

## 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25年5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360347

研究課題名（和文） マルチスケール操作による三次元血管化組織の形成と再生医療への応用

研究課題名（英文） Formation of three-dimensional vascularized tissue by multi-scale operation and application to regenerative medicine

研究代表者

梶原 稔尚（KAJIWARA TOSHIHISA）

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：10194747

研究成果の概要（和文）：

生体組織内部における毛細血管網は、組織が生存するために必須のパイプラインである。一方、培養細胞を用いて生体外で構築する細胞組織体の内部において、毛細血管網を構築させることは未だ達成されていない。本研究では血管内皮細胞に被覆された細胞組織体を高密度に集積し、再組織化を誘導することにより、毛細血管網を有する細胞組織体を構築することを目的として検討を行った。肝細胞と内皮細胞を用いて検討を行った結果、種々の培養デバイス内において、内部に網目状の内皮細胞のネットワークを有する肝-内皮細胞複合組織体の形成誘導が可能であった。またこの手法によって形成された細胞組織体は、細胞生存率ならびに機能の向上が示され、細胞間の相互作用や組織構造の効果が示唆された。以上の結果、本手法は再生医療において有望視される血管化組織を構築する基盤技術として有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Tissue vascularization in vitro is necessary for cell transplantation and is a major challenge in tissue engineering. To construct large and regularly vascularized tissue, we focused on the integration of endothelial cell-covered spheroids. To construct regularly vascularized tissue, we packed endothelial cells-covered hepatocyte spheroids in various culture devices. Packed spheroids attached to each other forming a large cellular tissue with regular distribution of endothelial cells. Cell viability and the activities of some liver specific functions of cultured tissue construct well maintained through a culture period. This study demonstrated the possibility of an approach of packing spheroids covered by endothelial cells for formation of vascularized tissue construct.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

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：医用化学工学、再生医療、三次元培養、血管化組織

### 1. 研究開始当初の背景

生体内において多くの組織を構成する細胞は、毛細血管を流れる血液との間で物質交換を行うことによって生存し、特異的機能を発揮する。このように組織の発生・構築において毛細血管網の構築は欠かせないものである。近年、細胞が持つ特異的な機能を積極的に利用し、失われた臓器・組織の機能の再生を行う再生医療技術が注目されているが、移植に伴う新規の血管網構築は未だ解決されていない問題である。移植細胞が有効に機能するためには、生体外であらかじめ細胞組織体を構築することが有効な手法として考えられているが、血管を持たない細胞組織体を移植した場合、生体組織側からの毛細血管の遊走には時間がかかり、その間に移植細胞の多くは死滅してしまう問題がある。このことから、移植用細胞組織体の内部にあらかじめ血管網を構築することは必須の技術であるといわれているが、血管網の構築（血管新生）のメカニズムが十分に解明されていないこともあり、細胞組織体内部での血管網構築は未だ達成されていない状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究では研究代表者らがこれまで確立してきた細胞組織体形成法を基盤技術として、血管網を有する高度な複合細胞組織体構築のために、細胞内部への分子レベルの刺激から、細胞・組織間の相互作用までを考慮するマルチスケール操作による細胞組織体形成手法の確立と再生医療分野への応用展開を目的とした。研究代表者らは細胞組織体内部での血管網構築を行うためには、血管を外から進入させるよりも、組織構築時に血管構成細胞をあらかじめ配置し、組織構築に伴って血管網の構築を誘導する方が有効な手法であると発想した。そこで本研究では、最終的には血管網を有する複合細胞組織体構築を実現する培養手法の確立を目指し、周囲を血管内皮細胞で被覆された球状細胞組織体（スフェロイド）を高密度に集積し、それらの自己組織化によって再構築された細胞組織体内部に規則的に血管内皮細胞を配置する新たな培養手法の確立と、形成された複合細胞組織体の構造並びに機能評価を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 中空糸を用いた肝-内皮細胞複合組織体の形成誘導

肝細胞として初代ラット肝細胞を、内皮細胞としてヒト正常臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を使用した。ラット肝臓より酵素処理法によ

