

平成30年 5月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10028

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンターを用いた胆管構造を有する大型肝組織作製法の開発

研究課題名(英文) Development of the methods to fabricate a macro-scale liver tissue containing the bile duct using 3D bioprinter

研究代表者

柳 佑典 (Yanagi, Yusuke)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30596664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞、HUVEC、骨髄由来幹細胞を用いて96well 非接着性丸底プレート内で、高機能かつ、90%以上の成功率を持ってバイオ3Dプリンターによる積層が可能な、再現性の高いスフェロイド形成法を確定した。バイオ3Dプリンターを用いた立体的肝組織の大型化のため、効率的に組織培養を実施できるようにスフェロイド固定用の剣山の大型化や還流培養装置の開発・改良を行い、これまでより数倍大きな組織が作成可能となった。還流培養装置の開発・改良により肝細胞、HUVEC、MCより作成した立体肝組織の1か月の培養に成功した。作成した立体肝組織は血管様構造、さらに胆管様構造の構築が見られた。

研究成果の概要(英文)：We established the original culture protocol to reproducibly create the hepatic spheroids which contained human mature hepatocytes, HUVEC, BM-MSC. These spheroids showed high function and could be manipulated stably by the 3D bioprinter. We developed the large device to fix the spheroids and improved the circulating culture system to construct effectively a larger hepatic tissue using the 3D bioprinter. Following these works, we established the methods to fabricate the hepatic tissue several times as large as previous one. We cultured the hepatic tissues which contained mature hepatocytes, HUVECs and BM-MSC for 1 month. As a result, the tissue showed vascular formation and biliary constructs by the histological examination.

研究分野：肝再生

キーワード：肝再生 肝組織工学 細胞凝集反応

1. 研究開始当初の背景

肝不全や代謝性肝疾患といった重症肝疾患に対する唯一の根治療法として**肝移植**が行われているが、ドナー不足や免疫抑制剤による合併症は未だ大きな課題であり、新たな治療技術として再生医療への期待が高まっている。

我々は肝再生医療への応用を目的とし、これまでの肝臓の臓器構築に関する研究において、ヒト初代肝細胞、正常臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、骨髄由来幹細胞 (MSC) を独自の**バイオ 3D プリンター** (佐賀大学 中山) を用いて立体的に積みあげ、大きさ約 1cm^3 の**生体の肝臓に類似した毛細血管構造を有する立体的肝組織の構築に成功**した。しかし、肝移植に代わる治療法の開発にはさらに**組織の大型化**が必要である。我々の技術での組織構築は細胞同士の接着性によるため、既に作製に成功している小さな肝組織をさらに接着して積み上げることで組織同士が癒合し、組織の大型化が可能である。しかし、肝臓においては血管構造だけでなく、胆汁排泄可能な**胆管構造**を構築しなければ、胆汁うっ滞性肝障害を来すため、組織の大型化には胆管構築が不可欠であった。

2. 研究の目的

バイオ 3D プリンターで作製した立体肝組織の大型化および胆管構造の構築を行い、**再生医療に応用可能な大型肝組織の創出**技術開発を目指す

3. 研究の方法

肝組織大型化

これまでの方法で作製した小さな肝臓を癒合させるための、組織の配列方法や培養方法検討を行い、肝組織の大型化の方法を確立する。

組織・機能評価

作製した大型肝組織の毛細血管構造・胆管構造の連結の評価を行い、内部構造の評価

を行うとともに、肝特異的機能分析を行い、再生医療への応用性の検討を行う。

4. 研究成果

肝細胞、HUVEC、骨髄間葉系幹細胞を 96well 非接着性丸底プレートに播種し、細胞凝集塊 (スフェロイド) を作成した。スフェロイドの形成期間、大きさ、形状およびアルブミン産生能を解析し、90%以上の成功率を持ってバイオ 3D プリンターによる積層が可能な、再現性の高いスフェロイド形成法を確定した。

