

## 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 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650108

研究課題名（和文） 機能的胆管ネットワークを配備した肝組織の体外体内一貫構築

研究課題名（英文） Integrated in vitro-in vivo organization of liver tissues having a functional bile duct 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)： 機能的胆管ネットワークを保持した肝組織構築を最終目的として、ラット胎児肝細胞とラット成熟胆管上皮肝細胞からなる三次元球状凝集塊を、*in vitro* で形成させたところ、後者を前者の3倍混合した凝集体で、連続的かつ機能的な胆管ネットワークが凝集塊全体に形成されることを確かめた。さらに、形成した球状凝集塊を、マトリゲルに浸したポリ乳酸不織布担体に包埋して免疫不全マウスの腸管膜上に移植したところ、胆管上皮細胞への分化能力を持つ胎児肝細胞の凝集塊では胆管構造が全く形成されなかったのに対し、*in vitro* で成熟胆管上皮細胞を混合した凝集塊では、胆管ネットワーク構造が安定的に維持された。以上、成熟した胆管上皮細胞の存在が胆管ネットワーク形成に極めて重要な役割を果たすことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)： To organize implantable liver tissues having a functional bile duct network, first, we made spherical cellular aggregates constituted of fetal rat liver cells and mature bile duct epithelial cells isolated from rats. Aggregates having a continuous and functional bile duct network over the entire aggregates were successfully formed in the aggregates containing a three times larger number of mature bile duct cells over fetal liver cells. When such aggregates were immobilized in poly-L-lactic acid scaffolds with Matrigel and were implanted into the mesentery of immune-deficient mice, bile duct networks were well maintained in the case of aggregates having mature bile duct cells, whereas they were not formed in the case of pure fetal liver cell aggregates. These results showed that mature bile duct cells are necessary in forming functional bile duct networks over organized liver tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学、マクロ組織極性

1. 研究開始当初の背景

異種細胞から構成される複雑かつ極性を

持った組織の構築を展望した場合、細胞・均一構造の担体・生体組織の再生力、に主に頼る従来の組織工学的アプローチには、限界がある。肝組織における極性とは、例えば、さまざまな栄養素や化学物質が血管側から細胞に取り込まれ、代謝を受けた後に再度血管側に戻るか、または肝細胞から発する胆汁側に排泄されるか、という方向性を持った代謝輸送をさす。胆汁は肝実質細胞によって生成され、実質細胞間の毛細胆管を通して、胆管上皮細胞からなる小葉間胆管へと輸送される。肝小葉内での胆汁の流れは、血流と反対の方向になるよう緻密に制御されている。

胆汁の回収排泄は生理学的な解毒機能として重要である上、胆汁のうっ滞はその細胞毒性のために直接的な肝障害を起こす。また胆汁は十二指腸に分泌されることで脂肪をミセル化して、その取り込みを亢進する。そのため、埋め込み型肝組織の構築を目標とする以上、*in vivo* を模倣した胆汁の極性輸送を可能にするような組織構築方法を確立する必要がある。

## 2. 研究の目的

血管側・胆管側という極性を再現する肝組織の構築を目的とする。このために、パターンニング技術を用いた血管・胆管ネットワーク・肝前駆細胞の三次元化組織等を組み合わせることで生体外で移植デバイスを作成し、それを疾患モデル動物の腸間膜血管茎上に移植することで、*invivo* の再生能を利用してより高度な組織化・極性輸送の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

ラット胎児肝細胞とラット成熟胆管上皮細胞を用いて、2つの組織構築手法を試みた。ひとつは、ラット成熟肝から採取される成熟胆管上皮細胞をコラーゲンサンドイッチ法にてまず自発的ネットワークを形成させ、その後コラーゲンを消化することで、部分的に組織化された胆管ネットワーク断片を得、これと胎児肝細胞や成熟肝細胞とをマイクロウェルを用いて球状凝集体に組織化する手法、もう一つは、ラット成熟肝から採取される成熟胆管上皮細胞と組織再構築能に優れたラット胎児肝細胞とを単離後、直接マイクロウェルにて凝集体へと効率的に組織化する手法である。これらについて、適切な組織学的解析を行うと共に、胆汁に特異的に分泌される蛍光性の化学物質を用いて、形成された胆管様構造の機能を調べた。

