはアンモニア除去能、アルブミン分泌能がそれぞれ5.75 μmol/module-cm<sup>3</sup>/dayと158.31 μg/cm<sup>3</sup>-module/dayであった<sup>112</sup>。このことからHepa/8F5細胞を充填した本人工肝臓装置は装置単位体積当たりで高い肝機能を発現していることが示された（アンモニア除去能：11.02 μmol/cm<sup>3</sup>-module/day／アルブミン分泌能：160.52 μg/cm<sup>3</sup>-module/day）。前述のES細胞を充填した人工肝臓装置は、肝不全ラットを用いた体外循環において肝不全状態からの回復効果を示している。このことから、Hepa/8F5細胞を充填した人工肝臓装置においても同等以上の治療効果が期待される。しかしながら、生体内で肝臓は数多くの働きを担っており、肝疾患の治療の際にどの機能が最も必要とされるかは、現在に至っても不明である。将来的なヒトスケールアップを目指すためにも、肝疾患モデル動物を用いた詳細な治療効果の検証が必要不可欠である。

## 6.5 本章のまとめ

本章では、バイオ人工肝臓装置を設計し、Hepa/8F5 細胞を充填・培養を行い、その性能を評価した。得られた結果を以下に示す。

- ・ 中空糸バンドルでの条件と比較してアンモニア除去能で 65%程度、アルブミン分泌能ではほぼ同等の機能発現を示した。この結果、バイオ人工肝臓装置を用いた Hepa/8F5 細胞の培養においても、細胞密度と細胞分布が機能発現に大きな影響を及ぼすことが示唆された。
- ・ Hepa/8F5 細胞を充填したバイオ人工肝臓装置の細胞密度は  $3.59 \times 10^7$  cells/cm<sup>3</sup>であり、非常に高い細胞密度での装置培養に成功した。
- ・ 装置あたりの機能発現レベルは同装置に初代肝細胞や ES 細胞を充填した場合と同程度であった。この結果、Hepa/8F5 細胞を充填した人工肝臓装置においても肝不全状態からの治療効果が期待される。

## 第7章 結言

### 7.1 本論文のまとめ

本論文ではバイオ人工肝臓開発の基盤技術として、独自の中空糸培養法を適用した Hepa/8F5 細胞の肝成熟化と最適な培養条件の探索、これらの検討を基とした中空糸型バイオ人工肝臓の開発に取り組んだ。まず、セルローストリアセテート製中空糸（内径 285  $\mu\text{m}$ ）を用いた培養法を行い、Hepa/8F5 細胞の高肝機能化を目指した。続いて、高肝機能化の試みとして、Dox 添加による肝機能誘導と同時に高酸素分圧環境下で培養を行い、Hepa/8F5 細胞が肝機能誘導される条件について決定した。次に、ナイロン製中空糸（内径：140  $\mu\text{m}$ ）へと中空糸を小口径化して培養を行い、得られた結果をバイオ人工肝臓装置開発のための基盤とした。さらに、この結果を基に Hepa/8F5 細胞を充填したバイオ人工肝臓装置を開発し、灌流培養下における肝機能について評価した。

第 1 章では、本研究の背景を述べ、本研究の方針について示した。

第 2 章では、既往の研究について述べ、研究上の問題点、解決すべき課題を示した。

第 3 章では、中空糸培養法と Hepa/8F5 細胞を組み合わせ、高レベルの肝機能発現を目指した。その結果、細胞増殖が抑制されたことにより、Dox 添加による細胞増殖の停止は達成されたが、アンモニア除去能は培養期間を通し発現されていなかった。この原因として、Dox 添加後の呼吸代謝の変化により、中空糸中心部の酸素が枯渇している可能性が考えられた。

