

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24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 scale mass transfer in the reconstructed hepatocyte structure

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

研究成果の概要（和文）：

本研究の目標は、実際の肝臓の組織に近い組織構造を体外で実現し、その再構築された構造をバイオ人工臓器や再生医療へ応用するものである。本研究では、肝細胞、血管内皮細胞、及び星細胞の3種類の細胞による肝細胞組織構造が体外で再構築するプロセスを明らかにした。即ち、それぞれの細胞において生体高分子の発現とマイクロナノスケール物質移動による関わりを伴いながら、組織構築が可能になることが分かり、複合組織である肝臓再構築の可能性を見いだした。本研究における特筆すべき成果は以下の通りである。一つ目の大きな成果は、星細胞の関与に類洞構造の構築である。類洞では星細胞が細胞突起を伸ばして血管構造を裏打ちしているが、この構造を薄い生分解性ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体（PLGA）多孔性薄膜の活用によって構築した。さらにPLGA多孔性薄膜が異種細胞間相互作用を促進させ、機能的な肝類洞様組織の再構築に有効な細胞足場であることが分かった。二つ目は、3次元の肝細胞組織内での血管化に成功した点である。血管化の課題は再生医療の分野では極めて困難な課題で、世界中の組織工学の研究者が血管化の実現を目指しているが、顕著な進展が無かった。本研究ではせん断応力による機械的刺激による誘導及びマイクロ流路を活用した実験で、血管化に成功した。以上のように、当該分野で困難であった課題を克服する事ができ、バイオ人工肝臓の実用化に向けて大きく前進したと言える。

研究成果の概要（英文）：

Three-dimensional (3D) culture of hepatocytes is essential in order to reconstruct functional hepatic tissues *in vitro*. We have established the 3D stacked-up culture, a 3D culture method for the reconstruction of layered hepatocyte tissues which mimic the structure of hepatic cords. Hepatic stellate cells (HSCs) form a functional unit with endothelia and hepatocytes in the liver to play a pivotal role in heterotypic cellular communication. We confirmed that HSCs mediated the communication between hepatocytes and ECs in terms of EC morphogenesis. This tri-culture model allows us to investigate the roles of HSCs as both facilitators and integrators of cell-cell communication between hepatocytes and ECs, and is useful for investigating heterotypic cellular communication *in vitro*. We also developed a 3D stacked-up culture for SHs based on a degradation of microporous poly (*D,L*-lactide-co-glycolide acids) (PLGA) membranes with defined geometry. The 3D stack-up culture based on the degradation of microporous PLGA membranes will enable reconstruction of multilayered hepatic tissues with highly differentiated functions *in vitro*. Finally we achieved the vascularization into the 3D reconstructed structure of hepatocyte by micro-fluidic device. Thereby the technology of reconstructed liver tissue has been advanced to the final application to the bio-artificial liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

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. 研究開始当初の背景

バイオ人工肝臓とは、実際の肝細胞による再生人工肝臓を意味し、次世代の革新的な医療技術であるが、肝細胞は体外では増殖しないと考えられ、その実現は困難とされていた。90年代初頭に札幌医大の三高教授(連携研究者)が増殖性と分化機能を持つ未成熟な幹細胞である小型肝細胞を発見し、小型肝細胞によるバイオ人工肝臓の可能性が出て来た。そこで研究代表者らは、小型肝細胞を用いて体外での3次元肝細胞組織再構築に成功した。肝臓は、精緻な物質交換器で、有用物質と不要物質の交換を行う。有用物質の産生は細胞レベルで行われているため、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と、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としている。

2. 研究の目的

肝臓は、肝細胞、毛細血管、胆管に繋がる毛細胆管から構成されている。本研究では、そ

のような肝臓に類似した構造を持つバイオ人工肝臓を構築して、物質移動性能の評価とその改善を明らかにする。具体的には、肝細胞の3次元構造の構築、有用物質の産生と輸送、不要物質の除去、血管網による酸素の輸送の4点を中心に肝臓に類似した構造と機能を持つバイオ人工肝臓の実現を目指す。

(1) 多重積層化による肝細胞の3次元構造の構築

我々は、微孔性膜上に作成した2枚の2次元細胞シートを重ねて、上下の細胞間で自己組織的相互作用の結果、3次元組織再構築に成功した。そこで、生体吸収性膜を用いて多重積層化をすれば、完全に細胞のみの組織を構築できる。この方法を用いて多重積層化による組織構築を基にして、再生バイオ人工肝臓の実現を図る

