

平成22年6月7日現在

研究種目： 基盤研究(B)  
 研究期間： 2007～2009  
 課題番号： 19360371  
 研究課題名（和文） 血流を積極的に導入する再構築形肝組織移植デバイスの  
 実現可能性検証  
 研究課題名（英文） Feasibility of implantable liver tissues  
 having a vascular-like blood flow network  
 研究代表者  
 酒井 康行 (SAKAI YASUYUKI)  
 東京大学・生産技術研究所・教授  
 研究者番号： 00235128

研究成果の概要（和文）： 三次元培養と液性因子を組み合わせることで、ラット胎児肝細胞の生体外での機能的成熟化を大幅に促進できた。また、酸素要求性を十分に満たしつつも、実際の酸素暴露濃度を成熟段階に応じて調整することで、胎児肝細胞集団の持つ自己組織能力を最大限に発揮させることに成功した。ホスト血流を導入するデバイスについては、血球成分と移植肝細胞との接触を制限しつつ物質交換を行わせることの重要性が示された。

研究成果の概要（英文）： Combination of 3D culture and soluble factors was very effective in maturation of fetal rat hepatocytes in vitro. Oxygen supply at appropriate exposure concentrations was also important to fully utilize the self-organization capacity of such hepatocyte progenitor population. Control of blood cell-to-implanted hepatocytes was shown to be a crucial issue in designing and engineering of implantable pre-vascularized liver tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野： 工学  
 科研費の分科・細目： プロセス工学 生物機能・バイオプロセス  
 キーワード： 肝組織工学，胎児肝細胞，移植，三次元担体，液性因子，  
 酸素供給，血流導入

## 1. 研究開始当初の背景

組織工学・再生医療は皮膚や軟骨といった二次元的または低代謝の組織については成功を見ているが、複雑な三次元的構造とリットル単位の大きさを高い代謝能を持つ高い

肝や腎・肺といったヒト大型内臓の再構築に関する研究は依然として進んでいない。このような大型臓器の再構築においては、最終的な目標は、ドナー臓器移植手術と同様に、血管系への接続手術を介して移植直後から血

流を確保することが前提となる。肝細胞またはある程度培養した肝組織を肝・腹腔や脾臓に移植する実験は多数あるが、移植と同等なプロセスを想定し、血流を積極的に導入する移植実験は報告がない。

肝臓では、体積当たりの肝機能を *in vivo* 肝と同レベルに持ち込めた場合でも、肝 1.5 L の約 1/3 の 500 cm<sup>3</sup> 程度の組織を再構築する必要がある。このための第一の課題は、生体吸収性ポリマーからなる担体の三次元造形である。ここでは、生体肝と同様の細胞密度にある細胞の機能を最大限に引き出すために、血管に類似した流路ネットワーク構造の配備が必須である。例えば Langer らは、二次元平面に数十  $\mu\text{m}$  オーダーの微細構造パターンニングを施し、完全に *in vivo* と同じ微細度の肝毛細血管構造を構築しようとしているが (Tissue Eng., 2001), 意義ある三次元化には至っていない。一方、三次元造形の精度は通常は数百  $\mu\text{m}$  程度であり、*in vivo* 用の三次元微細構造を完全に人工的に構築するのは中期的にも不可能と見てよい。従って、*in vitro* においてはマクロな流路構造を持つ担体を用いてある程度の組織形成を行っておき、移植後に *in vivo* の旺盛な血管新生能を利用することで毛細血管系の構築を達成するというアプローチ、が現実的である。