第 4 章では、Hepa/8F5 細胞が中空糸内で肝機能を発現するためのアプローチとして、Dox 添加による肝機能誘導と同時に酸素分圧 70%条件下において培養を行い、酸素供給と肝機能発現・呼吸代謝について検討した。本検討により、高酸素分圧下での培養では Hepa/8F5 細胞は、細胞あたりにおいてマウス初代肝細胞以上の肝機能を発現し、グルコース消費と乳酸生成の減少より嫌気代謝から好気代謝へと移行していることが明らかとなった。また、組織学的評価により、高酸素分圧下では著しい細胞減少が起り、細胞密度も大きく減少していることが確認された。この検討より、十分に酸素を供給することで、Hepa/8F5 細胞はマウス初代肝細胞以上の肝機能レベルを示し、バイオ人工肝臓装置の細胞源としてのポテンシャルを保持していることが示された。一方で、細胞数と中空糸内部の観察結果から、高酸素分圧下での培養では活性酸素による細胞障害が発生している可能性が示唆された。そのため、酸素分圧に頼らずに Hepa/8F5 細胞の酸素要求を満たす培養系の構築が必要であることが示された。

第5章では、中空糸内のHepa/8F5細胞の酸素要求を満たす試みとして、小口径中空糸の使用を考案し、培養を行った。本検討で用いた中空糸の内径は約140 μmであり、これまで使用してきた中空糸（内径：285 μm）と比較するとおおよそ半分程度の大きさであるため、中空糸内部まで酸素供給が期待できた。まず、Dox添加による肝機能誘導時期の最適化を行った。具体的には中空糸内にHepa/8F5細胞を播種した直後にDoxを添加する系と播種後5日目にDoxを添加する系で検討を行った。この結果、0日目から肝機能を誘導する系において高いアンモニア除去能を発現したが、その機能レベルはマウス初代肝細胞と比較すると約1/3であり、発現レベルも不安定であった。アルブミン分泌能についても、培養0日目から機能誘導する系で高くなり、そのレベルはマウス初代肝細胞以上であった。この検討より、小口径中空糸を使用し培養0日目から肝機能誘導を行うことで、肝機能が発現されることが示され、その原因としてDox添加時の細胞密度が機能発現に影響していることが示唆された。

そこで次の検討では、細胞播種時における遠心操作の有無による細胞密度と肝機能発現に対する影響を検討した。この結果、遠心を付与しない系で中空糸バンドル先端の細胞密度の低下が示された、また、アンモニア除去能では遠心操作を行わない系でマウス初代肝細胞の約1.7倍の高い値を示した。まアルブミン分泌能では遠心条件に関わらずほぼ同等の機能発現を示し、その発現レベルはマウス初代肝細胞の3倍以上であった。この検討より、小口径中空糸を用い、細胞密度を制御して培養することで、Hepa/8F5細胞はバイオ人工肝臓装置に適用可能な肝機能レベルを発現することが示された。

第6章では、これまでの検討を基に、Hepa/8F5細胞を充填したラットスケールの中空糸型バイオ人工肝臓装置を設計及び灌流培養を行い、肝機能レベルについて評価した。Hepa/8F5細胞を装置に充填した後、直ちにDoxを添加し肝機能誘導を促すことで、アンモニア除去能及びアルブミン分泌能の発現を確認した。また、装置体積当たりで評価をした結果、装置あたりの機能発現レベルは同装置に初代肝細胞やES細胞を充填した場合と同程度であった。この結果、Hepa/8F5細胞を充填した人工肝臓装置は高レベルでの肝機能の発現が可能であった。

以上より、本研究ではHepa/8F5細胞に独自の細胞培養法である中空糸培養法を適用し、マウス初代肝細胞を同装置に充填した場合と同等の肝機能レベルを発現するバイオ人工肝臓装置の開発に成功した。

## 7.2 今後の課題と展望

中空糸培養法と遺伝子導入肝がん細胞である Hepa/8F5 細胞を組み合わせることで、単位細胞及び体積あたりでマウス初代肝細胞と比較可能なレベルの肝機能を示した。これは、Hepa/8F5 細胞が十分な肝機能を保持し、治療効果が期待できるバイオ人工肝臓装置へと応用可能であることを示した。一方で、体外設置型の人工肝臓では、患者の血液を体外に引き出さなければならず、患者に多大な負担を強いるものである。このため、バイオ人工肝臓装置の小型化・高機能化は達成されなければならない。成人から安全に引き出せる血液量は 1 L と言われており、バイオ人工肝臓装置・ラインを含め、1 L 以内に収まることが理想である。このような装置の高機能化・小型化を目指すためにも Hepa/8F5 細胞の機能発現に関するさらなる検討が必要不可欠である。

