

令和元年6月4日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：26350530

研究課題名(和文) 移植に適した肝・膵細胞の機能性3次元組織体の形成

研究課題名(英文) Formation of functional 3D tissues suitable for transplantation by liver and pancreatic cells

研究代表者

山田 理恵(鵜頭理恵)(Utoh, Rie)

千葉大学・大学院工学研究院・日本学術振興会特別研究員(RPD)

研究者番号：70593169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に効率的に生着・機能させる3次元組織体を作製するために、*in vitro*において肝細胞や膵島細胞の機能性3次元組織体の作製を行った。まず、微細加工技術を利用して作製した円形のハイドロゲル製微小チャンバーを用い、その内部にラット膵島細胞を導入することで、大きさを制御した膵島様組織を作製した。100マイクロメートル以下の膵島様組織を作製することで細胞死の割合が低く、インスリン分泌能が高い高機能な膵島様組織を作製できることが明らかとなった。また、I型コラーゲンやマトリゲルを用いてマイクロスケールの球形や線形の細胞の微小足場材料の作製を行い、細胞と混合培養して、機能評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝疾患や1型糖尿病治療のために、肝細胞移植、膵島移植などの細胞移植療法が試みられているが、現状では、顕著な治療効果が得られない、または長期成績が不良であるなど克服すべき課題が多い。本研究では、細胞移植による治療効果の改善を目指し、肝細胞や膵島細胞を用いて、生体内での長期生着・機能維持に有利な、機能性3次元組織体の作製を行った。移植効率が改善できることによって、移植する細胞数を減らすこともでき、ドナー不足の改善にも期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed new strategies for production of high functional three-dimensional (3D) tissues using hepatocytes and islet cells that can be efficiently engrafted and function *in vivo*. First, size-controlled islet-like tissues were prepared from dispersed rat islet cells using precisely-fabricated agarose gel-based microwells. As a result of the culture of islet-like tissues for 7 days, dead cells were rarely present in the small islet-like tissues and the islet cells restored the high insulin secretory capacity in response to high glucose. These results clearly suggest that precise size control of islet-like cells is essential for maintaining islet cell function and survival. In addition, we produced microscale scaffolds with spherical or linear structure from type I collagen and Matrigel for reconstitution of high-functional 3D tissues and evaluated the effects of the microscale scaffolds on survival and functions of hepatocytes.

研究分野：組織工学

キーワード：肝細胞 膵島細胞 組織工学 コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、臓器移植におけるドナー不足を解決するための細胞移植治療が注目されており、臨床において肝疾患や1型糖尿病の治療を目的として、肝細胞や膵島を生体内肝臓へ移植する肝細胞移植や膵島移植が試みられている。しかし、通常の細胞移植療法(肝細胞/膵島移植)では、生体から分離した未加工の状態の細胞を、血管(門脈)を経由して肝臓内に移植するため、血液内において移植細胞周囲で凝固系が活性化され炎症反応が惹起され、生着前に移植細胞の大部分が失われてしまう。また、生着に時間がかかるために、組織集団内において細胞の一部が死滅、もしくは本来発現している機能の多くを失ってしまっている。例えば膵島移植の場合は、膵島は直径50~500 μm の大きさの細胞塊であり、膵島分離の過程で膵島周囲と膵島内部をつなぐ血管網が消失するために、移植後サイズの大きい膵島(>150 μm)は、中心部が壊死しやすく、インスリン分泌量も少ないとの報告がある。これらのことから、組織工学技術等を利用して機能的な肝細胞や膵島細胞の組織体を形成し、それらを効率的に生体内に生着・機能させるための新たな移植法の開発が強く求められている。