第二の課題は、適切な細胞ソースの選定である。有望な技術は、iPS/ES 細胞といった幹細胞や骨髄等から得られる間葉系幹細胞からの肝細胞の分化誘導で、すでに国内外の複数グループがプロトコールを示しているが、成熟肝レベルの高機能を獲得できておらず再現性にも乏しい。一方、胎児由来の肝前駆細胞は、すでに肝分化に明確にコミットされた集団であり、肝組織構築のための十分な量が確保できる可能性が高い。われわれは既に、適切な液性因子の存在下での小スケールの三次元培養において、マウス (Cell. Transplant, 2002) とブタ (Cell. Transplant, 2006) について、新生児レベルへの *in vitro* 分化誘導に成功してきている。しかしながら、血流を積極的に導入する肝組織の可能性検証については、移植系の確立が困難と予想されたことから、取り組んでこなかった。この検証のためには、ラットでの三次元培養条件を確立する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、血流を積極的に導入する再構築形肝組織の構築を目指し、*in vitro*・*in vivo* における組織形成プロセスを相互に最適化することを通じて、その実現可能性を示すことを最終目的とする。具体的には、まずは、*in vitro* で肝前駆細胞を育成することで、機能・組織形成の最適化をめざす。次に、この *in vitro* 構築肝組織デバイスを生体内に埋め

込むことにより、*in vivo* での組織のさらなる再構成を期待し問題点を抽出する。ここで得られる知見は、組織工学的に作製された大型臓器を移植するという治療プロセスを、大動物を用いたヒト前臨床研究へと展開するために、必須の研究過程である。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット肝前駆細胞の三次元培養系確立

胎生 15 日または 17 日のラットを用いる。体積 0.1 cm<sup>3</sup> のポリ乳酸製の多孔質ディスク状三次元担体を用いた振とう三次元培養と、通常のコラーゲンコートディッシュ上での二次元培養とを並行して行い、増殖・アルブミン合成能・チトクローム P450 活性等の機能を測定、成熟ラットのそれらと細胞あたりで比較を行う。アルブミン合成能は ELISA 法にて、チトクローム P450 (CYP) 活性は、エトキシレゾルフィンの脱エチル化反応の活性 (EROD 活性) にて、それぞれ評価した。培養液中には、肝細胞成長因子 (HGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) の 1 または 4、酪酸ナトリウム等を添加し、14 日まで培養を行った。その他の培養系として、透明な酸素透過性材料であるポリジメチルシロキサン (PDMS) からなる膜を底面とするプレートを作成し、同様に二次元培養を行った。

### (2) マウス ES 細胞の肝分化誘導における酸素濃度と三次元化

肝分化誘導は、国立がんセンター研究所の落谷孝広らが確立した液性因子に関する分化誘導条件 (Yamamoto, H. et al., Hepatology (2003)) を用いた。これは、胚葉体 (EB) を介さない二次元培養による方法で、内胚葉系への分化 (ステップ I)、幼弱肝細胞への分化 (ステップ II)、更なる分化 (ステップ III)、成熟化 (ステップ IV) の 4 段階からなり、それぞれ液性因子と表面コートのマトリックス物質を変えて約 1 ヶ月の培養を行うものである。ここでは、それぞれのステップで培養気相中酸素濃度を 5% と通常の 21% に変える実験を行った。また、(1) と同様の担体を用いる三次元化の開始時期を、細胞の回収操作が行われるステップ I の始め・II の始め・III の始めで変える実験も行った。肝分化評価は、細胞の形態・主要マーカーの発現量にて行った。

### (3) 肝組織移植デバイスの構築と評価

2 系統あるラット頸動脈に挿入することを前提とし、1 本のチューブ (直径 1 ミリ) の周囲を囲むように (1) と同様の PLLA 製の多孔質担体を配置、全体を蜜蝋で固めた。長さ約 5 ミリ・直径約 3 ミリであった。チューブは、切れ込みを入れて細胞の交換が十分に可能なものと、1  $\mu\text{m}$  の孔径を持つ PTFE チューブ、5  $\mu\text{m}$  の孔径をセルロースチューブ (細胞培養用のホローファイバ) の二種類を

用いた。移植後、2週間でデバイスを摘出し、パラフィン包埋後切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット肝前駆細胞の三次元培養系確立

胎生17日の胎児肝から肝細胞画分を得て、コラーゲン上二次元培養(2D)および体積0.1 cm<sup>3</sup>のポリ乳酸製の多孔質ディスク状三次元担体を用いた振とう三次元培養(3D)の機能比較を行った。FGF-1, FGF-4, HGFに加えて酪酸ナトリウムを添加した培養液で2D培養を行ったところ、これらの因子無添加では、線維芽細胞の増殖が支配的であったに対し、因子添加で明瞭な細胞間隙構造と核をもつ小型の典型的な肝前駆細胞集団への分化を誘導することが可能となった(図1)。また3D培養とこの培養液を組み合わせることで機能発現に相乗的効果が見られた(図2)。2週間分化誘導後に成熟ラットと単位細胞あたりで機能を比較したところ、アルブミン合成ではほぼ同等、チトクロームP450活性(EROD活性)では約半分程度であった。