本論文で設計したバイオ人工肝臓装置の細胞密度は  $3.59 \times 10^7$  cells/cm<sup>3</sup> と非常に高密度であったが、中空糸内には十分な培養スペースが残されており、播種密度や播種手技を向上させることで更なる高肝機能化も期待できる。加えて、本検討では、分散状態の Hepa/8F5 細胞を播種し検討を行っており、3 次元組織体の形成という部分においては改善が期待される部分である。実際に、3 次元組織体を形成や他種細胞との共培養により、細胞の機能向上や維持がされるという報告は多くなされている<sup>113-120</sup>。この観点からも、Hepa/8F5 細胞のスフェロイドを作製し播種する方法や多種細胞との共培養、単層培養にて機能誘導を行い中空糸へと播種することで細胞密度の向上が期待できるため、このような高機能化の検討も進めていかなければならない。

さらに、本論文で用いた Hepa/8F5 細胞は Tet-on システムを応用しており、Dox の添加により肝転写因子の発現と肝機能誘導を促進している。本検討では、Dox の添加濃度を培地に対して 0.1 µg/ml と設定しているが、同じく Tet-on システムを応用した研究では、Dox の濃度が高いほど、目的遺伝子の発現が高くなるという報告もある<sup>121</sup>。今後、ヒト細胞で樹立した場合には Dox の添加濃度も検討を行う必要があると考えられる。Doxycycline は、実際の治療でも広く用いられている抗生物質であり、一般的に 100 mg が静脈注射される。血液を約 5 L とした場合、血中の Dox 濃度は 20 µg/ml であるため、約 200 倍程度までは Dox の濃度を上げることが可能だと思われる。

また、今回作製したバイオ人工肝臓装置が肝疾患に対する治療効果を示すか検証を行うことが不可欠である。今回の検討ではアンモニア除去能とアルブミン分泌能の二つの肝機能評価を行うことで *in vitro* での性能を評価したが、肝臓は 500 種類以上の機能を持つと言われており、2 種類の肝機能評価だけでは不十分である。したがって、さらなる肝機能の評価と動物実験による治療効果の実証を行う必要がある。その後も、大型肝疾患モデル動物を使用した治療効果の検証やヒト臨床応用に向けたスケールアップ指針を策定し、ヒトスケールの装置を設計・開発しなければならない。

一方で遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞株をヒト臨床へと応用した場合、異種ウイルス感染症や免疫拒絶といったリスクが生じてくる。そのため将来的には、信頼のあるヒト由来の細胞株を使用しなければならない。本研究で使用した Hepa/8F5 細胞のように、遺伝子導入により増殖から機能発現への表現型のスイッチが可能なヒト肝細胞株の樹立が望まれる。安全性を考慮すると正常細胞の利用が望ましい。従って、iPS 細胞などを含めた幹細胞の利用も考慮すべきである。いずれの場合においても、人工肝臓適用までのバイオプロセスにおいて増殖から機能発現、あるいは分化のように細胞の表現型が変化することが想定され、本研究で得られた知見はこうした細胞の利用においても大いに貢献することが期待される。

今後の肝疾患の治療においてはバイオ人工肝臓の運用のみでなく、細胞移植等とも組み合わせた治療も視野に入れ、これらを適切に組み合わせ適用していくことが望ましい。前述のように、自己由来の肝様細胞を準備する間にはがん細胞等由来の細胞株で肝機能を補助する方法等も挙げられる。さらに、遺伝子工学的技術の発展によるブタ体内でのヒト臓器の作製<sup>122</sup>や3D バイオプリンターによる臓器の作製に関する研究<sup>123</sup>も盛んに行われており、これらと連携した治療法の構築も期待される。

本研究において、バイオ人工肝臓開発の新たな細胞源として Hepa/8F5 細胞に着目し、高い肝機能を持つ装置の開発に成功した。今後、上述した課題が解決され、本研究結果を基にした大型スケールのバイオ人工肝臓の開発と治療効果の検証、大量取得技術が確立されれば、遺伝子導入肝がん細胞を細胞源とするバイオ人工肝臓装置は肝移植に替わる新たな治療法の一つとして期待されると考えられる。