研究代表者はこれまでに、マイクロ流体デバイスを用いて作製した異方的アルギン酸ハイドロゲルファイバーやシートを利用し、複数種の細胞によって構成され、さらに細胞の配置が正確に制御された、非球形(線形)の3次元微小細胞集塊を形成するための独自の手法を開発してきた。直線状の肝細胞集塊の周囲に単層の繊維芽細胞が接着した微小な線形肝細胞組織体の作製を行い、通常の平面培養と比較して、肝細胞の機能が劇的に向上することを確認してきた。これらの複合的な細胞集塊は、アルギン酸の有する免疫排除抑制効果のために、直接的な移植に適していると考えられるほか、単細胞と比較して、3次元的、高密度、かつ複合的な生体組織モデルを構築するための単位構造として効果的であり、生体内に移植した場合にその機能を早期に回復できるものと期待できる。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では、細胞移植による治療効果の改善を目指し、生体内において機能、生存面で有利な肝細胞や膵島細胞の機能性3次元組織を作製することを目的として研究を行った。より具体的には、以下に示す主に2つの目的で研究を行った。

(1) ハイドロゲル製微小チャンバーを用いたサイズを制御した膵島組織の作製

膵島は主に α 細胞と β 細胞によって構成され、その直径は50~500 μm である。小さい膵島は、大きい膵島に比較しインスリン分泌能や移植後の成績が優れていることが知られている。しかしながら、単離膵島細胞を用いて作製した膵島組織のサイズが膵島細胞の機能や生存等に与える影響については、ほとんど知られていない。本研究では、微小チャンバーを用いて細胞の集塊の大きさをマイクロスケールで制御することで、体内での長期生着・機能維持に有利な、最適な形状有する微小3次元膵島組織を作製した。100,300,500 μm の微小アガロースウェルに、ラット単離膵島細胞を播種することによりサイズを制御した膵島様組織を再構築し、作製膵島組織のサイズが膵島細胞の生存率、機能および細胞分布に与える影響について調べた。

(2) 細胞外マトリックスを用いた細胞の微小足場材料の作製およびそれを導入した高機能肝組織の作製

代謝性疾患や肝不全などの肝疾患の一時的機能補助を目的とし、肝細胞移植が行われてきた。しかしながら、一般的な門脈内に移植を行う肝細胞移植の場合、移植細胞のほとんどが炎症反応やKupffer細胞の貪食作用などにより死滅・排除されてしまう。それゆえ、移植効果は限定的であり、現時点では長期間肝細胞を生着させることが困難である。これらの欠点を補うために、高機能かつ体内での長期生着に有利な形状の肝組織を作製し、腹腔内や皮下などの血管外への移植に適応すれば移植効果が高くなることが期待される。生体肝臓では肝細胞は、コラーゲンやラミニンなどの細胞接着の足場となる細胞外マトリックス(ECM)成分に囲まれており、これらは細胞の生存や機能発現・維持に重要な役割を果たしている。既存の3次元培養で作製した肝組織(スフェロイドなど)は、適切で安定的な足場成分が存在しないため、機能の低下や細胞の壊死等が認められる。そこで生体外において生体組織の物理的・化学的環境を再現し、機能的3次元組織を再構築・長期維持するためのプロセスとして、細胞外マトリックス(ECM)成分を微粒子またはファイバー化するなど、それらを「細胞接着性の微小な足場」として利用する組織工学的手法を開発した。そして、それらを内包した微小肝組織を作製し、肝細胞の生存率や機能等の評価を行った。

3. 研究の方法

本研究は前述したように、主に(1)ハイドロゲル製微小チャンバーを用いたサイズを制御した膵島組織の作製(2)細胞外マトリックスを用いた細胞の微小足場材料の作製およびそれを導入した肝組織の作製を行った。

まず(1)については、移植可能かつ高機能な膵島様組織の作製を目指して、サイズを制御した膵島様組織の作製を行った。ラット膵臓より膵島を分離し、得られた膵島をトリプシン/EDTAにて処理し、単離膵島細胞を得た。微細加工技術を利用して作製した円形のハイドロゲル製微小チャンバーの内部にラット膵島細胞を導入することで、大きさを制御した直径50~200 μm

