

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17591351
 研究課題名(和文) ヒト分離培養胆道上皮細胞を用いた人工胆道モデルの作成と胆管損傷修復機序の解明
 研究課題名(英文) Making of the bio-artificial biliary tract model using human isolated biliary epithelial cells and elucidation of biliary tract restoration mechanism
 研究代表者
 石田 祐一 (ISHIDA YUICHI)
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30260946

研究成果の概要： ヒト分離胆道上皮細胞(BEC)による3次元胆管様管腔構造再生過程を長期観察する為に、ヒト肝腫瘍由来有機能肝細胞株(FLC4)との共培養モデルやヌードマウスの皮下・腹腔・脾臓内接種モデルを作成したが、いずれも BEC による胆管様管腔構造の形成は認めなかった。胆道損傷修復機序解明モデルで BEC の胆道上皮欠損部への再生過程を観察した。BEC は上皮欠損部に棘状突起を出し隣接する BEC 同士が棘状突起を介して連結しながら BEC 数を増していく過程が確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	900,000	0	900,000
2006 年度	800,000	0	800,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学／外科学一般

キーワード：再生医学、胆道上皮細胞、人工胆道、胆管再生

1. 研究開始当初の背景

脳死肝移植で小児に部分肝移植したとき生じた残存肝や移植不適例などより提供された正常な肝臓をコラーゲナーゼ消化法でヒト肝細胞、濃度勾配法と免疫学的手法(主に Monoclonal Antibody を使用)を併用することで95%以上高純度のヒト胆道上皮細胞 (BEC) を単離し継代維持することが可能となった。この BEC をヒト肝細胞

とコラーゲン複層ゲル内で共培養すると BEC が1層に配列した3次元の胆管様管腔構造を形成した。一度細胞レベルまで分離した BEC が胆管様管腔構造を再生する上で必要な培養環境や液性因子について検討したところ human hepatocyte growth factor (hHGF)、Fetal calf serum (FCS) とヒト肝細胞との直接接触が重要な因子と判明した。

そこで BEC をヒト肝細胞と至適条件下で共培養することで、分離された BEC が胆管への再生する過程を長期的に観察しようと試みた。しかし初代分離培養ヒト肝細胞の形態学的崩壊が始まる培養 7 日目頃から BEC の 3 次元管腔様構造の形成が止まり、その後崩壊した為、長期的な胆管再生の観察は困難であった。以上のような背景から今後長期的に胆管再生を観察しうるモデルの開発は人工胆道モデル作成という目標に対して非常に重要な命題であると考えられた。

再生医学は 21 世紀の医療にとって大きなフロンティアであり、これらの技術の実用化によるインパクトは従来の医療の在り方を大きく一変させる可能性を秘めている。Tissue Engineering の技術発展は目覚ましく、構造機能だけあれば良い皮膚・軟骨・血管・角膜・脂肪組織・腱などの第 1 次 Tissue Engineering 製品群の一部は既に実用化ならびに商品化されている。胆嚢や胆管などの代謝機能を有する臓器や組織は、第 2 次 Tissue Engineering 製品群に分類され、この第 2 次 Tissue Engineering 製品群の作成には異種細胞間相互の情報伝達と制御が必要であり、何段階もの技術的ブレークスルーが必要と考えられている。これまで人工胆道についての研究報告例はきわめて少ない。しかし外科領域で経験する胆道損傷後の良性胆管狭窄は、強固な炎症性癒着のため再建に苦労することが少なくない。また肝門部胆管空腸吻合術などの再建手術後は、十二指腸ファーター乳頭括約筋による逆行性感染防止機能が失われるため胆管炎を繰り返す症例を経験する。このため胆管損傷に対して人工胆道による損傷胆管の置換のみで修復が可能となれば、手

術が簡便となり胆管炎などの感染症の低減にも繋がり得る。

外科領域で経験する術後胆管狭窄の原因としては、組織の血流障害や胆道上皮の欠損による癒痕形成などが原因としてあげられる。こうした環境に胆管再生を促すには細胞の置かれる場（環境）が非常に重要であると言われている。胆管狭窄が生じるような厳しい場（環境）での胆道上皮細胞の修復過程を検討するため胆道損傷修復機序解明モデルを作成したいと考えた。