## 参考文献

1. Rheinwald, J.G et al, "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. 赤松延久 "日本における肝移植の現状について". [http://www.u-tokyo-hbp-transplant-surgery.jp/dl/report\\_01.pdf](http://www.u-tokyo-hbp-transplant-surgery.jp/dl/report_01.pdf)
13. Chamuleau RA, "(Bio)artificial liver support: ready for the patient?" *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 123(5):243-7. (2016)
14. 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)
15. Yamamoto, H et al, "Enhanced liver functions in mouse hepatoma cells by induced overexpression of liver-enriched transcription factors." *Biochem. Eng. J*. 60:67-73.

(2012)

16. Ananthanarayanan A et al, "Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering." *Trends Biotechnol.* 29: 110–118. (2011)
17. 酒井清孝, "人工臓器(2)代謝系人工臓器" (株)コロナ社 (2003)
18. 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)
19. Novikoff, A.B, "Cell heterogeneity within the hepatic lobule of the rat (staining reactions)" *J Histochem Cytochem*, 7(4): 240-244. (1959)
20. 持田智, "急性肝不全 一概念, 診断基準とわが国における実態一" *日消誌* 112 : 813–821. (2015)
21. 江口豊, "劇症肝不全と人工肝臓" *人工臓器* 37 巻 1 号 (2008)
22. 中村智之, 西田修, "人工肝臓" *人工臓器* 43 巻 3 号 (2014)
23. 川村明夫, "肝昏睡も血液浄化で覚醒" *Clin. Eng* 3: 170-177. (1992)
24. Yoshiba, M et al, "Favorable Effect of new artificial liver support on survival of Patients with fulminant hepatic failure" *Artif. Organs.* 20 11: 1169-1172. (1996)
25. Rakhi Maiwall, Richard Moreau, "Plasma exchange for acute on chronic liver failure: is there a light at the end of the tunnel?" *Hepatology* 10: 387–389. (2016)
26. 新田正和, "劇症肝炎に対する SPE+HFCHDF" *日アフエレシス会誌* 22:198-205. (2003)
27. 西田修, "劇症肝不全に対する血液浄化法の知識と実践" *救急医学* 32: 1699-706. (2008)
28. Abe T et al, "Study of plasma exchange for liver failure: beneficial and harmful effect." *The Apher Dial* 8: 180-4. (2004)
29. Hassanein TI et al, "Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis." *Hepatology* 46: 1853-62. (2007)
30. Banares R et al, "Extracorporeal albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system in acute-on-chronic liver failure." *The RELIFE trial.* *Hepatology* 57: 1153-62. (2013)
31. Laleman W et al, "Effect of the molecular adsorbent recirculating system and Prometheus device on systemic haemodynamics and vasoactive agents in patients with acute-on-chronic alcoholic liver failure." *Crit Care* 10: R108. (2006)
32. Kribben A et al, "Effects of fractionated plasma separation and adsorption on survival in patients with acute-on-chronic liver failure." *Gastroenterology* 142: 782-9. (2012)
33. 江口豊, "重症肝障害における Plasma Dia-filtration (PDF) –Plasma Filtration with Dialysis-療法" *日アフエレシス会誌* 26: 310-4. (2007)

