

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間： 2006 ~ 2008

課題番号： 18360399

研究課題名 (和文) 完全置換型人工肝臓開発に関する研究

研究課題名 (英文) Basic studies on the development of implantable artificial liver

研究代表者

井嶋 博之 (IJIMA HIROYUKI)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号： 10274515

研究成果の概要： 肝細胞と類洞内皮細胞との共培養は有効だが、肝機能発現に対しては、肝細胞の球状組織体包埋コラーゲンゲル培養が最も優れていた。肝細胞増殖因子 / ヘパリンの共固定化基材上において肝細胞の組織形成と機能発現は有意に向上した。そこで生体温和な酵素を利用した細胞包埋ヒドロゲル充填多孔質スカフォールド培養系を開発し、良好な肝機能発現と力学強度の保持を実現した。さらに、移植実験において新生肝組織構築の基盤技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：生物化学工学

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：人工肝臓、共培養、肝細胞、類洞内皮細胞、細胞外マトリックス、肝細胞増殖因子、アルブミン合成、薬物代謝

1. 研究開始当初の背景

国内の肝症患者数は160万人とも200万人ともいわれ、年間3万人を超える方々が亡くなっておられる。重篤な肝不全患者の根本的治療法は肝移植しかないが、1997年に臓器移植法が実施されて以来、2004年度までの累計でも28件の移植実施成績しかなく、生体部分肝移植においてさえも2003年度実績で439件の実施にとどまっている。つまり慢

性的なドナー不足のため、ほとんどの患者は移植を切望しながらも待機中に亡くなっておられる。海外においても脳死肝移植と生体部分肝移植の比率こそ違えども、慢性的なドナー不足の状況は同じである。そのため、生体肝臓のように患者への負担がかからず、高機能性を発現できる人工肝臓開発が切望されている。

2. 研究の目的

本研究では、毛細血管網を有した新規肝細胞組織体構築により、移植医療に取って代わる完全置換型人工肝臓の開発を最終目標としている。以前の研究において、私を含む研究グループは肝細胞のみからなる組織体形成による高い肝機能発現系を見出し、実用的なハイブリッド型人工肝臓装置開発に成功している。さらに、生体吸収性の細胞固定化担体への毛細血管網構築とそれに伴う移植肝細胞の生着および肝機能発現を確認している。しかしながら、それら肝細胞の残存は1%にも満たず、移植肝細胞死滅の遅延効果であったことが危惧される。そこで本課題では、肝細胞と類洞内皮細胞からなる新規肝細胞組織体の構築と肝機能発現の更なる向上を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 共培養

初代ラット肝細胞ならびに初代ラット肝非実質細胞は6-8週齢ウイスターラットよりコラゲナーゼ灌流法およびパコール密度勾配遠心分離法により取得した。氷冷下で酸性コラーゲン溶液、濃縮培地および濃縮 pH 緩衝液を混合し、細胞を懸濁後 30 分のインキュベートにより 0.24%コラーゲンゲルを形成させ、培養に供した。一方、細胞を細胞低接着処理が施された 96 マルチウェルプレートに播種することでスフェロイド培養を行った。

(2) 機能性分子固定化コラーゲンフィルム

所定量の I 型コラーゲンを 24 もしくは 48 ウェルプレート内にて風乾してコラーゲンフィルムを得た。水溶性カルボジイミドを用いて上記フィルム上にヘパリンを化学固定化した。さらに、その上部から HGF 溶液を滴下することで、ヘパリンと HGF との親和性を利用した HGF/ヘパリン固定化コラーゲンフィルムを作製した。

(3) 細胞包埋ヒドロゲル充填多孔質スcaffolds 培養

ソルトリーチング法で作製したポリ乳酸多孔体およびポリウレタンフォームを多孔質スcaffolds として使用した。スcaffolds の細孔内へのゾルの浸潤性を高めるために、牛血清アルブミンで表面被覆したスcaffolds を作製した。また、後述するラット皮下移植に用いる際には希釈したラット血清で表面被覆した。本課題では哺乳動物肝臓由来のトランスグルタミナーゼを用いて、37 °C にてゼラチンをゲル化させた。このゲル化プロセスにおいて細胞障害性は何ら