さらに、2つの細胞の比率を様々に変えて形成されたヘテロ球状凝集体を、マトリゲルに浸したポリ乳酸不織布担体に包埋後に免疫不全マウスの腸管膜上に移植、生体内における更なる胆管ネットワーク構築の可能性

を検討した。このためには、*in vitro* と同様に組織学および胆管に着目した機能学的解析を行った。

## 4. 研究成果

生体外の構築については、第一の手法—成熟胆管上皮細胞をサンドイッチコラーゲン培養することで一旦胆管ネットワークを形成させる方法—では、胆管片と後から播種する実質細胞のとの組織化がうまく行われないことが判明した。すなわち、マイクロウェル閉空間を用いた細胞組織化法では、コラーゲン消化で回収・断片化した胆管ネットワーク片と胎児肝細胞とから球状凝集体を得ることが極めて困難であった。そこで、第二の手法—ラット成熟肝から採取される成熟胆管上皮細胞と組織再構築能に優れたラット胎児肝細胞とを単離後、直接マイクロウェルにて凝集体へと効率的に組織化する手法—を専ら用いることとした。この直直接的手法では、異なる条件でも球状の凝集体を安定的に得ることが可能であった。

この第二の手法で、両者の比を胎児肝細胞：胆管上皮細胞で 1:10・1:3・1:1・3:1・10:1 と広範に振ってヘテロ細胞凝集体を形成し、その組織学的・機能学的評価を行ったところ、成熟胆管上皮細胞を胎児肝細胞の3倍以上混合した凝集体においてのみ、胆汁溜りが全体に分布し、かつ互いに連続していることが確認できた。さらに、蛍光性の代謝物を用いて胆汁排泄・蓄積能を評価したところ、成熟胆管上皮細胞が“1:3”の場合にのみ、連続したネットワーク様構造への胆汁蓄積を見ることができた。これらのことから、機能的胆管構造の生体外構築において成熟胆管上皮細胞が重要な役割を果たすことが示された。

胎児肝細胞集団の中には本来、胆管上皮細胞にも分化可能な前駆細胞が含まれているはずであるが、それらは発達した機能的胆管を生体外で構築することにはあまり寄与できず、むしろ成熟胆管上皮の寄与が大きいとの結果となった。この理由は現時点では不明であるが、少なくとも現状の培養条件下では、胎児肝細胞から自律的に肝細胞と胆管上皮とをバランスよく分化誘導し、機能的胆管を配置する組織を形成するに至らなかった。また、細胞間に毛細胆管を形成する法力に富んでいる成熟肝細胞についても同様の形成を試みたが、胆管上皮細胞とのヘテロ球状凝集体の形成自体が良好でなかった。今回用いたマイクロウェルが酸素非透過性の者であり、代謝能が高い成熟肝細胞を高密度で播種したことも一因と考えられた。成熟肝細胞自体の持つ毛細胆管形成能の有効活用も追究すべきであり、今後培養系を改善して再

試行する価値がある。

さらに、生体内での胆管構築においても胎児肝細胞でなく成熟胆管上皮細胞が必要となるかを検討するため、上述のように生体外で構築した“1:1”凝集体および対照群として胎児肝細胞のみで構築した凝集体(“1:0”)を、マトリゲルに浸したポリ乳酸不織布担体に包埋して免疫不全マウスの腸管膜上に移植し、生体内における更なる胆管ネットワーク構築の可能性を検討した。移植4週間後に移植片を摘出し組織像を観察したところ、“1:0”では肝実質様構造のみが形成されていたのに対し、“1:1”では実質構造に加え胆管上皮細胞で形成されるネットワーク構造も形成されていることが確かめられた。胎児肝細胞集団は胆管上皮細胞にも分化する能力を持っているはずであるが、in vitroと同様に in vivoにおいても自発的に胆管構造を形成することは観察されなかった。