34. 小林直哉, “バイオ人工肝臓” 人工臓器 38 卷 3 号 (2009)
35. Demetriou, A et al, “Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver.” *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 30 sup208: 111-117. (1995)
36. Rozga, J et al, “Development of a hybrid bioartificial liver.” *Ann Surg* 217: 502–509. (1993)
37. Watanabe, F. D et al, “Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial.” *Ann. Surg.* 225: 484-491. (1997)
38. Neuzil, Dan F et al, “Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency.” *Surgery* 113.3: 340-343. (1993)
39. Arkadopoulos, N et al, “Liver assist systems: state of the art.” *The International journal of artificial organs* 21.12: 781-787. (1998)
40. Samuel, Didier et al, “Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute Liver failure awaiting transplantation1.” *Transplantation* 73.2: 257-264. (2002)
41. Bain, V. G., Montero, J. L. & de La Mata, M, “Bioartificial liver support.” *Can J Gastroenterol* 15: 313-318. (2001)
42. Demetriou, Achilles A et al, “Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure.” *Annals of surgery* 239.5: 660-670. (2004)
43. Donini A, Baccarani U, Risalti A et al, “Temporary neurological improvement in a patient with acute or chronic liver failure treated with a bioartificial liver device.” *Am J Gastroenterol*, Apr 95 (4): 1102-4. (2000)
44. George V. Mazariegos, John F. Patzer II, Roberto C. Lopez et al, “First Clinical Use of a Novel Bioarti@cial Liver Support System (BLSS)” *American Journal of Transplantation* 2: 260-266. (2002)
45. Xue YL, Zhao SF, Luo Y et al, “TECA hybrid artificial liver support system in treatment of acute liver failure.” *World J Gastroenterol*. Dec 7(6): 826-9. (2001)
46. Yi-Tao Ding, Yu-Dong Qiu, Zhong Chen et al, “The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients” *World J Gastroenterol* 9(4): 829-832. (2003)
47. Sussman NL1, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH ”The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience.” *Artif Organs*. May 18(5): 390-6. (1994)
48. Antony Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA “Pilot-Controlled Trial of the Extracorporeal Liver Assist Devicein Acute Liver Failure” *Hepatology*. Dec 24(6): 1446-51. (1996)

49. VITAL THERAPIES ホームページより
50. Sauer IM, Gerlach JC, “Modular extracorporeal liver support.” *Artif Organs*. Aug 26(8): 703-6. (2002)
51. Flendrig, L. M. la Soe JW, Jörning GG et al, “In Vitro Evaluation of a Novel Bioreactor Based on an Integral Oxygenator and a Spirally Wound Nonwoven Polyester Matrix for hepatocyte culture as small aggregates” *J Hepatol*. Jun 26(6): 1379-92. (1997)
52. Flendrig, L. M, Maas MA, Daalhuisen J et al, ‘Does the extend of the culture time of primary hepatocytes in a bioreactor affect the treatment efficacy of a bioartificial liver?.’ *The International journal of artificial organs* 21.9: 542-547. (1998)
53. Sosef MN. Van De Kerkhove MP, Abrahamse SL et al, “Blood coagulation in anhepatic pigs: Effects of treatment with the AMC-bioartificial liver.” *J. Thromb. Haemost* 1: 511–515. (2003)
54. Van De Kerkhove, M. P et al, “Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver.” *Int. J. Artif. Organs* 25: 950–959. (2002)
55. Poyck, P.P., Hoekstra, R., van Wijk et al: “Functional and Morphological Comparison of Three Primary Liver Cell Types Cultured in the AMC Bioartificial Liver” *LIVER TRANSPLANTATION* 13: 589-598. (2007)
56. Miranda JP, Leite SB, Muller-Vieir U et al, “Towards an extended functional hepatocyte in vitro culture.” *Tissue Eng. Part C* vol. 15: 157–167. (2009)
57. Harrison S, Boquest A, Grupen C et al, “An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs.” *Cloning Stem Cells*. 6(4): 327-31. (2004)
58. Frühauf, Jan-Henning, Mertsching Heike et al, “Porcine endogenous retrovirus released by a bioartificial liver infects primary human cells” *Liver International*. Volume 29, Number 10: 1553-1561(9). (2009)
59. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA et al, “Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs.” *Nat Med*. Mar 3(3): 282-6. (1997)
60. Demetra Mavri-Damelin, Leonard H. Damelin, Simon Eaton et al: “Cells for bioartificial liver devices: The human hepatoma-derived cell line C3A produces urea but does not detoxify ammonia” *Biotechnol. Bioeng*, vol. 99: 644–651. (2008)
61. Mavri-Damelin D, Damelin LH, Eaton S et al, “Cells for bioartificial liver devices: the human hepatoma-derived cell line C3A produces urea but does not detoxify ammonia.” *Biotechnol Bioeng*. Feb 15;99(3): 644-51. (2008)
62. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA et al, “Prevention of acute liver failure