確認されなかった。

(4) 皮下移植

肝細胞包埋ヒドロゲル充填ポリウレタン多孔質体をラットへ皮下移植した。増殖因子/ヘパリンの添加や部分肝切除術とを組み合わせた検討を行った。所定の移植期間後、サンプルを回収して組織学的手法により評価した。

4. 研究成果

(1) コラーゲンゲル内における肝細胞共培養

肝芽腫由来細胞株 (HepG2) とウシ動脈由来血管内皮細胞 (BECs) を用いたコラーゲンゲル内共培養において、HepG2 細胞によるスフェロイド形成や BECs に起因する管腔形成は確認されたものの、肝機能発現の向上は見られなかった。一方、コラーゲンゲル内培養において、培養 9 日目では初代ラット肝細胞単独培養系はアルブミン合成活性をほぼ喪失したのに対して、初代ラット肝実質細胞と初代肝非実質細胞との共培養系は培養初期の約 70%の活性を保持していた。さらに、初代ラット肝実質細胞と初代肝類洞内皮細胞との共培養により、培養期間を通してアルブミン合成活性の低下は観察されなかった。一方、細胞低接着性表面における初代細胞共培養系において、スフェロイド形成とその維持に効果が見られた。肝細胞の 10 倍量の肝非実質細胞との共培養により、培養 3 週間後でも初期の約 60%のアルブミン合成活性を発現し、肝細胞の 5 倍量の類洞内皮細胞との共培養では培養 11 日目において約 2 倍の活性を発現した。

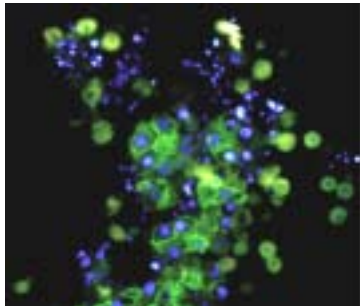
(2) 肝細胞 肝類洞内皮細胞共培養系の最適化

肝細胞と肝類洞内皮細胞との共培養スフェロイドは同種細胞からなるクラスタの集合体として形成され (図 1)、アルブミン合成活性および薬物代謝活性の発現に有効であった。一方、コラーゲンゲル内分散培養では内皮細胞用の培地では上記機能に対する共培養効果が得られたが、肝細胞用の培地に血管内皮細胞増殖因子を添加した培地では肝機能発現レベルは向上するものの共培養効果は見られなかった。しかしながら、基底膜成分モデルとして知られるマトリゲル培養により、肝細胞用培地においても類洞内皮細胞数依存的に共培養効果が得られた。

アルブミン合成活性に対する肝細胞と肝非実質細胞との共培養結果をまとめることにより以下のことが明らかとなった (図 2)、肝機能を最も大きく左右しているのは培地組成である。スフェロイド培養において肝細胞

胞と類洞内皮細胞との共培養は有効である。一方、コラーゲンゲル培養ではアルブミン合成活性は向上するものの、共培養効果は見られない。さらに、コラーゲンゲル内スフェロイド培養が最も優れた肝機能発現とその維持を示す。これは肝細胞間相互作用と細胞周囲環境の改善を両立できたことに起因すると考えられる。しかしながら、培養系の高度化に伴い、機能発現に対する共培養効果は見られなくなった。したがって、肝細胞と類洞内皮細胞との共培養は肝機能ではなく、毛細血管網構築という組織構造構築の面に特化した最適設計が今後重要になるものと考えられる。

Co-culture spheroid (Hepatocytes & SEC)



Blue: Hoechst 33342, Green: Cytokeratin 18

図1 肝細胞と類洞内皮細胞からなる組織体の蛍光免疫染色写真。細胞の核と肝細胞がそれぞれ青と緑に染色されている。

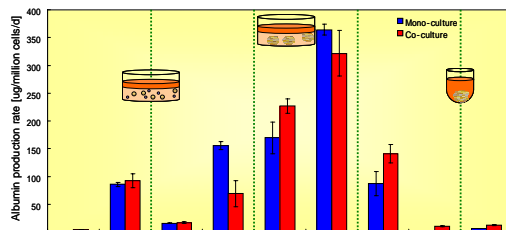


図2 アルブミン合成活性に対する肝細胞と肝非実質細胞 / 肝類洞内皮細胞との共培養結果のまとめ。

(3) 機能性分子固定化培養基材の開発

コラーゲン基材にヘパリンを化学固定化することにより、ヘパリンと肝細胞増殖因子(HGF)の親和性を利用したHGF固定化コラーゲン培養基材を開発した。本基材上では通常コラーゲン基材培養で見られない初代ラット肝細胞のスフェロイド形成が確認された。さらに、本基材上における肝細胞のアルブミン合成活性はHGF添加培地と同程度の高発現と維持を示した。