本研究が、当施設の高純度のヒト胆道上皮細胞を分離し継代維持することが可能であるという利点を生かして人工胆道作成の一助となることを期待している。

2. 研究の目的

上記背景より次のような 3 つの研究目的を設定した。

(1) 初代分離培養ヒト肝細胞に替わって不死化したヒト由来有機能肝細胞株 (FLC) で共培養して、長期的に胆道上皮細胞による胆管様管腔構造再生について観察する。また胆道上皮細胞が、非自己肝細胞である FLC との共培養でも胆管様構造を再生した場合、再生にはどのような因子が重要か検討する。

(2) ノードマウスの皮下、腹腔内または脾臓内に BEC を移植し、胆管様構造を再生するか検討する。培養液中に一定の濃度に希釈またはコラーゲン・ゲル (0.408mg/ml) の中に包埋した BEC を、非自己であるノードマウスの皮下・腹腔内そして脾臓内に注入する。一定期間 (1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月間) マウスを飼育後犠牲死させて BEC を移植した皮下組織、腹膜そして脾臓を摘出し BEC の再生の有無を光学顕微鏡または走査電子顕微鏡で観察し形態学的な検討をする。

(3)BEC をプラスチックシャーレまたはコラーゲン・ゲル上で confluent な状態に培養し、その後人工(為)的に BEC 欠損部を作成する。この BEC 欠損部に対して BEC が二次元的に再生していく様子を継時的に位相差顕微鏡で観察する。

3. 研究の方法

(1) BEC の分離

英国での脳死肝移植で生じた残存肝組織や適応したレシピエントがいなかった肝臓の提供を受け、Joplin ら¹⁾の方法に従って濃度勾配法と免疫学的手法(主に Monoclonal Antibody を使用)を併用することで、95%以上の純度の BEC を単離し継代維持した。具体的には、約 30g の肝臓組織を細切し、1mg/ml の collagenase(Sigma type1A) 溶液の中で 37°C、1 時間静置する。Fine mesh のついた濾過器で collagenase によって消化した溶液を濾過した後、PBS でさらに濾過器を洗浄し濾液として回収する。こうして回収した濾液を、等量の 1.04g/ml と 1.09g/ml 濃度で 2 層にした Percoll 液の最上層に重層後、800g で 30 分間遠心分離する。BEC を含む間葉系細胞は、濃度の違う Percoll 液の中間に薄層として分離される。この薄層を抽出後、5ng/ml HEA125 (Progen Biotechnik GMBH, Heidelberg) と 10⁷ sheep anti-mouse IgG1-coated Dynabeads (Dyna1 UK.Ltd) を注入して BEC のみを選択的にラベルする。次に磁石を使用して抗体にラベルされた BEC のみを選択的に抽出する。

2) ヒト肝腫瘍由来有機能肝細胞株(FLC4)の準備

FLC4 は 51 歳男性の肝細胞癌の手術材料より樹立された肝癌細胞株である²⁾。FLC4 は ASF104 serum-free medium (Ajinomoto

Co.,Ltd.,Tokyo,Japan) によって 5%CO₂, 37°C で維持される。この細胞の単離・継代には、25 USP units/ml trypsin(Difco Co.,Ltd) と 0.02%EDTA 溶液を使用する。6 well culture plate に seeding するときは、各細胞を指定された培地を使用して 5x10⁵ cells/well/2ml の濃度に調整する。

3) BEC と FLC4 との共培養について

培養には直径 35mm の 6 well culture plate を用い、1ml のラット尻尾由来のコラーゲン・ゲル TYPE 1(BD Biosciences) を底に敷いて第 1 層とする。第 1 層上に各細胞を seeding 後、さらに最上層となる 0.6~0.8ml のコラーゲン・ゲルを敷いてコラーゲン複層ゲルとする。