- in rats with reversibly immortalized human hepatocytes.” *Science*. Feb 18;287(5456): 1258-62. (2000)
63. Totsugawa T, Yong C, Rivas-Carrillo JD, “Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination.” *J Hepatol*. Jul 47(1): 74-82. (2007)
  64. Li J, Li LJ, Cao HC et al, “Establishment of highly differentiated immortalized human hepatocyte line with simian virus 40 large tumor antigen for liver based cell therapy.” *ASAIO J*. May-Jun 51(3): 262-8. (2005)
  65. Schippers IJ, Moshage H, Roelofsen H et al: “Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation.” *Cell Biol Toxicol*. Jul 13(4-5): 375-86. (1997)
  66. Werner A, Duvar S, Müthing J et al, “Cultivation and characterization of a new immortalized human hepatocyte cell line, HepZ, for use in an artificial liver support system.” *Ann N Y Acad Sci*. Jun 18 875: 364-368. (1999)
  67. Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka N et al, “Cell choice for bioartificial livers.” *Keio J Med*. Sep 52(3); 151-157. (2003)
  68. Stock P, Staeger MS, Muller LP et al, “Hepatocytes derived from adult stem cells.” *Transplant Proc*. 40: 620–623. (2008)
  69. Saulnier N, Lattanzi W, Puglisi MA et al, “Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage.” *ur Rev Med Pharmacol Sci*, 13(Suppl. 1): 71–78. (2009)
  70. Sgodda M, Aurich H, Kleist S et al, “Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo.” *Exp Cell Res* 313: 2875–86. (2007)
  71. Sato Y, Araki H, Kato J et al, “Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion.” *Blood* 106: 756–63. (2005)
  72. Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P et al, “Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver.” *PLoS ONE* 4: e6657. (2009)
  73. di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C et al, “Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential.” *Gut* 57: 223–31. (2008)
  74. Oh SK, Chen AK, Mok Y et al, “Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells.” *Stem Cell Res* 2: 219–30. (2009)
  75. Hay DC, Fletcher J, Payne 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(34): 12301–6. (2008)
76. Lu H, Wang Z, Zheng Q et al, “Efficient differentiation of newly derived human embryonic stem cells from discarded blastocysts into hepatocyte-like cells.” *J Dig Dis* 11: 376–82. (2010)
  77. Touboul T, Hannan NR, Corbineau S et al, “Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development.” *Hepatology* 51: 1754–65. (2010)
  78. Hay DC, Zhao D, Fletcher J et al, “Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo.” *Stem Cells* 26: 894–902. (2008)
  79. Chamuleau RA, Deurholt T, Hoekstra R “Which are the right cells to be used in a bioartificial liver?” *Metab Brain Dis* 20: 327–35. (2005)
  80. Payne CM, Samuel K, Pryde A et al, “Persistence of functional hepatocyte-like cells in immune-compromised mice.” *Liver Int*, 31: 254–62. (2011)
  81. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al, “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.” *Cell*. Nov 30;131(5):861-72. (2007)
  82. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al, “Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.” *Science*. Dec 21;318(5858):1917-20. (2007)
  83. Sullivan GJ, Hay DC, Park IH et al, “Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells.” *Hepatology*, 51: 329–35. (2010)
  84. Yasuhito Nagamoto, Kazuo Takayama, Kazuo Ohashi, “Transplantation of a human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure.” *Journal of Hepatology*, vol. 64 1068–1075. (2016)
  85. Fausto N, “Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells.” *Hepatology*, 39: 1477–87. (2004)
  86. Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA, “Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma.” *Carcinogenesis*, 23: 435–45. (2002)
  87. Wege H, Le HT, Chui MS, et al, “Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential.” *Gastroenterology*, 124: 432–44. (2003)
  88. Yoon JH, Lee HV, Lee JS, Park JB, Kim CY, “Development of a non-transformed human liver cell line with differentiated hepatocyte and urea-synthetic functions: applicable for bioartificial liver.” *Int J Artif Organs*, 22(11): 769–77.