程度の膵島様組織を作製した。培養 7 日目に、膵島組織のサイズおよび ADP/ATP 比とインスリン分泌量を測定し作製した膵島様組織の機能評価を行った。また、組織学的評価も同時に行った。

次の (2) については、I 型コラーゲンを用いて線形や球形のマイクロメートルサイズの微小足場材料を作製した。球形の微小足場材料については、膜乳化法を用いて I 型コラーゲンの水溶液からなる非平衡状態の液滴が、連続相である酢酸メチルに徐々に溶解する現象を利用して、I 型コラーゲンが濃縮された微粒子を作製した。得られたコラーゲン粒子を化学的架橋剤であるゲニピンを用いて安定化した。また、マイクロ流体デバイスを利用して、I 型コラーゲン水溶液、リン酸緩衝液、および蒸留水をマイクロ流体デバイスに導入し、コラーゲンを流路内で連続的にゲル化させることで直径が 10 μm 程度のコラーゲンマイクロファイバーを作製した。流路内で生成されたファイバーを、高分子電解質水溶液を含む水溶液中に撈拌しながら回収することで、長さ 80 ~ 120 μm に断片化させた。

上記により作製した「微小な足場材料」と成体ラットより分離した肝細胞を混合し、肝組織を作製し、生存率、アルブミン分泌量、尿素合成量、薬剤による CYP1A, CYP3A の誘導能などを評価した。

4. 研究成果

(1) ハイドロゲル製微小チャンバーを用いたサイズを制御した膵島組織の作製

単離膵島細胞を直径 100, 300, 500 μm の微小アガロースウェルで作製した培養 7 日目の膵島組織のサイズはそれぞれ $77.2 \pm 5.9 \mu\text{m}$, $194.9 \pm 21.7 \mu\text{m}$, $274.8 \pm 39.2 \mu\text{m}$ であった (図 1)。

100 μm の微小ウェルで作製した小さな膵島組織では死細胞や低酸素状態にある細胞を認めなかったが、300, 500 μm では膵島組織の中心部に死細胞や低酸素状態の細胞を認めた。さらに、100 μm の微小ウェルで作製した膵島組織のインスリン分泌量は、その他の膵島組織に比較し、有意に高値であった (図 2)。また、100, 300 の微小ウェルで作製した膵島組織では、 α 細胞が辺縁部に β 細胞が中心部に局在し、生体内の膵島と同様の細胞分布であった。一方、500 μm の微小ウェルで作製した膵島組織では中心部に α 細胞が残存していた。ADP/ATP の値が小さいほど、分離後の膵島の機能が維持されていることが知られている。ADP/ATP 比は、ウェルサイズが大きいほど増加する傾向が見られた。

これらの結果から、単離膵島細胞を用いて作製したウェルの小さいサイズの膵島様組織は大きいサイズウェルに比し、中心部の死細胞や低酸素細胞の割合が少なく、さらにインスリン分泌量が有意に高値であることが明らかとなった。また、 α 細胞および β 細胞による膵島組織の再構成にサイズが関係していることが判明した。生体内膵島に類似した細胞配置と十分な機能を有する膵島様組織を再構築するためには、組織中心部に十分な酸素と栄養を供給するために 100 μm 以下のサイズにすることが重要であると考えられた。100 μm の微小ウェルで作製される 100 μm 以下の小さいサイズの作製膵島様組織は、3 から 5 倍大きいサイズの膵島様組織に比し、機能、生存面で有利であり、移植の際に効率の良い膵島様組織を用意できることが示唆された。

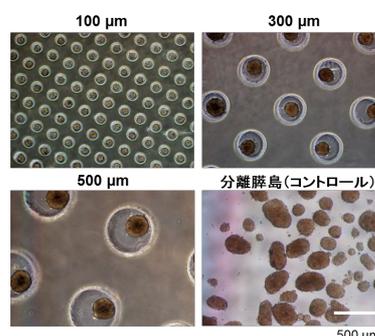


図1 培養7日目の微小チャンバー（直径100, 300, 500 μm ）内の膵島組織

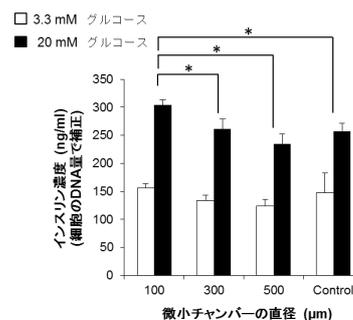


図2 インスリン分泌量 (培養7日目)