(2) 有用物質の産生と輸送の分子・細胞レベルでの評価と改善の検討

肝細胞では、多くの有用物質を産生しているが、本研究では血中へ輸送されるアルブミンと毛細胆管に輸送される胆汁をその代表例として選び、その輸送過程を共焦点画像などによって分子・細胞レベルにおいて明らかにする。アルブミンや胆汁は細胞内で産生され、能動的に分泌される。細胞外では拡散対流過程によって輸送されるので、分子生物学的観点と輸送現象論と融合が必要となる。肝細胞の物質移動の評価と改善方法が重要なバイオ人工肝臓設計要件となる。

(3) 肝細胞組織における毛細血管網の形成と酸素輸送

毛細血管網の形成は、困難な課題であるが、本研究では積層化のアイデアでブレイクスルーを図る。即ち、サンドイッチの具のように肝細胞シート間に血管内皮細胞(血管を作る細胞)を播種して、3次元肝細胞組織内に血管

網を形成させる。既に血管内皮細胞単独では、血管網形成に成功している。さらに、酸素輸送に関しては、微小酸素電極と燐光減衰法により、細胞集合体内の酸素濃度を計測し、CFDによる計算機シミュレーションとの比較を行う。

(4) バイオ MEMS 技術への波及効果：本研究の成果は MEMS 技術にも応用可能で、MEMS におけるバイオリアクターの新技术への波及効果についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 生体吸収性膜を用いた多重積層化による3次元組織再構築と物質移動の評価

動物(ラット)の肝臓から分離した小型肝細胞を中心とする細胞培養が基本となる。生体吸収性微孔性膜を用いて細胞の多重積層化を行い、物質移動評価と改善を図る。さらに毛細胆管と結合する胆管形成を含めた物質移動の評価とバイオ人工肝臓の設計要因を明らかにする。

(2) 分子・細胞レベルのマイクロナノ物質輸送: バイオトランスポートの分子生物学的検討

分子生物学的検討を行うために、エプネット、共焦点画像、リアルタイム PCR (DNA の定量定生解析法)、ELISA (固定酵素免疫検定法) によってタンパク挙動に関する知見を得る。分子生物学的検討が中心。

(3) 酸素供給のための毛細血管網の形成デザイン

毛細血管網の形成では、サンドイッチの具のように肝細胞シート間に血管内皮細胞(血管を作る細胞)を播種して、3次元肝細胞組織内に血管網を形成させる。既に血管内皮細胞単独では、血管網形成に成功し、血管網形成の要因を把握している。酸素輸送に関しては、微小酸素電極と燐光減衰法により、細胞集合体内の酸素濃度を計測し、CFDによる計算機シミュレーションとの比較を行う。

(4) バイオ人工肝臓モジュールの体内への移植

最終的に、体外で再構築された肝細胞集合体の数 mm 角のモジュールを作成し、動物の体内に移植して、体内での小片の増殖過程をトランスキネホルドチャンバー法(血管の可視化に用いる方法)によって、肝細胞集合体が体内の組織に融合して行くプロセスを明らかにして、医療応用の可能性を検証する。

(5) バイオリアクターとしてのバイオ人工肝臓の工学モデル、MEMS などへの波及効果の検討

4. 研究成果

(1) 20 年度

本研究では、実際の肝細胞や血管内皮細胞などを基に、肝臓組織再構築を実現させ、バイオ人工肝臓や再生医療への応用を目指す。肝

臓は、肝細胞、毛細血管、胆管に繋がる毛細胆管から構成されている。本研究では、そのような肝臓に類似した構造を持つバイオ人工肝臓を構築して、物質移動性能の評価とその改善を明らかにする。具体的には、肝細胞の3次元構造の構築、有用物質の産生と輸送、不要物質の除去、血管網による酸素の輸送の4点について4年間で取り組み、肝臓に類似した構造と機能を持つバイオ人工肝臓の実現を目指す。平成20年度で得られた成果は以下の通りである。(1) 多重層化による肝細胞の3次元構築：特に生体吸収性高分子による微孔性膜を作成し、小型肝細胞の多層重層化に成功した。高分子の消失とともに、細胞が重層化された。(2) 有用物質の産生：肝細胞からのアルブミン分泌の特性を計測した。(3) 血管ネットワークの形成：肝細胞の集合体に、血管網を形成するというVascularizationは再生臓器の研究で大きな壁になっているが、本研究では、肝細胞と血管内皮細胞の共培養系モデルを構築した。さらに血管網形成が外的な機械的刺激によって大きく促進する効果を見出した。(4) 内皮前駆細胞による血管網形成：分化の機能に富んだ前駆細胞から分泌される増殖因子により大きく血管網形成が促進された。(5) 胆管上皮細胞による胆管ネットワーク形成：胆管上皮細胞を分離して、コラーゲンゲルサンドイッチ構造で培養したところ、極めて大きな胆管ネットワークの形成に成功した。この成果は、American J Pathologyに掲載されたが、データの一部は、ジャーナルの表紙に採用された。海外誌の表紙に採用されるのは高い評価を受けたと考えられる。