(1999)

89. Deurholt T, van Til NP, Chhatta AA et al, "Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes." *BMC Biotechnol*, 9: 89. (2009)
90. Chen Y, Li J, Liu X et al, "Transplantation of immortalized human fetal hepatocytes prevents acute liver failure in 90% hepatectomized mice." *Transplant Proc*, 42: 1907–14. (2010)
91. Khan AA, Habeeb A, Parveen N et al, "Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report." *Trop Gastroenterol*, 25: 141–3. (2004)
92. Diekmann S, Bader A, Schmitmeier S, "Present and Future Developments in Hepatic Tissue Engineering for Liver Support Systems: State of the art and future developments of hepatic cell culture techniques for the use in liver support systems." *Cytotechnology*, 3: 163–79. (2006)
93. Mahieu-Caputo D, Allain JE, Branger J et al, "Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts." *Hum Gene Ther*, 15(12): 1219–28. (2004)
94. Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, Gupta S, "Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes." *J Cell Sci*, 13: 2679–88. (2002)
95. Suzuki A, Zheng Y, Kondo R et al, "Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver." *Hepatology*, 32: 1230–9. (200)
96. Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S et al, "Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver." *J Cell Biol*, 156: 173–84. (2002)
97. Sekiya S, Suzuki A, "Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors." *Nature*, 475: 390–3. (2011)
98. Huang P, He Z, Ji S et al, "Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors." *Nature*, 475: 386–9. (2011)
99. Aoki K, Mizumoto H, Nakazawa K, Funatsu, K, Kajiwara T, "Evaluation of a hybrid artificial liver module with liver lobule-like structure in rats with liver failure." *The International Journal of Artificial Organs*, 31(1), 55–61, (2008)
100. Mizumoto H, Amimoto N, Miyazawa T, Tani H, Ikeda K, Kajiwara T, "In vitro and ex vivo Functional Evaluation of a Hollow Fiber-type Bioartificial Liver Module Containing ES Cell-derived Hepatocyte-like Cells." *Advanced Biomedical Engineering*. 7, 18-27, (2018).

101. Xiao-Lei Shi, Yimeng Gao, Yupeng Yan et al, “Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes.” *Cell Research*, 26:206-216. (2016)
102. Warbug O, “On the origin of cancer cells.” *Science*, 123; 309-314. (1956)
103. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C et al, “Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again.” *J Biotechnol*. Jul 1;148(1):3-15. (2010)
104. 劉懷旭; 九州大学修士論文(2016)
105. Xu Z, Liu E, Peng C et al, “Role of hypoxia-inducible-1 $\alpha$  in hepatocellular carcinoma cells using a Tet-on inducible system to regulate its expression in vitro.” *Oncol Rep*; 27(2):573-8. (2012)
106. 永尾雅哉, “酸素による遺伝子発現の調節” *タンパク質 核酸 酵素* Vol.41 No.16 (1996)
107. Yoshifumi Sato, Tomonori Tsuyama, Chinami Sato et al, “Hypoxia reduces HNF4 $\alpha$ /MODY1 protein expression in pancreatic  $\beta$ -cells by activating AMP-activated protein kinase” *Journal of biological chemistry*, Manuscript M116.767574 (2017)
108. Lukšan O, Dvořáková L, Jirsa M, “HNF-4 $\alpha$  regulates expression of human ornithin carbamoyltransferase through interaction with two positive cis-acting regulatory elements located in the proximal promoter.” *Folia Biol (Praha)*, 60(3):133-43. (2014)
109. Tadashi Kashiwagura, David F. Wilson, Maria Erecinska; “Oxygen dependence of cellular metabolism: the effect of O<sub>2</sub> tension on gluconeogenesis and urea synthesis in isolated rat hepatocytes” *Journal of cellular physiology* 120:13-18. (1984)
110. Ulrich C, Krüger B, Köhler H, Riegel W, “Effects of Acidosis on Acute Phase Protein Metabolism in Liver Cells.” *Miner Electrolyte Metab* 25:228–233 (1999)
111. Fanny Evenou, Teruo Fujii, and Yasuyuki Sakai, “Spontaneous Formation of Highly Functional Three-Dimensional Multilayer from Human Hepatoma Hep G2 Cells Cultured on an Oxygen-Permeable Polydimethylsiloxane Membrane” *TISSUE ENGINEERING: Part C* Volume 16, Number 2. (2010)
112. Mizumoto H, Amimoto N, Miyazawa T et al, “In vitro and ex vivo Functional Evaluation of a Hollow Fiber-type Bioartificial Liver Module Containing ES Cell-derived Hepatocyte-like Cells.” *Adv Biomed Eng* 7:18–27. (2018)
113. G.J.Todaro, J.E.DeLarco, H.Marquardt et al, “Control of proliferation in animal cells” *Hormones and cell culture*, vol 6 113. (1979)
114. Rotem, A., Toner, M., Tompkins, R. G. & Martin, L. Y, “Oxygen uptake rates in