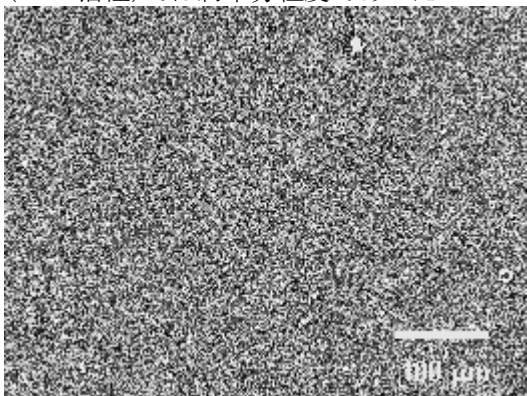


図1. 因子存在下での2D培養6日目のラット胎児肝細胞の形態。

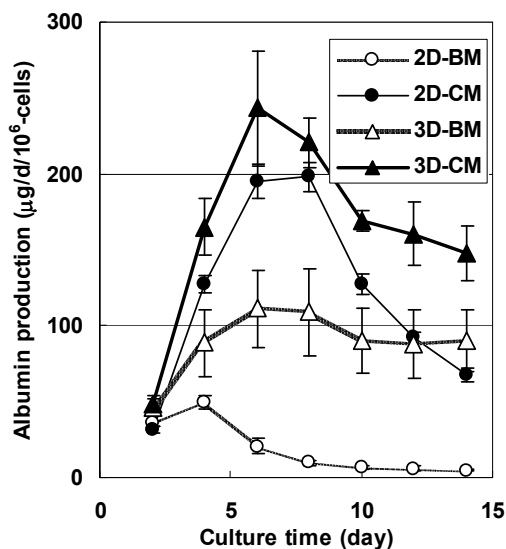


図2. アルブミン合成能の変化。

続いてPDMS製膜上で、2D培養を行った。細胞は自己組織的に増殖分化し、線維芽細胞やマトリックス物質からなる下層と肝実質細胞からなる上層の厚い層構造が構築された。この構築挙動はガス雰囲気中酸素濃度に依存し、5%では下層の発達が、20%では上層の発達がそれぞれ促進され、始めの1週間を5%、以後2週間まで20%とした培養条件が最も厚く機能的にも優れたシート状の組織を形成させた。これは三次元担体等を用いなくとも、そのまま移植できる強度をもつものであり、その利用が期待された(図3)。

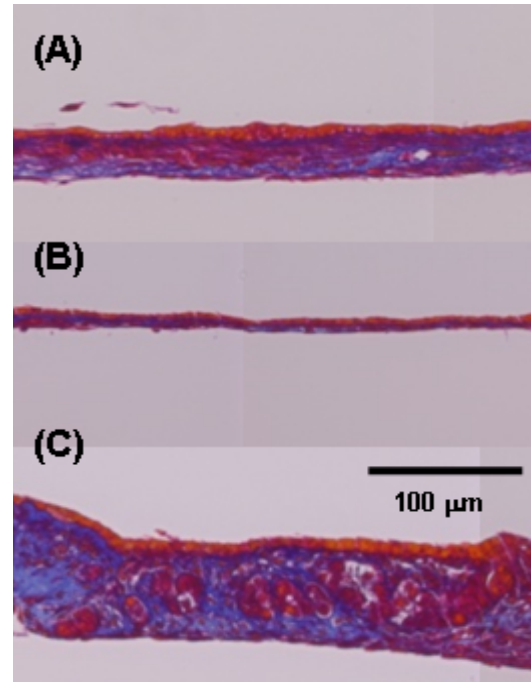


図3. PDMSプレートをを用いた底面からの酸素供給培養15日目におけるラット胎児肝細胞の組織形成。(A), 5%酸素;(B), 21%酸素;(C), 5%→21%酸素(8日目に変更)。