さらに、ヘパリン/HGF固定化コラーゲン培養基材の最適化を行った。初代ラット肝細胞

胞の形態はヘパリンの固定化密度に大きく依存し、スフェロイド形成ならびに肝機能発現に対してヘパリンの最適固定化密度が存在した。さらに、様々な密度のHGF/ヘパリン固定化基材を用いた肝細胞培養の結果、細胞生存および肝機能発現におけるHGFの効果を確認された。しかし、その効果よりもヘパリン固定化密度に呼応したスフェロイド形成促進の有無の影響が大きいことが明らかとなった。

(4) 肝細胞包埋ヒドロゲル充填多孔質スカフールド培養技術の開発

前述の結果を踏まえた新たな肝組織構築技術の開発には、細胞のヒドロゲル包埋と多孔質スカフールドの組み合わせが不可欠である。そこで本課題では肝臓由来酵素に着目した。親水化処理した多孔質スカフールドに細胞懸濁ゼラチン/コラーゲン液(肝臓由来酵素含有)を滴下することで、スカフールドの細孔内へ10%までのゼラチン溶液が良好に浸潤できた。さらに、30分程度のインキュベートで細胞障害性がない酵素によるゲル化に成功した。これにより、細胞親和性と力学強度を有する機能性培養技術を開発することが出来た。この肝臓由来酵素を用いた肝細胞包埋ゼラチンゲル充填多孔質スカフールド培養技術について各種評価を行った。肝細胞はコラーゲンゲル培養と同等の肝機能を発現とその維持を示し、本培養技術が優れた肝細胞培養技術になることを実証した。さらに、HGF/ヘパリン含有ゲルを用いた検討において肝機能発現とその維持はさらに向上した。

(5) 肝細胞包埋ヒドロゲル充填多孔質スカフールドのラットへの皮下移植

肝細胞分散包埋コラーゲンゲル充填ポリウレタン発泡体をラットに皮下移植した。ポリウレタン発泡体は移植10日目でも何の変化も無く、新生組織の梁材として良好に機能していた。一方、ゲルは移植期間と共に分解し、移植9日目における残存量はわずかであった。また、単一細胞分散状態で移植した肝細胞の一部は移植9日目でもクラスターを形成して生存しており、わずかではあるが、移植スカフールド内における肝組織新生が期待された。加えて、そのクラスター内外において毛細血管と見受けられる構造が多数構築されていた。

新たな肝組織構築技術として確立するためには、生体内におけるヒドロゲルの分解速度の抑制と新生肝組織の肥大化に向けた更なる最適化が今後必要である。さらに、スフェロイド状態の肝細胞の包埋ならびに類洞内皮細胞の導入により、実用的な新生肝組織構築技術を開発していく必要がある。

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4件)

Hiroyuki Ijima, Yasuo Kakeya, Toru Yokonuma, Yung-Te Hou, Takayuki Takei, Composition of culture medium is more important than co-culture with hepatic non-parenchymal cells in albumin production activity of primary rat hepatocytes, and the effect was enhanced by hepatocytes spheroid culture in collagen gel, *Biochemical Engineering Journal*, in press, 査読有

Hiroyuki IJIMA, Yasuo KAKEYA, Monolayer culture of primary rat hepatocytes on an Arg-Gly-Asp (RGD)-immobilized polystyrene dish express liver-specific functions of albumin production and p-acetamidophenol metabolism the same as for spheroid culture, *Biochemical Engineering Journal*, 40, 387-391, 2009, 査読有