- cultured rat hepatocytes". *Biotechnol. Bioeng*, 40:1286–1291. (1992)
115. Takahashi Y, Hori Y, Yamamoto T, Urashima T et al, "3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells." *Biosci*, May 7;35(3). (2015)
116. Kim K, Ohashi K, Utoh R, Kano K, Okano T et al, "Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets." *Biomaterials*. Feb;33(5):1406-13. (2012)
117. Ohkura T, Ohta K, Nagao T, Kusumoto K et al, "Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism." *Drug Metab Pharmacokinet*. 29(5):373-8. (2014)
118. Zhong L, Gou J, Deng N et al, "Three-dimensional co-culture of hepatic progenitor cells and mesenchymal stem cells in vitro and in vivo." *Microsc Res Tech*. Aug;78(8):688-96. (2015)
119. Okudaira T, Yabuta R, Mizumoto H, Kajiwara T, "Fabrication of a fiber-type hepatic tissue by bottom-up method using multilayer spheroids." *J Biosci Bioeng*. 123:739–747. (2017)
120. Xu Z, Liu E, Peng C, Li Y et al, "Role of hypoxia-inducible-1 $\alpha$  in hepatocellular carcinoma cells using a Tet-on inducible system to regulate its expression in vitro." *Oncol Rep*. Feb;27(2):573-8. (2012)
121. Jun Wu, Aida Platero-Luengo, Masahiro Sakurai et al, "Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells" *Cell*. 168, 473–486. (2017)
122. Kimberly A. Homan, David B. Kolesky, Mark A. Skylar-Scott et al, "Bioprinting of 3D Convulated Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips" *Scientific Reports* volume6, Article number: 34845. (2016)

## 謝辞

本研究を行うにあたり、的確な御指導を賜るとともに、専門的な立場からときに優しく、ときに厳しく、丁寧かつ的確に御指導頂きました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 水本 博 准教授に厚く御礼申し上げます。

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機械工学部門 工藤 奨 教授、九州大学大学院工学研究院化学工学部門 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、的確な御指導を賜るとともに、広い視野を持つことの重要性和、常に高いレベルを意識することの大切さを教えて下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 教授に厚く御礼申し上げます。

研究を行うことの意義を教えて頂き、異なる視点からアドバイスを下さった九州大学大学院工学研究院化学工学部門 名嘉山 祥也 准教授に厚く御礼申し上げます。

研究室に所属した当初から、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））、奥平達也氏（現 アステラス製薬株式会社）に深く感謝申し上げます。

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、中野優史、松下沙希子氏、劉懷旭氏（本学大学院博士課程）、中野壮一郎氏、赤岡智彬氏、江本雄一氏、藪田涼平氏、森汐理氏、中尾建太氏、岳玥氏、徐炎氏、王相維氏（本学大学院修士課程2年）、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、盛建凱氏、李伊童氏（本学大学院修士課程1年）、石橋知樹氏、佐々木浩二氏、志藤千紘氏、塚本壮太郎氏、宮嶋麻由氏（本学4年）、呂博氏（本学研究生）には感謝するとともに今後の活躍を期待しております。

最後に学生生活を支えてくれた、またこれからの社会人生活も支えてくれる両親をはじめ、親族の皆様、友人に感謝し謝辞といたします。