##### (2) マウスES細胞の肝分化誘導における酸素濃度と三次元化

国立がんセンター研究所の落谷孝広らが確立した液性因子に関する4ステップの分化誘導プロトコールを基礎として、酸素濃度(5および21%)と三次元化の開始時期について、さまざまな条件で分化誘導を行った。その結果、初期の内胚葉系分化・幼弱肝細胞の出現等のステップ(ステップI~III)では低酸素濃度が、その後の肝細胞の形態学的・機能学的成熟化においては高酸素濃度がそれぞれ望ましいことを見出した(図4・5)。しかしながら、形態学的に見た最終的な分化誘導効率も現状20%程度で、かつ再現性が著しく低い等の問題が明らかとなった。



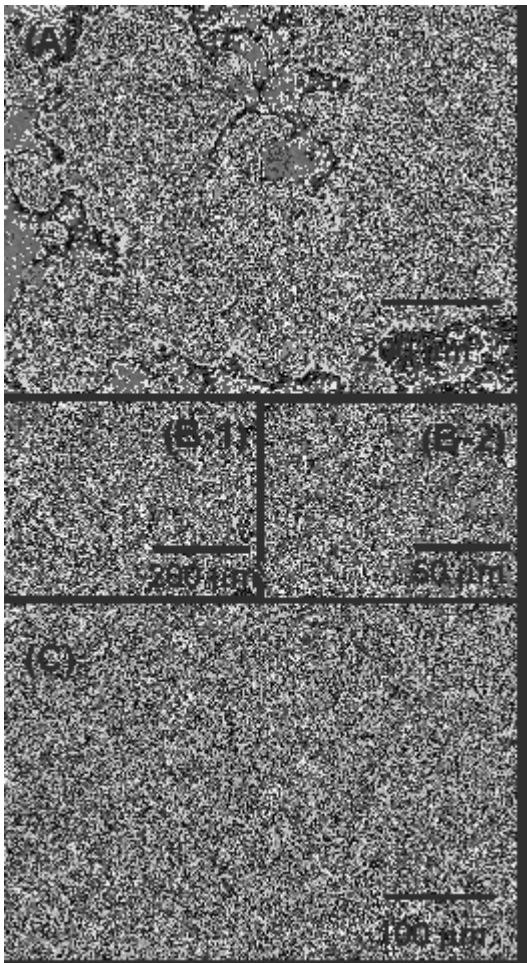


図4. 酸素 5%-5%-5%-20%の条件におけるマウス ES 細胞からの肝分化. (A), 内胚葉系細胞への分化 (3 日目); (B-1, 2), 幼弱肝細胞の出現 (6 日目); (C), 成熟化 (15 日目).

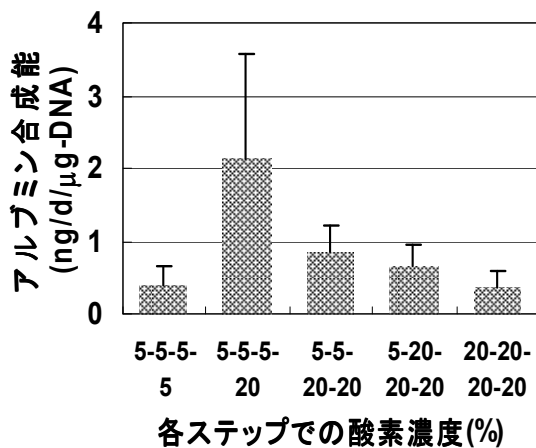


図5. 30 日間培養後のアルブミン合成能.