バイオ 3D プリンターを用いた立体的肝組織の大型化のため、効率的に組織培養を実施できるようスフェロイド固定用の剣山の大型化や還流培養装置の開発・改良を行った。

これまでの 3 倍のサイズの剣山を用いて安定して積層できる条件を確立し、大きな剣山でも立体が作れることを確認した。さらに、一定サイズのスフェロイドが作れるようになったことで、剣山に固定する際のスフェロイドの間隔を調整して、スフェロイド癒合に効率のよい間隔を決定した。この結果、これまでより数倍大きな組織が作成可能となった。さらに還流培養装置の開発・改良により肝細胞、HUVEC、MC より作成した立体肝組織の 1 か月の培養に成功した。作成した立体肝組織は血管様構造を認め、さらに胆管上皮細胞のマーカーである CK19+ の細胞がみられ胆管様構造の構築が見られた。種々の免疫染色からこの細胞は成熟肝細胞から胆管上皮に分化していることがわかった。これらの成果を Scientific Reports に報告した。

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1件)

Yanagi Y, Nakayama K, Taguchi T, Enosawa S, Tamura T, Yoshimaru K, Matsuura T, Hayashida M, Kohashi K, Oda Y, Yamaza T, Kobayashi E. *In vivo* and *ex vivo* methods of growing a liver bud through tissue connection. Scientific Reports 7, Article number: 14085 (2017) doi:10.1038/s41598-017-14542-2

〔学会発表〕(計7件)

・第53回日本小児外科学会(H28年5月24~26日 福岡): パネルディスカッション「小児における移植医療のさらなる発展と再生医療の展望」、演題「乳歯肝細胞を用いた肝再生医療研究」

・第52回日本周産期・新生児医学会学術集会(H28年7月16~18日 富山): シンポジウム「新生児外科の移植医療と再生医療」、演題「乳歯幹細胞を用いた肝再生研究の現状と展望」

・第116回日本外科学会(H28年4月 大阪):「細胞の自己組織化を応用した3Dプリンティング技術による肝組織構築」

・第34回日本肝移植研究会(H28年7月7~8日 旭川): 「肝オルガノイド移植」

・第16回 日本再生医療学会総会(H29年3月7~9日 仙台): シンポジウム 細胞凝集研究の最前線

「バイオ 3D プリンターを用いた scaffold-free 細胞構造体による小児外科領域に再生医療研究」

・IPTA 2017 (H29年6月 パルセロナ) Biofabrication of a transplantable macroscale liver tissue using a 3D

bio-printer (Oral)

・第44回 日本臓器保存生物医学研究会(H29年11月 大阪): シンポジウム 細胞移植「肝細胞移植の課題克服への戦略」

〔図書〕(計1件)

1. 柳 佑典, 山座 孝義, 山座 治義, 野中 和明, 中山 功一, 吉丸 耕一朗, 岩中 剛, 高橋 良彰, Yuniartha Rathi, 松浦 俊治, 孝橋 賢一, 小田 義直, 大賀 正一, 絵野沢 伸, 小林 英司, 田口 智章: 乳歯幹細胞を用いた肝再生研究. 小児外科 (0385-6313)49巻6号 Page567-571(2017.06)<3>

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

柳 佑典 (YANAGI, Yusuke)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・
研究員

研究者番号 : 30596664

(2)研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授

研究者番号 : 20197247

中山 功一 (NAKAYAMA Koichi)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・
教授

研究者番号 : 50420609

林田 真 (HAYASHIDA, Makoto)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・
共同研究員

研究者番号 : 70452761

孝橋 賢一 (KOHASHI, Kenichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・
講師

研究者番号 : 10529879

松浦 俊治 (MATSUURA, Toshinaru)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講
師

研究者番号 : 10532856

(3)連携研究者

山座 孝義 (YAMAZA, Takayoshi)

九州大学・歯学(系)研究科(研究院)・
准教授

研究者番号 : 80304814