(2) 21 年度

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と、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。21年度では、コラーゲンゲルや生体吸収性膜を使用した多重積層化の実験を行い、肝細胞と内皮細胞との共培養系に星細胞が重要な役割を演じている事が明らかになった。毛細血管ネットワーク形成に関しては、剪断応力(定常、拍動)の刺激が血管形成に明確な影響

を与え、特に葉状加速の形成が3次元ネットワーク形成を誘導しているプロセスが明らかになった。胆管ネットワーク形成に関しては、小型肝細胞との相互作用を明らかにする共培養実験を行い、融合の条件が明らかになってきた。特に、胆管形成は、コラーゲンの機械的性質によっても大きく変化し、力学的な環境が胆管形成を制御するメカニズムの側面が明らかになった。

(3) 22年度

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。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る「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ตอบสนอง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) 23年度

今年度は、本研究の最終年でバイオ人工肝臓構築の締めくくりと言える成果を得る事が出来た。本研究の目標は、実際の肝臓の組織に近い組織構造を体外で実現し、その再構築された構造をバイオ人工臓器や再生医療へ応用するものである。そのためには、肝細胞、血管内皮細胞、及び星細胞の3種類の細胞による肝細胞組織構造を体外で再構築させる必要がある。昨年度は、それぞれの細胞において組織構築が可能になることが分かり、複合組織である肝臓再構築の可能性を見いだした。最後の年である23年度では、異種の細胞の相互作用により、異種の細胞による組織再構築を実現させることを最大の課題とした。異種の細胞による組織再構築の仕組みが明らかにされれば、その延長線上に、肝臓の組織再構築が可能となるからである。そのような観点から、本年度では二つの大きな進展を得る事に成功した。一つ目の大きな成果は、星細胞の関与に類洞構造の構築である。類洞では星細胞が細胞突起を伸ばして血管構造を裏打ちしているが、この構造を薄い生分解性ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)多孔性薄膜の活用によって構築した。さらにPLGA多孔性薄膜が異種細胞間相互作用を促進させ、機能的な肝類洞様組織の再構築に有効な細胞足場であることを示している。二つ目は、3次元の肝細胞組織内での血管化に成功した点である。血管化の課題は再生医療の分野では極めて困難な課題で、世界中の組織工学の研究者が血管化の実現を目指しているが、顕著な進展が無かった。本研究ではマイクロ流路を活用した実験で、血管化に成功した。以上のように本研究の最終年度で、当該分野で困難であった課題を克服する事ができ、バイオ人工肝臓の実用化に向けて大きく前進したと言える。

5. 主な発表論文等

(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 10 件)

- ① Junichi Kasuya, Ryo Sudo, Ryu Tamogami, Genta Masuda, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, "Reconstruction of 3D stacked hepatocyte tissues using degradable, microporous poly(d,l-lactide-co-glycolide) membranes" *Biomaterials* 査読有 33 (9) 2693–2700, 2012
- ② Junichi Kasuya, Ryo Sudo, Toshihiro

- Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, "Spatio-temporal control of hepatic stellate cell-endothelial cell interactions for reconstruction of liver sinusoids in vitro" *Tissue Engineering Part A* 査読有 2012 (in press)
- ③ Junichi Kasuya, Ryo Sudo, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, "Hepatic stellate cell-mediated three-dimensional hepatocyte and endothelial cell tri-culture model" *Tissue Engineering 査読有 Part A* 17 (3 and 4) 361-370, 2011
- ④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, 査読有 76, 51-57 2010
- ⑤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、査読無 Vol.11, No.4 2010 pp.50-61
- ⑥ Masaki Koga, Ryo Sudo*, Kimiko Yamamoto, Joji Ando, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, "Contribution of rat endothelial progenitor cells on three-dimensional network formation in vitro" *Tissue Engineering 査読有 Part A* 15 (9) 2727-2739, 2009
- ⑦Wataru Hashimoto, Ryo Sudo, Kazutomo Fukasawa, Mariko Ikeda, Toshihiro Mitaka, and Kazuo Tanishita, Ductular network formation by rat biliary epithelial cells in the dynamical culture with collagen gel and dimethylsulfoxide stimulation, *Am J Pathology*, 査読有 173 (2008) pp. 494-506
- ⑧Akinori Ueda, Ryo Sudo, Mariko Ikeda, Ken-ichi Kokubo, Susumu Kudo, Hirosuke Kobayashi and Kazuo Tanishita, Effect of hypoxia on formation of three-dimensional microvessel networks by endothelial cells in vitro, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 査読有 3(2008) pp.299-310
- ⑨ Ryo Sudo, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Morphological and Functional Changes of Rat Hepatocytes by Vertical Cell-Cell Adhesion in Three-Dimensional Stacked-Up Culture, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 査読有 3(2008) pp. 235-248.
- ⑩Ryo Sudo, Norio Takahashi, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda and Kazuo Tanishita The effect of micropatterned pores on the formation and movement of small hepatocyte colonies, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 査読有 3 (2008) pp.249-262
- [学会発表] (計 48 件)
- ①須藤亮、谷下一夫他 マイクロ流体デバイスを用いた肝細胞組織-毛細血管ネットワーク間相互作用の解析 第24回バイオエンジニアリング講演会 2012年1月7日 大阪
- ②須藤亮、谷下一夫他 間葉系幹細胞と血管内皮細胞の共培養による毛細血管ネットワークの構築 第24回バイオエンジニアリング講演会 2012年1月7日 大阪
- ③須藤亮、谷下一夫ほか 乳酸・グリコール酸共重合体薄膜を用いた小型肝細胞、星細胞および血管内皮細胞の3次元複合組織の再構築 第18回肝細胞研究会 2011年6月24日 東京
- ④須藤亮、谷下一夫ほか 星細胞-血管内皮細胞感接触による血管形態形成の制御 第18回肝細胞研究会 2011年6月24日 東京
- ⑤須藤亮、谷下一夫ほか マイクロ流路デバイスにおける肝細胞組織-血管ネットワーク間相互作用の定量評価 第18回肝細胞研究会 2011年6月24日 東京
- ⑥Sudo, R., Tanishita, K. et al. Microfluidic Hydrostatic Deposition Patterning for investigatinghepatocyte-biliary epithelial cell interactions 第50回日本生体医工学会 2011年4月29日 東京
- ⑦Sudo, R., Tanishita, K. et al. Microfluidic hydrostatic deposition patterning for a confined hepatocyte-biliary epithelial cell co-culture system 第50回日本生体医工学会 2011年4月29日 東京
- ⑧Sudo, R., Tanishita, K. et al. Effects of the mechanical properties of substrates on the in vitro formation of bile ducts by biliary epithelial cells International Symposium on Mechanobiology 2011年11月5日 Shanghai, China
- ⑨Sudo, R., Tanishita, K. et al. Spatio-temporal control of hepatic stellate cell-endothelial cell interactions for reconstruction of vascularized liver constructs in vitro *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia-Pacific Chapter*

Meeting, 2011年8月3日 Singapore

⑩須藤亮、谷下一夫他 Dorsal skinfold chamber を用いた生体内肝臓組織形成の可視化に関する検討 第34回日本バイオレオロジー学会 2011年6月3日 大阪

⑪須藤亮、谷下一夫他 マイクロ流体デバイスにおける血管内皮細胞-間葉系幹細胞共培養系の構築 第34回日本バイオレオロジー学会 2011年6月3日 大阪

⑫須藤亮、谷下一夫、池田満里子、血管内皮細胞の3次元ネットワーク形成に及ぼす定常及び拍動せん断応力の影響、日本バイオレオロジー学会、2010年6月4日、埼玉県和光市

⑬Sudo, The reconstructed tube formation by integrated cellular structure Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics. 2009年9月10日

〔図書〕(計 1件)

谷下一夫、須藤亮、池田満利子 Advance in Tissue Engineering 2010 P.42-52 Mary Ann Liebert, Inc.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

池田 満里子 (UKEDA MARIKO)
慶應義塾大学・理工学部・名誉教授
研究者番号：00051368

須藤 亮 (SUDO RYO)
慶應義塾大学・理工学部・専任講師
研究者番号：20407141

(3) 連携研究者

該当なし