三次元化については、予想に反して、初期から (ステップ I 終了時) からポリ乳酸三次元担体に巻き直し 3D 培養を行ったものが、30 日間培養後の機能学的分化が高いという結果を得た。これは、結局 in vivo 様の EB

様構造を経る分化誘導プロトコールの方が、EB 構造を介しないものより、少なくとも現状では分化制御の安定度が高いことを示唆していると考えられた。3D 培養では、中心部に肝細胞と見られる集団が出現し、その一部は二核化していた (図6)

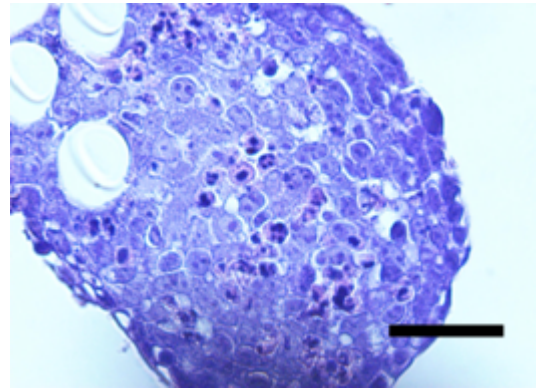


図6. 三次元培養の 30 日後の切片 HE 染色.

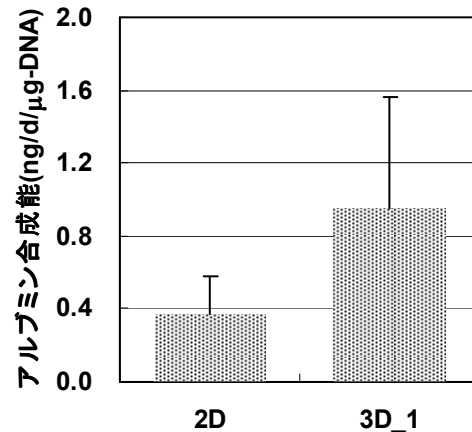


図7. マウス ES 細胞の 2D・3D 培養での 30 日目のアルブミン合成能. 3D 培養は 3 日目 (ステップ I 終了時) から開始したもの.

### (3) 肝組織移植デバイスの構築と評価

移植部位については、門脈・下大静脈間および頸動脈間について、まずは手術の実現可能性から検討を実施し、まずはその容易さから 2 本のうち 1 本の頸動脈間へのデバイス移植を行うこととした。ここに移植可能なデバイスとしては、テフロンチューブと三次元担体を組み合わせ、全体を蜜蝋にて被覆したものとした (図7)。移植直前にヘパリン化を行うことで、当面の抗血栓性の確保を行った。本年度においては、細胞なしのデバイスを用いて術式の習熟を行い、手術による動物死亡を 20%以下にまで留めることができた。

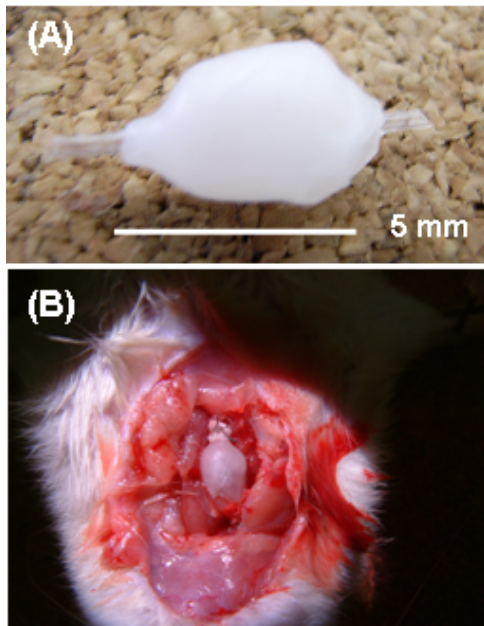


図8. ラット頸動脈への移植デバイス. (A), 外形; (B), 移植手術終了時.

この移植方法とデバイスとを用いて、胎生17日および15日のラット胎児肝から上記の培養条件にて2週間分化誘導した後について、移植実験と解析とを行った。しかしながら、三次元担体内への血流の直接導入において、担体内部での溶血および炎症反応によると思われる固定化肝前駆細胞の生存性悪化が観測された。これは、より増殖能・組織再構築能の高い胎生15日の肝細胞を用いることで、若干の改善は見られたものの、同様の生存率悪化はやはり顕著であった(図9)。

そこで対策として、人工的な微細流路に導入しながらも、半透膜等を用いて三次元担体に固定化された肝前駆細胞と血流とを分離する改良型デバイスを作成し、移植による高度な肝組織構築を試みた。孔径1 $\mu\text{m}$ (PTFE)および5 $\mu\text{m}$ (セルロース)の半透膜チューブを用いて、移植肝細胞の生存性を著しく向上させることができた(図9)。

しかしながら、一方でこの事実も、もし移植直後から血流を積極的に導入する組織構築を目指した場合には、血管ネットワークと三次元細胞固定部とを明確に区別し、周皮細胞等で安定的に裏打ちされた血管内皮細胞層にて血液流路を完全に被覆、血球成分の漏れを防止しておくことの必要性を強く示唆するものである。このことは、残念ながら、血管配備型組織再構築をより困難なものとするところになる。

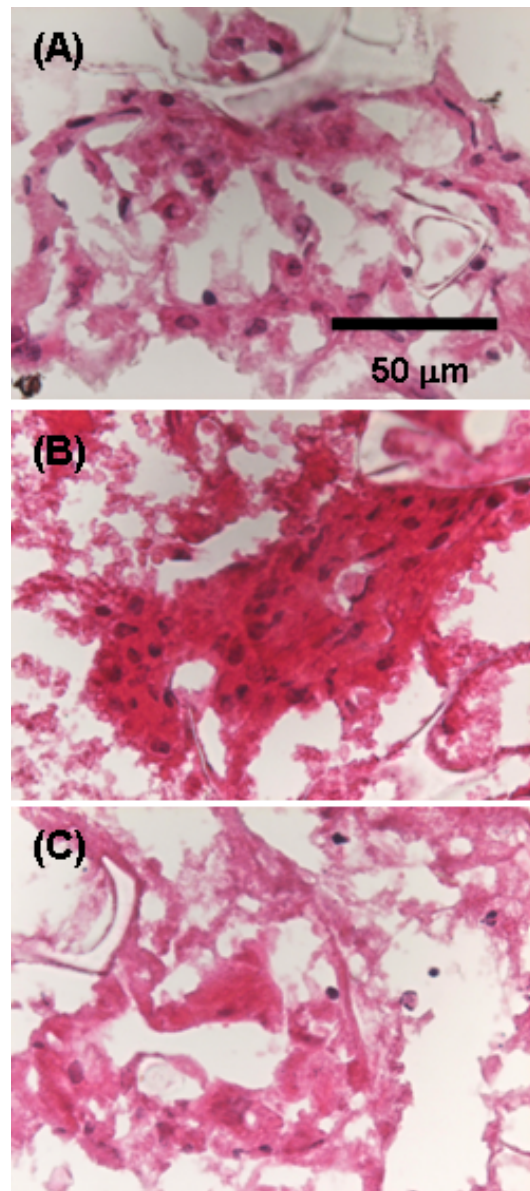


図9. 移植後2週間で回収した組織のHE染色像. (A), 血液と細胞担持部に境界のないもの; (B), 血液と細胞担持部に孔径1 mmの膜を設けたもの, (C), 血液と細胞担持部に孔径5 mmの膜を設けたもの.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① M. Hamon, S. Hanada, T. Fujii, Y. Sakai, Direct oxygen supply with poly dimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells in vitro, 査読あり, Cell Transplant., in press.
- ② T. Katsuda, T. Teratani, T. Ochiya, Y. Sakai, Transplantation of a fetal liver cell-loaded hyaluronic acid sponge onto

the mesentery recovers a Wilson's disease model rat, 査読あり, J. Biochem., in press.

- ③ Y. Sakai, H. Huang, S. Hanada, T. Niino, Toward engineering of vascularized three-dimensional liver tissue equivalents possessing a clinically-significant mass, 査読あり, Biochem. Eng. J., **48**, 348-361 (2010).
- ④ 勝田毅, 小森喜久夫, 酒井康行, 胚性幹細胞を用いた肝細胞分化誘導研究の現状, 査読なし, 生産研究, **61**(2), 116-121 (2009).
- ⑤ S. Hanada, N. Kojima, Y. Sakai, Soluble factor-dependent in vitro growth and maturation of rat fetal liver cells in a three-dimensional culture system, T 査読あり, Tissue Eng., **14**(1), 149-160 (2008).
- ⑥ C. Provin, K. Takano, Y. Sakai, T. Fujii, R. Shirakashi, A method for the design of 3D scaffolds for high-density cell attachment and determination of optimum perfusion culture conditions, 査読あり, J. Biomech., **41**(7), 1436-1449 (2008).
- ⑦ 花田三四郎, 酒井康行, 組織工学的手法を用いた肝組織再構築に関する研究の現状と課題, 査読なし, 生産研究, **60**, 147-151 (2008).

[学会発表] (計 8 件)

- ① 勝田毅, 寺谷工, 落谷孝広, 酒井康行, マウス ES 細胞からの効率的な肝細胞分化を目指した培養環境制御の導入, 口頭発表, 第 16 回肝細胞研究会, 2009 年 6 月 15 日, 山形.
- ② 勝田毅, 寺谷工, 落谷孝広, 酒井康行, 酸素分圧の段階的制御によるマウス ES 細胞からの肝細胞分化誘導, 口頭発表, 第 8 回日本再生医療学会総会, 2009 年 3 月 24 日, 東京.
- ③ 酒井康行, 山口哲志, 小森喜久夫, 新海政重, 新野俊樹, 藤井輝夫, 長棟輝行, 牛田多加志, 各種スケールの 2D・3D 組織再構築と工学的的方法論, 招待講演, 第 8 回日本再生医療学会総会, 2009 年 3 月 24 日, 東京.
- ④ M Hamon, T Fujii, Y. Sakai, Fetal rat liver cell cultures: maintenance of liver function and formation of thick tissue induced by the enhancement of oxygen supply, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, Asia-Pacific Chapter Meeting 2008, 2008 年 9 月 15 日, Taipei, Taiwan.
- ⑤ Y. Sakai, Contributions of Nano- and Micro-Technologies to Liver Tissue

Engineering, 招待講演, CNBI-CNSI 合同ナノテクシンポジウム, 2008 年 8 月 25 日, 東京.

- ⑥ 酒井康行, 黄紅雲, 花田三四郎, 西川昌輝, 小森喜久夫, 小島伸彦, 山本貴富喜, 藤井輝夫, 肝細胞培養における工学的な外部環境の寄与—三次元化・酸素供給—, 招待講演, 第 15 回肝細胞研究会, 2008 年 6 月 17 日, 静岡.
- ⑦ 酒井康行, 黄紅雲, 大泉俊輔, 水野篤志, 太田勝次, 小島伸彦, 新野俊樹, 大型肝組織再構築のための担体デザイン・三次元造形・前駆細胞育成, 招待講演, 第 7 回日本再生医療学会総会, 2008 年 3 月 21 日, 名古屋.
- ⑧ 高橋 亨, 寺谷 工, 西川昌輝, 藤井輝夫, 落谷孝広, 酒井康行, マウス ES 細胞からの肝細胞分化誘導のための新規培養系, 口頭発表, 化学工学会第 73 回大会, 2008 年 3 月 17 日, 静岡.

[図書] (計 2 件)

- ① 酒井康行, 新野俊樹 (分担執筆), 第 18 章, 血流導入型体内埋め込み組織の構築, 細胞治療・再生医療のための培養システム, 紀ノ岡正博・酒井康行監修, シーエムシー出版, 大阪, pp.159-166 (2010).
- ② 小島伸彦, 酒井康行, 未分化肝細胞を用いた異所的な肝組織の再構築とその制御, 遺伝子医学 MOOK 別冊, 進み続ける細胞移植治療の実践—再生医療の実現に向けた科学・技術の周辺要素の理解—, メディカル Do (大阪), 102-106 (2008).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ①ホームページ  
<http://envchem.iis.u-tokyo.ac.jp/sakai/index.html>
- ②被紹介記事: 酒井康行, プレカカーサー第 13 回, 移植に適した大型臓器の開発に挑む, メディカルバイオ, 6(4), 90-93 (2009).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 康行 (SAKAI YASUYUKI)  
東京大学・生産技術研究所・教授  
研究者番号: 00235128

### (2) 研究分担者, なし

### (3) 連携研究者, なし