(2) 細胞外マトリックスを用いた細胞の微小足場材料の作製およびそれを導入した高機能肝組織の作製

ラットから肝細胞を単離し、作製したコラーゲン微粒子と混合し、非接着性のセルカルチャーインサートに播種、7 日間程度の静置培養を行ったところ、シート状の 3 次元積層組織が形成され、その形状は培養 7 日目においても維持された。コラーゲン微粒子を用いない場合には、細胞は複数の様々な大きさの集塊を形成し、シート状組織が形成されなかったことから、コラーゲン微粒子の細胞の足場としての有用性が確認された。組織の断面の様子を観察したところ、組織内部に空隙が形成されていた。これらの空隙は、組織内部に存在する細胞に対し、栄養分や酸素を供給する導管としての機能を担う可能性がある。また、ELISA 法により、アルブミン分泌量を測定したところ、培養 7 日目において、微粒子を過剰に加えるとアルブミン生産量が減少することを確認した。これは組織内の微粒子が細胞表面に多数接着し、細胞間の相互作用が阻害され、アルブミン分泌量の低下を招いたことが考えられる。これらのことから、形状として球形の微粒子は、肝組織形成に最適ではない可能性が示唆された。

続いて、マイクロ流体デバイスを用いて、線形の断片化コラーゲンマイクロファイバーの作製を行った。I 型コラーゲン水溶液、リン酸緩衝液および蒸留水を、マイクロ流体デバイスに連続的に導入し、流路内においてコラーゲン水溶液をゲル化させたところ、高強度かつ径の均一