FLC4 は plating medium として ASF104 serum-free medium 2ml を seeding 後 48 時間静置する。BEC は plating medium として 2ml の 45% Ham's F12 medium, 45% Dulbecco's modification of Eagles' medium(DMEM), 10% fetal bovine serum, 10ng/ml hepatocyte growth factor, 10ng/ml epidermal growth factor, 5 μg/ml insulin, 0.4 μg/ml hydrocortisone, 10ng/ml cholera toxin, 24.3 μg/ml adenine と 2 x10⁻⁹M tri-iodo-thyronine を含有する溶液を培地として用いる。BEC も seeding 後 24 時間静置し、最上層にコラーゲン・ゲルを敷く。最上層にコラーゲン・ゲルを敷いた後は、2ml の growth medium で維持し 1~2 日/回の割合で交換する。Growth medium の組成は、BEC の plating medium で 10% であった fetal bovine serum を 5%として DMEM と Ham's F12 medium の組成を 47.5%ずつに変更したもので、他の組成は BEC の plating medium と全く同様である。

4) コラーゲン・ゲル内の各細胞の状態と BEC の胆管様管腔構造形成の観察について

コラーゲン複層ゲル内の FLC4 の状態と BEC の胆管様管腔構造形成の有無を毎日、位相差顕微鏡 (X40) で観察し記録する。

5) ノードマウスの皮下・腹腔・脾臓内接種モデルを作成

5×10^5 cells/0.1ml の BEC が入った growth medium を 0.1ml の PBS またはコラーゲン・ゲルに混ぜてツベルクリン注射筒内に準備した。用意した BEC 溶液各 0.2ml (5×10^5 cells/body) をノードマウスの皮下・腹腔内そして脾臓内に注入して 1 ヶ月・2 ヶ月・3 ヶ月間飼育後犠牲死させ、その皮下組織、腹膜そして脾臓を摘出し、肉眼的・光学顕微鏡そして走査電子顕微鏡で形態学的な観察をする。

6) 胆管損傷時の修復機序の解明

プラスチックシャーレ上またはコラーゲン・ゲル上の中央にカバーガラスを置いた状態で BEC を蒔き confluent な状態になるまで増殖させる。その後、カバーガラスを除去して人工的に BEC 欠損部分を作成し、その欠損部の BEC による修復過程を位相差顕微鏡で経時的に観察して胆道損傷修復機序を検討する。

参考文献

1) Joplin R, Strain AJ, Neuberger] JM. Immuno-isolation and culture of biliary epithelial cells from normal human liver. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25:1189-1192.

2) 蓮沼 哲、筋野 甫、永森静志、亀田治男 ヒト肝細胞癌由来細胞株 JHH-4 株の樹立とその性状. *Human Cell* 1988;1(1):98-100

4. 研究成果

1) FLC と BEC の共培養による BEC の胆管様管腔構造の再生について

まず予備実験として、FLC と BEC の再生に重要な因子の評価を行なった。FLC と BEC の培養に影響を及ぼしうる環境因子として、FCS、hHGF、EGF の 3 者を培養液中に入れ位相差顕微鏡による形態学的変化で評価した。FLC は、FCS、hHGF、EGF の培養液中の有無で特に形態学的な変化は観察されなかったが、培養液中に FCS が含まれたほうが、viability が良く、HGF が含まれたほうがよく増殖する傾向を示した。一方、BEC は FCS がないと培養 7 日目から viability が低下した。hHGF が加わると BEC は細い棘状の突起を周囲に出して周囲の BEC と連結する像が観察され、BEC の増殖速度も増した。FCS の添加で長期培養が可能になったが、EGF による形態学的変化は特に観察されなかった。次に、自己増殖能のある FLC と BEC の共培養での細胞数の割合を予測するために、各細胞の増殖曲線を作成した。FLC と BEC の培養 0, 1, 2, 3, 4, 7 日目の増殖率は、FLC が 1.0、0.65、1.53、4.2、7.3、18.3 で BEC の増殖率は、1.0、1.22、1.86、3.4、5.39、6.25 であった。両細胞ともに倍加時間はほぼ 48~72 時間の範囲で、培養 7 日目の FLC は BEC の平均増殖率の約 3 倍であった。FLC は肝細胞癌由来で樹立された細胞株であるため増殖が速いと考えられた。