り初代ラット肝細胞を調製後、培養ディッシュ内において浮遊巡回培養を行い、肝細胞スフェロイドの形成誘導を行った。培養2日目に形成されたスフェロイドのうち、粒径が $50\mu\text{m}$ ~ $150\mu\text{m}$ の分画を選択的に回収した。得られたスフェロイドはコラーゲン溶液に浸漬することによりスフェロイド表面にコラーゲンをコートした。その後、細胞非付着性のディッシュ上にてHUVECとの共培養を行った。共培養4日目にスフェロイドを回収し、血漿分離用中空糸から構成されるバンドル内にスフェロイドを充填した。細胞を充填した中空糸バンドルはディッシュ内にて巡回培養を行った。

#### (2) 中空糸内で形成された肝-内皮細胞複合組織体の機能評価

肝-内皮細胞複合組織体の機能評価を行うために、以下の4条件で組織体形成誘導を行った。

- 内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを中空糸内に充填し組織体形成を誘導した系
- 内皮細胞と肝細胞を分散状態で混合し、中空糸内に充填し組織体形成を誘導した系
- 肝細胞スフェロイドのみを中空糸内に充填し組織体形成を誘導した系
- 分散状態の肝細胞のみを中空糸内に充填し組織体形成を誘導した系

評価項目として、細胞数変化、形態観察、肝機能評価（アルブミン分泌能・アンモニア除去能）を行った。

#### (3) 灌流チャンバーを用いた肝-内皮細胞複合組織体の形成誘導

大量のスフェロイドを用いた再組織化を実現し、かつ、再組織化の過程における流動の影響を評価できる実験系として、灌流培養に着目し、灌流チャンバーを用いた肝-内皮細胞複合組織体の形成誘導を行った。培養チャンバーは内径2mmのシリコンチューブとポリエステルメッシュ（ $45\mu\text{m}$ ）によって作製した。灌流方式として、高密度にスフェロイドが充填された空間内に破綻なく培地を送液する方法として静水圧に着目し、静水圧駆動型の灌流ラインを作製した。本研究では静水圧として落差1mの間隔で2つのリザーバーを配置した。培養チャンバー内にあらかじめ作製した内皮細胞によって被覆された初代肝細胞スフェロイドを充填後、灌流培養を開始した。培養48時間後に組織学的評価によって培養細胞組織内部での肝細胞とHUVEC

の分布状態や生存状態の評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 中空糸内で形成された肝-内皮細胞複合組織体

中空糸内部に充填された内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドは、スフェロイド同士で融合し、全体として一つの細胞組織体を形成した。形成された肝-内皮細胞複合組織体の組織学的評価の結果、スフェロイド同士が融合し一つの組織体となる過程において、スフェロイド表面を覆っていた内皮細胞が再構築され、組織体内部に網目状に配置されている様子が観察された。一部では内皮細胞による直径約10 $\mu$ mの環状構造が観察され、内皮細胞がさらに組織化を行っていることが示唆された。

##### (2) 中空糸内で形成された肝-内皮細胞複合組織の機能評価

4つの条件で作製した細胞組織体について、細胞生存率と肝機能の比較を行った。この結果、まずスフェロイドを用いた条件(a)、(c)の比較において、内皮細胞と共培養することにより形成された細胞組織体内部での細胞維持率の向上が示された。また、肝特異的機能であるアルブミン分泌能、アンモニア除去能の比較を行った結果、組織形成条件を問わず内皮細胞と共培養することにより肝細胞のアルブミン分泌能の向上が示された。さらに、スフェロイドを用いた条件(a)、(c)の比較においてのみ、内皮細胞との共培養によって肝細胞のアンモニア除去能の向上が示された。以上の結果、中空糸内部で形成された肝細胞組織は、内皮細胞を混合した複合肝組織とすることによりアルブミン分泌能が向上することが示された。さらに、組織形成条件として、内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを用いて複合肝組織を形成することにより、細胞維持率とアンモニア除去能も向上することが示された。それぞれの条件で形成された組織内部の構造については十分に解析するには至らなかったが、肝細胞と内皮細胞を分散状態で集積した系と比較して、内皮細胞に被覆された肝細胞スフェロイドを集積して誘導した細胞組織体内部では、肝細胞組織内部に内皮細胞が網目状に発達したネットワークを形成する傾向が示された。以上の結果、内皮細胞の発達したネットワーク構造が肝細胞の生存率や機能発現に効果的に作用したことが示唆された。

##### (3) 灌流培養下での肝-内皮細胞複合組織体の形成

灌流培養チャンバー内で形成された肝-内皮細胞複合組織体の組織学的評価を行った。

培養48時間後において、チャンパー内では、スフェロイドが集積した肝-内皮細胞複合組織体が形成された。内部では、内皮細胞が一定間隔で網目状に配置されている様子が観察された。この結果、静水圧を利用することにより灌流培養条件下においてスフェロイド集積による肝-内皮細胞複合組織体の形成誘導が可能であることが示された。本研究では内径2mmのシリコンチューブをチャンパーとして使用したが、形成された組織体内部では明確な壊死層は観察されなかった。従って、本手法は従来技術と比較して大きな細胞組織体の形成を誘導できる可能性がある。一方、充填するスフェロイド数によって組織の形成状況は異なり、条件によってはスフェロイドの球状形態が残ったまま接着している様子も観察された。従って、本手法による組織体形成法の確立のためには長期に培養を行うと共に、充填スフェロイド数や流量との関係について検討を行う必要があることが示された。

以上の結果、内皮細胞に被覆されたスフェロイドを高密度に集積し、再組織化を誘導することにより、内部に内皮細胞のネットワークを有する細胞組織体の形成が可能であった。また形成された細胞組織体は従来手法で形成された場合と比較して細胞生存率や機能発現の向上が示された。本研究では配置された内皮細胞のさらなる組織化による管腔化には至らなかったが、その条件を今後明らかにすることにより、本手法は再生医療における本手法は再生医療において有望視される血管化組織を構築する基盤技術として有望であると考えられる。

#### 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13件)

1. 水本博、梶原稔尚，中空糸を用いた胚性幹細胞の肝分化誘導プロセス開発とバイオ人工肝臓への応用，膜，37，3，125-131，査読無，2012
2. H. MIZUMOTO，S. HAYASHI，K. MATSUMOTO，K. IKEDA，T. KUSUMI，M. INAMORI，K. NAKAZAWA，H. IJIMA，K. FUNATSU，T. KAJIWARA，Evaluation of a Hybrid Artificial Liver Module Based on a Spheroid Culture System of Embryonic Stem Cell-Derived Hepatic Cells，Cell Transplantation，21，2-3，421-428，査読有，2012
3. N. AMIMOTO，H. MIZUMOTO，K. NAKAZAWA，H. IJIMA，K. FUNATSU，T. KAJIWARA，Hepatic Differentiation of Mouse

- Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells During Organoid Formation in Hollow Fibers, Tissue Engineering Part A, 17, 15-16, 2071-2078, 査読有, 2011
4. 水本博、梶原稔尚, 再生医療とプラスチック成形加工, 成形加工, 23, 5, 251-254, 査読無, 2011
  5. 水本博、梶原稔尚, ハイブリッド型人工肝臓の現状とこれから, 医学のあゆみ, 237, 5, 592-596, 査読無, 2011
  6. 水本博、稲森雅和、中澤浩二、井嶋博之、船津和守、梶原稔尚, 分化細胞の臓器/組織誘導とそのモジュール化, 再生医療, 9, 3, 355-360, 査読無, 2010
  7. M. INAMORI, H. MIZUMOTO, T. KAJIWARA, Integration of Endothelial Cell-Covered Hepatocytes Spheroids for Construction of Vascularized Liver Tissue, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects 16, 45-50, 査読無, 2010
  8. 水本博, 胚性幹細胞を細胞源としたハイブリッド型人工肝臓開発, 化学工学, 74, 6, 277-280, 査読無, 2010
  9. M. INAMORI, H. MIZUMOTO, T. KAJIWARA, Investigation of medium perfusion through scaffold-free tissue constructs using endothelial cell-covered spheroids in vitro, Biochemical Engineering Journal, 50, 3, 116-121, 査読有, 2010

[学会発表] (計 36 件)