なコラーゲンファイバーを連続的に生成することが可能であった。また、回収液として、アニオン性ポリマー水溶液を用いた場合、コラーゲンファイバーが濃度に応じて、50～600 μmの長さで断片化される様子が観察された。非接着性プレートにラット肝細胞と長さ80～120 μmの断片化コラーゲンマイクロファイバーを混合して播種したところ、コラーゲンマイクロファイバーは肝細胞間に取り込まれて、複合型のスフェロイドを形成した。通常のスフェロイドの場合には、徐々に細胞が凝集してスフェロイドのサイズが小さくなったが、コラーゲンマイクロファイバーを内包した肝スフェロイドでは、凝集が抑制された。培養7日目において、細胞生存率の比較を行ったところ、コラーゲンマイクロファイバーが内包されたスフェロイドでは、通常のスフェロイド培養と比較して有意に高い細胞生存率を示した。続いて培養3,6日目のアルブミン及び尿素産生量を測定した。培養6日目における、1ウェルあたりのアルブミンおよび尿素産生量は、通常のスフェロイドと比較して有意に高いことが確認された。さらにラットCYP1AおよびCYP3Aの誘導体である3-メチルコラントレン(3MC)または、プレグネノロン16-カルボニトリル(PCN)を培地に添加して3日間培養し、培養9日目にCYP1AおよびCYP3Aの酵素活性を測定した。その結果、コラーゲンマイクロファイバー内包したスフェロイドでは、通常のスフェロイドと比較して高い活性が誘導された。作製した断片化コラーゲンマイクロファイバーは、細胞の足場材料として有用であり、肝細胞の生存率および機能の向上に寄与した。これらのことから、断片化コラーゲンファイバーは、肝組織工学や移植への応用が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Iwadata H, Yamada M, Kimura N, Hashimoto R, Yajima Y, Utoh R, Seki M. PDMS microstencil plate-supported fabrication of ultra-thin, condensed ECM membranes for separated cell coculture on both surfaces. *Sensor Actuat B-Chem*, 2019;287:486-495. 査読有 DOI: 10.1016/j.snb.2019.02.067
2. Fujita I, Utoh R, Yamamoto M, Okano T, Yamato M. The liver surface as a favorable site for islet cell sheet transplantation in type 1 diabetes model mice. *Regen Ther*. 2018;8:65-72. 査読有 DOI: 10.1016/j.reth.2018.04.002
3. Sugimoto M, Kitagawa Y, Yamada M, Yajima Y, Utoh R, Seki M. Micropassage-embedding composite hydrogel fibers enable quantitative evaluation of cancer cell invasion under 3D coculture conditions. *Lab Chip*. 2018;18(9):1378-1387. 査読有 DOI: 10.1039/c7lc01280b
4. Yajima Y, Lee CN, Yamada M, Utoh R, Seki M. Development of a perfusable 3D liver cell cultivation system via bundling-up assembly of cell-laden microfibers. *J Biosci Bioeng*. 2018;126(1):111-118. 査読有 DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.01.022
5. Utoh R, Komori J, Kuge H, Tatsumi K, Yamada M, Hirohashi S, Tsutsumi M, Amanuma T, Yoshioka A, Nakajima Y, Wake K, Okano T, Lagasse E, Ohashi K.. Adult hepatocytes direct liver organogenesis through non-parenchymal cell recruitment in the kidney. *J Hepatol*. 2018;68(4):744-753. 査読有 DOI: 10.1016/j.jhep.2017.12.016
6. Yajima Y, Yamada M, Utoh R, Seki M. Collagen Microparticle-Mediated 3D cell organization: A facile route to bottom-up engineering of thick and porous tissues. *ACS Biomater. Sci. Eng*. 2017; 3(9):2144-2154. 査読有 DOI: 10.1021/acsbiomaterials.7b00131
7. Ichihara Y, Utoh R, Yamada M, Shimizu T, Uchigata Y. Size effect of engineered islets prepared using microfabricated wells on islet cell function and arrangement. *Heliyon*. 2016;2(6):e00129. 査読有 DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00129
8. Yamada M, Hori A, Sugaya S, Yajima Y, Utoh R, Yamato M, Seki M. Cell-sized condensed collagen microparticles for preparing microengineered composite spheroids of primary hepatocytes. *Lab Chip*. 2015;15(19):3941-51. 査読有 DOI: 10.1039/c5lc00785b

〔学会発表〕(計5件)

*筆頭演者としての演題のみ記す

1. 鵜頭理恵, 榎本紗希子, 山中啓吾, 山田真澄, 関 実「断片化マイクロコラーゲンファイバーを導入した肝細胞スフェロイド培養の肝機能への効果」化学工学会 第84年会, 2019年

2. 鵜頭理恵, 榎本紗希子, 山中啓吾, 山田真澄, 関 実「肝スフェロイド培養における断片化コラーゲンマイクロファイバー内包の効果」シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来, 2019 年
3. 鵜頭理恵, 小森淳二, Eric Lagasse, 大橋一夫「高チロシン血症 1 型モデルマウスの腎被膜下における肝非実質細胞の動員を伴う肝臓創生」第 17 回日本再生医療学会総会, 2018 年
4. 鵜頭理恵, 岡野光夫, 大橋一夫「腎被膜下異所性肝臓における新たな胆汁酸排出経路」第 25 回肝細胞研究, 2018 年
5. 鵜頭理恵, 大橋一夫, 和氣健二郎, 岡野光夫「長期肝障害刺激下における臓器サイズ異所性肝臓の作製」第 23 回 HAB 研究機構学術年会, 2016 年

〔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

研究協力者

山田 真澄 (YAMADA, Masumi)
千葉大学・大学院工学研究院・准教授

関 実 (SEKI, Minoru)
千葉大学・大学院工学研究院・教授

大和 雅之 (YAMATO, Masayuki)
東京女子医科大学・先端生命医科学研究所・教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。