正常肝臓では、胆道上皮細胞数は全肝細胞のおよそ 3~5% であることから培養 1 週間目で培養細胞が confluent となったときの FLC と BEC の細胞比率が正常ヒト肝臓と同様になるように細胞比率 (FLC:BEC) 6:1 でカルチャープレートに蒔いて、経時的に BEC の再生を位相差顕微鏡で観察した。培養開始後数日は FLC の増殖が目立ち顕微鏡視野のほとん

どを FLC の細胞塊が占めた。BEC は集束して敷石状の塊を徐々に形成しながら先に広範囲に細胞数を増した FLC の塊を圧迫するように成長した。BEC の各細胞からは細い突起を出して隣接する細胞と連結しているように観察された。ほぼ1週間で細胞は confluent となった (図1)。その後第3週目まではほとんど形態学的な変化を認めなかったが、第4週目になると FLC, BEC 共に viability が低下し、5週目以降は形態学的観察を継続することは困難であった。観察しえた5週間で BEC が、3次元の胆管様管腔構造を形成することは無かった。長期間の形態学的観察が困難である原因は、培養スペースの大きさが一定であるため細胞数を増やし続ける2種類の細胞株の共培養では空間的限界が生じることが主要な原因と考えられた。この空間的な問題を解消するために培養環境の変更が必要であり環境(場)をカルチャープレートからマウスなどの動物に変更して検討する方針とした。

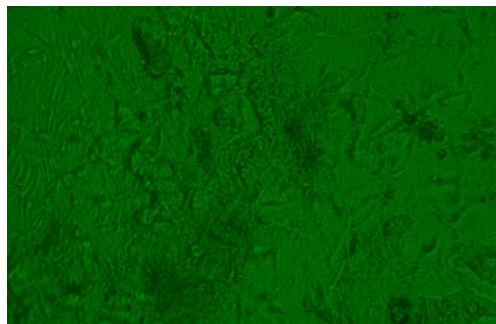


図1: FLC と BEC との共培養 (18 日目、X40)

2) ノードマウスの皮下・腹腔・脾臓内接種モデルによる BEC の胆管様管腔構造の観察

ノードマウスの皮下、腹腔と脾臓内に BEC を PBS 溶液またはコラーゲン・ゲル内に混在させ各臓器に 5×10^5 個/body ずつ接種後、1・2・3ヶ月経過したところでマウスを犠牲死させて BEC を接種した各臓器を摘出した。な

お各臓器摘出前に右心耳の切開脱血と心室穿刺による生理食塩水と固定液による灌流を行ない組織から赤血球を排除する処置を行なった。BEC を皮下に接種したマウスの肉眼所見で皮下硬結を形成したマウスがあったがその出現は一部のマウスのみで一定しなかった。脾臓内に BEC またはコラーゲン・ゲルを接種した群は、コントロールの脾臓と比較して軽度脾腫を認めた。

皮膚(皮下)、腹膜のBEC接種部位を光学顕微鏡で観察したが1~3ヶ月の何れの時期においてもBECの増殖を示す所見はなく、BECの痕跡も観察されなかった。脾臓内接種群では BEC とコラーゲン・ゲルを一緒に接種した群において1ヶ月目に摘出した脾臓内で BEC の紡錘形細胞塊を認めた (図2)。

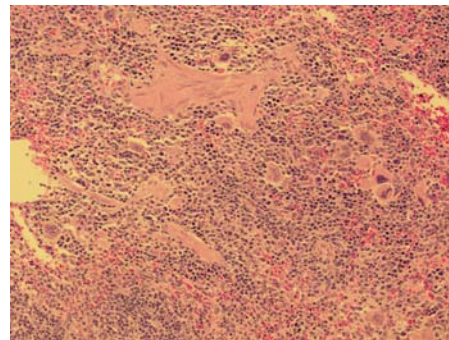


図2: BEC とコラーゲン・ゲルを脾臓内接種後1ヶ月 (HE X200)