以上の結果より、胆管構造をもつ肝組織の構築を目指す上で、生体外・生体内いずれにおいても成熟胆管上皮細胞の存在が極めて重要な役割を果たすことを明らかとするとともに、機能的な胆管ネットワークを再構築型組織に配備するための重要な組織構築法を開発し、in vitro/in vivoにてその有効性を確かめた。今後は、特に in vivoにおいて、蓄積された胆汁がどこに最終的に排出されるのかを把握することが、臨床学的に意義のある大きさと機能とを持った肝組織構築に必須である。

#### 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6件)

① Takeshi Katsuda, N. Kojima, Takahiro Ochiya, and Yasuyuki Sakai. Biliary epithelial cells play an essential role in the reconstruction of hepatic tissue with a functional bile ductular network, Tissue Eng. A, in press. 2013, 査読有。

② Takeshi Katsuda, Takumi Teratani, Mohammad, Mahfuz Chowdhury, Takahiro Ochiya, Yasuyuki Sakai, Hypoxia efficiently induces differentiation of mouse embryonic stem cells into endodermal and hepatic progenitor cells, Biochemical Engineering Journal, 74, 95-101, 2013, 査読有, DOI: 10.1016/j.bej.2013.02.012.

③ 勝田 毅、酒井 康行、落谷 孝広、脂肪由来幹細胞による細胞治療の可能性、実験医学、29、3102-3108、2011、査読無。

④ Katsuda T, Teratani T, Ochiya T, Sakai Y, Transplantation of fetal liver

cell-loaded hyaluronic acid sponge onto the mesentery recovers a Wilson's disease model rat, J Biochem, 148, 281-288, 2010, 査読有。

⑤ 勝田 毅、小森 喜久夫、寺谷 工、落谷 孝広、酒井 康行、異所性体内埋め込み型人工肝臓開発の現状と展望、生産研究、62、213-217、2010、査読無。

⑥ 勝田 毅、酒井 康行、落谷 孝広、間葉系幹細胞を用いた細胞治療の可能性、医工学治療、22、204-210、2010、査読無。

[学会発表] (計3件)

① Katsuda T, Kojima N, Ochiya T, Sakai Y, 胆管ネットワーク構造を配備した肝臓様組織の in vitro 再構築, 第84回生化学会大会, 2011/9/21, 京都。

② Katsuda T, Kojima N, Ochiya T, Sakai Y, In vitro reconstruction of a liver-like tissue possessing a bile transport system, TERMIS-EU meeting, 2011/6/9, Granada, Spain.

③ 勝田 毅、小島 伸彦、落谷 孝広、酒井 康行、胆汁輸送機構を配備した肝臓様組織の in vitro 再構築、第10回日本再生医療学会、2011/3/2、東京。

[図書] (計2件)

① Y. Sakai, J. Jiang, S. Hanada, H. Huang, T. Katsuda, N. Kojima, T. Teratani, A. Miyajima, T. Ochiya, Fetal Tissue Transplantation in Fetal Tissue Transplantation, Springer-Verlag UK, 221(47-64), 2013.

② Y. Sakai, M. Nishikawa, F. Evenou, M. Hamon, H. Huang, K.P. Montagne, N. Kojima, T. Fujii and T. Niino, "Engineering of implantable liver tissues", in "Liver Stem Cells" etd. by T. Ochiya, Hamana Press, 236(189-216), 2011.

[その他]

○ホームページ

<http://envchem.iis.u-tokyo.ac.jp/sakai/index.php?lang=ja&page=research&category=6>

○受賞

平成23年10月(社)日本生化学会2011年(第19回)JB論文受賞, "Transplantation of a fetal liver cell-loaded hyaluronic acid sponge onto the mesentery recovers a Wilson's disease model rat" (Journal of Biochemistry, 148(3), 281-288 (2010)). (勝田毅, 落谷孝広, 酒井康行)

#### 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

落谷 孝広 (OCHIYA TAKAHIRO)  
国立がん研究センター・研究所・分子細胞治療研究分野長  
研究者番号：60192530