1. 奥平達也, 網本直記, 水本博, 梶原稔尚: 種々の条件で形成させた肝-内皮細胞複合組織の機能評価, 化学工学会 第 78 年会, 2013. 3. 17, 大阪 大阪大学
2. 水本博, 網本直記, 中澤浩二, 井嶋博之, 船津和守, 梶原稔尚: 多能性幹細胞を利用した人工肝補助療法としてのバイオ人工肝臓デバイス開発, 化学工学会 第 44 回秋季大会, 2012. 9. 20, 仙台 東北大学
3. 奥平達也, 網本直記, 水本博, 梶原稔尚: 中空糸を用いた肝-内皮細胞複合組織の形成と機能評価, 化学工学会 第 44 回秋季大会, 2012. 9. 19, 仙台 東北大学
4. 奥平達也: 中空糸内を用いた肝-内皮細胞複合組織の形成と機能評価, 第 23 回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会, 2012. 7. 21, 北九州八幡ロイヤルホテル 北九州
5. 奥平達也, 網本直記, 水本博, 梶原稔尚: 中空糸内で形成された肝-内皮細胞複合組織の機能評価, 第 49 回化学関連支部合同九州大会, 2012. 6. 30, 北九州 国際会議場, 北九州
6. 網本直記, 奥平達也, 水本博, 梶原稔尚: 中空糸内で形成した肝細胞と内皮細胞からなる複合培養組織の機能評価, 第 19 回肝細胞研究会, 2012. 6. 29, 札幌 医科大学 北海道
7. 水本博: ポリマースキャホールドを用いた細胞組織構築とバイオ人工臓器への応用, プラスチック成形加工学会第 126 回講演会, 2011. 11. 18, 福岡 九州大学
8. H. MIZUMOTO, M. INAMORI, T. KAJIWARA: Construction of 3D engineered liver tissue with endothelial cell networks by stacking endothelial cell-covered hepatocyte spheroids, 2nd International Conference on Biofabrication, 2011. 10. 8, Toyama, Japan
9. 水本博, 中澤浩二, 井嶋博之, 船津和守, 梶原稔尚: ハイブリッド型人工肝臓の開発と性能評価, 第 32 回日本アフェレンス学会学術大会, 2011. 9. 30, 東京都都市センターホテル
10. 水本博, 稲森雅和, 梶原稔尚: 灌流チャンバー内での肝細胞と血管内皮細胞からなる複合肝組織の構築, 第 18 回肝細胞研究会, 2011. 6. 25, 東京 東京ガーデンパレス
11. 水本博, 中澤浩二, 井嶋博之, 船津和守, 梶原稔尚: 中空糸を用いた幹細胞分化・細胞組織構築技術の開発, 第 22 回プラスチック成形加工学会年次大会, 2011. 6. 23, 東京 タワーホール船堀
12. 水本博、稲森雅和、網本直記、梶原稔尚: 静水圧駆動型バイオリアクター内での内皮細胞被覆肝細胞スフェロイドの集積培養, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011. 3. 2, 東京 京王プラザホテル
13. 水本博、中澤浩二、井嶋博之、船津和守、梶原稔尚: オルガノイド培養法を利用したハイブリッド型人工肝臓の開発, 第 38 回日本集中治療医学会学術集会, 2011. 2. 25, 横浜 パシフィコ横浜
14. 水本博、稲森雅和、梶原稔尚: 酸素移動現象を指標とした肝細胞組織体の形状設計とその構築法に関する研究, 第 23 回バイオエンジニアリング講演会, 2011. 1. 8, 熊本 熊本大学
15. H. MIZUMOTO, M. INAMORI, T. KAJIWARA: Construction of liver tissue with endothelial cell networks by stacking endothelial cell-covered hepatocyte spheroids in a perfusion culture, Tissue Engineering International & Regenerative

Medicine Society North America  
Chapter Meeting (TERMIS-NA),  
2010.12.7, Orland, Florida, USA

16. 水本博、稲森雅和、梶原稔尚：内皮細胞  
によって被覆化されたスフェロイド形  
成と血管化組織構築への応用、化学工学  
会 第42回秋季大会、2010.9.8、京都  
同志社大学
17. 谷秀樹、稲森雅和、水本博、梶原稔尚：  
肝細胞と内皮細胞との共培養による複  
合細胞組織の構築、第47回化学関連支  
部合同九州大会、2010.7.10、北九州  
北九州国際会議場
18. 水本博、中澤浩二、井嶋博之、船津和守、  
梶原稔尚：Development of a hybrid  
artificial liver based on an organoid  
culture system、第49回日本生体医工  
学会大会、2010.6.26、大阪 大阪国際  
交流センター

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶原 稔尚 (KAJIWARA TOSHIHISA)  
九州大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：10194747

### (2) 研究分担者

水本 博 (MIZUMOTO HIROSHI)  
九州大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：90346817