しかしこれらのBECの細胞塊は2,3ヶ月と接種観察期間を延長してもBEC細胞塊の増大や胆管様管腔構造を形成する所見は得られなかった。BECをPBSと一緒に接種した場合でも1ヶ月目の脾臓内にBECの細胞塊は観察されたがBEC+コラーゲン・ゲルの細胞塊と比較するとその大きさは小さかった。光学顕微鏡でBECの細胞塊が観察された脾臓の断面を走査電子顕微鏡で検討した。脾臓摘出前に右心耳を切開し体内循環血液を十分に洗い出ししてから灌流固定したが、これらの処置を行な

っても脾臓内赤血球の排除は十分ではなくさらなる工夫が必要と考えられた。今回の走査電子顕微鏡での検討では、脾臓内に明らかなBECの細胞塊や胆管様管腔構造は観察されなかった。本実験でBECの再生が観察されなかった原因として①観察期間が短い可能性 ②腹腔内（腹膜下）接種では、BECが散逸してしまい細胞塊の形成に至らなかった可能性 ③脾臓内赤血球除去の徹底 ④コラーゲン・ゲルの至適濃度の検討などが必要と考えられた。

3) 胆管損傷修復解明モデルによるBEC欠損部修復の観察

プラスチックシャーレ上またはコラーゲン・ゲル上の中央に人工的に胆道上皮細胞欠損部分を作成した胆管損傷修復解明モデルの胆道上皮欠損部分とconfluentとなったBEC塊の境界を位相差顕微鏡で継時的に観察した。プラスチックシャーレ上（図3）、コラーゲン・ゲルthin coating上またはコラーゲン・ゲル上（図4）BECは上皮欠損部に棘状突起を出し隣接するBEC同士が出した棘状突起を介して連結しながらBEC数を増していく過程が確認された。

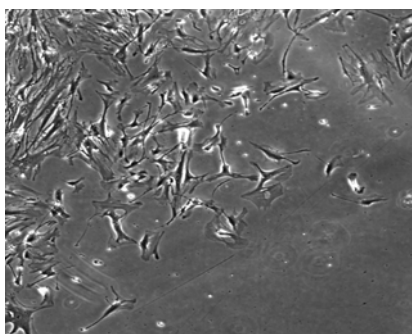


図3 プラスチックシャーレ上
(10日目、X40)

上皮欠損部への棘状突起の増殖とBEC数の増加は、コラーゲン・ゲル上よりプラスチッ

クシャーレ上の方が著しかったが、この原因としてはコラーゲン・ゲル上の方が上皮欠損部境界に段差（高低差）が生じやすく、この段差がBECの棘上突起やBEC数増加の妨げとなった可能性が考えられた。

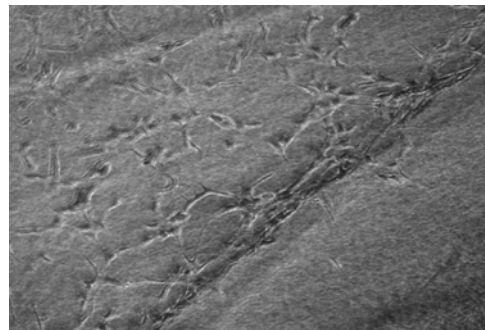


図4 コラーゲン・ゲル上
(培養10日目、X40)

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計2件）

①石田祐一、矢永勝彦、柴 浩明、脇山茂樹、三澤健之、大木隆生 ヒト分離肝細胞を用いたバイオ人工肝補助装置実現の可能性について 第108回日本外科学会総会 長崎 2008年5月16日 日本外科学会雑誌 第109巻臨時増刊号(2)P265 2008

②石田祐一、矢永勝彦 ヒト分離胆道上皮細胞による胆道の再生医療への応用 第61回日本消化器外科学会定期学術集会 横浜 2006年7月13日 横浜 日本消化器外科学会雑誌 Vol. 39 No. 7 P448(1184) 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 祐一 (ISHIDA YUICHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号 30260946

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし