

自己評価報告書

平成23年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20246041

研究課題名（和文） 再生バイオ人工肝臓におけるマイクロナノ物質移動の構築

研究課題名（英文） Micro-nano transport process in the reconstructed bio-artificial liver

研究代表者

谷下 一夫 (TANISHITA KAZUO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：10101776

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：バイオ人工肝臓、幹細胞、物質移動、胆管、毛細胆管、毛細血管、共培養、星細胞

1. 研究計画の概要

バイオ人工肝臓の実現には、分子・細胞レベルにおけるマイクロナノ物質移動現象を明らかにして、それらを工学的に統合したマクロな性能評価と改善が必須となる。同時に肝細胞の酸素消費が大きいため、肝細胞への酸素供給も必要である。そこで、本研究では、小型肝細胞を中心に再構築されたバイオ人工肝臓において、有用物質と不要物質の輸送、酸素供給プロセスを明らかにし、最終的に生体内移植のための再生肝臓と体外使用の人工肝臓の実現を目指す。バイオ人工肝臓の物質移動の評価・改善には、発生生物学（組織再構築）、分子生物学（有用物質の細胞内産生）と移動現象論（細胞外における拡散対流による輸送）が連携して、バイオトランスポートの新しい工学コンセプトの創生が必要である。本研究は、新しい学際領域「バイオトランスポート」のコンセプトの創生を図り、新しい医療技術の発展に貢献する事を目標にしている。

昨年度の成果に基づき、以下の点に関してさらなる検討を行う。

- (1) 肝細胞多重積層化に伴う物質移動機能の評価と促進方法の検討
引き続き、肝細胞の2重積層化による機能促進のメカニズムを検討する。
- (2) 分子・細胞レベルのマイクロナノ物質移動過程の微視的計測と分子生物学的検討

再構築された肝細胞多重積層におけるマイクロナノ物質移動のプロセスを、抗体や蛍光マーカーを用い、共焦点レーザー顕微鏡、タイムラプス蛍光顕微鏡や全反射顕微鏡によって、アルブミンなどの動的な変化を3次元的に捉えて、物質移動を評価し、その改善方法に関して検討する。これも昨年度の継続である。

- (3) 毛細血管ネットワーク形成の工夫、毛細血管と肝細胞の共培養系
肝細胞の集合体の中にも血管網を形成させる。そのためには、肝細胞と血管内皮細胞との共培養系の確立が必須である。

- (4) 内皮細胞の物質移動特性
類洞内皮細胞では、せん断応力の大きさによってアルブミン分泌が大きく変化する事が予想され、肝細胞内での産生と血流中への放出を類洞内皮細胞が精密に制御している事を明らかにする必要がある。これも昨年度からの継続である。

- (5) 胆管ネットワークと小型肝細胞の共培養モデルの構築
小型肝細胞による毛細胆管と胆管ネットワークの融合の実現のために共培養モデルを構築する。

2. 研究の進捗状況

昨年度に引き続き、バイオ人工肝臓の構築を目指して、肝細胞、星細胞及び血管内

皮細胞による3次元組織構築に関する実験を行った。肝細胞と血管内皮細胞との共培養を安定に行うためには、星細胞の関与が重要である事が明らかになった。これらから構成される3次元立体構築の実験が順調に進捗しており、安定に3次元構造を構築する要因も明らかになってきた。最終目標である、血管ネットワークを含む肝細胞の3次元構造の実現に今一步という段階にまで漕ぎつける事ができている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

研究計画に記載された項目に関して、ほぼ満足すべき実験結果を得ている。

(1) 肝細胞多重積層化による機能促進のメカニズムを明らかにする実験を行った。生体吸収性膜 PLGA を用いて肝細胞と血管内皮細胞の共培養を行った結果、血管内皮によるネットワークが維持され、特に星細胞が毛細血管ネットワークを包み込むような分布になり、ペリサイト様の状況を呈した。星細胞の関わりは極めて重要で、星細胞が肝細胞と血管内皮細胞との間を媒介することによって、安定な組織構築が出来る事を見出した。1 μ m径のポアを持つ微孔性膜を用いて、肝細胞と血管内皮細胞による3次元積層化には、星細胞が関与しており、関与の仕方が極めて独特であった。

(2) 本研究で重要な課題は、肝細胞組織に血管ネットワークをめぐらす「血管化」にあるため、毛細血管ネットワーク形成の工夫を行った。特に、毛細血管ネットワーク形成は、せん断応力の力学的刺激の負荷に応答して、せん断応力依存性を示した。さらに拍動流を負荷させると、拍動の周波数によってネットワーク形成が変化した。拍動流の負荷により血管内に平滑筋の形成が確認されているが、生体内の力学的負荷に近い状態で血管ネットワーク形成を調べている。

(3) 内皮細胞における物質移動特性に関しては、せん断応力負荷によって大きく機能を変化する事が予想され、さらに実験を継続している。

(4) 胆管ネットワーク形成に関しては、本格的な実験を継続している。これまで我々のグループで、胆管上皮細胞による太い胆管形成 (LBD) と細い胆管形成 (SBD) に成功している。そこで、胆管形成に関わる細胞環境による影響を明らかにするため、まず基質の影響を調べた。基質であるコラーゲンの濃度と pH を変化させ、コラーゲンの硬さを変えた所、硬さに依存して胆管ネットワークが大きく変化した。さらに、

小型肝細胞との共培養にも成功し、新しい胆管ネットワーク形成を実現させた。さらに生体吸収性膜 PLGA を使って胆管ネットワーク形成を行い、新たな胆管形成のマイクロ環境を明らかにする事が出来た。

4. 今後の研究の推進方策

今後 23 年度は最後の年になるので、バイオ人工肝臓の基本的組織である、肝細胞3次元組織内に毛細血管ネットワークを構築させたい。そのような状態で、肝機能が有効に働いているかを特に物質移動特性から明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. 阿部順紀、須藤亮、池田満里子、谷下一夫、せん断応力に依存した血管内皮細胞の3次元ネットワーク形成、日本機械学会論文集、(2010)76 巻 767 号、pp51-57
2. 須藤亮、谷下一夫、力学的刺激による血管形成のバイオニックデザイン、血管医学、(2010)11 巻、pp55-61
3. Kasuya, J, Sudo, R, Ikeda, M, Tanishita, K, Hepatic stellate cell-mediated three dimensional hepatocyte and endothelial cell triculture mode, Tissue Eng, (2010)17, pp361-370

他 1 件

[学会発表] (計 18 件)

1. 谷下一夫、須藤亮、胆管様ネットワーク再形成に関する組織工学、胆道閉鎖症研究会、(2010年12月11日)東京
2. Sudo, R, Ikeda, M, Tanishita, K, A bioengineering approach to liver tissue engineering, Biofrontier Symposium (2010年11月11日)石川県金沢市
3. Kasuya, J, Sudo, R, Ikeda, M, Tanishita, K, Hepatic stellate cell mediated three dimensional hepatocyte and endothelial cell triculture model for a physiological liver experimental model, World Congress of Biomechanics, (2010年8月1日) Singapore
4. 阿部順紀、須藤亮、池田満里子、谷下一夫、Effect of pulsatile flow on three-dimensional microvessel network formation 日本生体医工学会(2010年6月4日)大阪府大阪市

他 14 件