Hiroyuki IJIMA, Takeshi MATSUO, Koei KAWAKAMI, The mixed coculture effect of primary rat hepatocytes and bone marrow cells is caused by soluble factors derived from bone marrow cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 226-231, 2008, 査読有

[学会発表](計19件)

井嶋博之、侯詠徳、尾方良平、久保孝文、松本峻一、武井孝行、境慎司、川上幸衛、肝細胞増殖因子を固定化した培養基材における初代ラット肝細胞の組織形成と機能発現、第8回日本再生医療学会総会、2009年03月05日、東京国際フォーラム
Yung-Te HOU, Takayuki TAKEI, Shinji SAKAI, Hiroyuki IJIMA, Koei KAWAKAMI, Effect of immobilized hepatocyte growth factor on albumin secretion activity and spheroid formation in hepatocyte culture、The 21th International Symposium on Chemical

Engineering、2008年12月6日、佐賀大学

Y. -T. Hou, T. Takei, S. Sakai, H. Ijima and K. Kawakami, Effect of immobilized hepatocyte growth factor on albumin secretion and spheroid formation of hepatocyte in 2-dimensional culture、The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology、2008年11月26日、福岡国際会議場

久保孝文、武井孝行、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、HGF-ヘパリン固定化コーゲンフィルム上における初代ラット肝細胞培養、化学工学会姫路大会、2008年11月17日、ホテル日航姫路

Yung-Te Hou, Takafumi Kubo, Shinji Sakai, Hiroyuki Ijima, Koei Kawakami, Hepatocyte Growth Factor Enhances Spheroid Formation of Primary Rat Hepatocytes and Expression of Albumin Production Activity、8th World Biomaterials Congress、2008年5月29-31日、Amsterdam (Netherlands)

Hiroyuki Ijima, Yasuo Kakeya, Ryohei Ogata, Yung-Te Hou, Takafumi Kubo, Shinji Sakai, Koei Kawakami, Formation of Co-cultured Hepatocyte Spheroid Which Aimed at Liver Tissue Engineering, and Preliminary Study for the Device、8th World Biomaterials Congress、2008年5月29-31日、Amsterdam (Netherlands)

井嶋博之、掛谷泰雄、尾方良平、久保孝文、侯詠徳、境慎司、川上幸衛、肝組織工学構築を目指した基礎的研究、第41回九大生体材料・力学研究会、2008年3月21日、九州大学、福岡市

井嶋博之、掛谷泰雄、尾方良平、侯詠徳、久保孝文、境慎司、川上幸衛、肝組織工学を目指した肝細胞共培養スフェロイド形成と装置化に向けた基礎的検討、第7回に本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋国際会議場、名古屋市

Hiroyuki Ijima, Yasuo Kakeya, Ryohei Ogata, Yung-Te Hou, Takafumi Kubo, Toru Yokonuma, Shinji Sakai, Koei Kawakami, Development of hepatocyte co-culture method which aimed at liver tissue engineering, and preliminary study for the device、TERMIS-AP 2007 (Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society, Asia-Pacific Chapter Meeting 2007)、2007年12月3日、Grand Prince Hotel Akasaka, Tokyo

尾方良平、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、

ヒドロゲル充填多孔質担体の開発と肝細胞培養基材としての性能評価、第14回日本生物工学会九州支部大会(長崎大会)、2007年12月1日、長崎大学、長崎市 Yasuo Kakeya, Toru Yokonuma, Shinji Sakai, Hiroyuki Ijima, and Koei Kawakami、Development of co-culture method for primary rat hepatocytes based on collagen gel culture、The 20th International Symposium on Chemical Engineering, Daejeon /Chungnam (Korea)-Kyushu (Japan)、2007年12月1日、Hanbat National University, Daejeon, Korea

掛谷泰雄、横沼徹、尾方良平、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、初代ラット肝細胞と肝非実質細胞とのコラーゲンゲル内およびスフェロイド共培養による肝機能発現、第59回日本生物工学会大会、2007年9月25日、広島大学、東広島市 掛谷泰雄、横沼徹、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、初代ラット肝細胞のコラーゲンゲル内共培養系の構築とその肝機能及び組織学的評価、化学工学会第39回秋季大会、2007年9月13日、北海道大学、札幌

井嶋博之、動物細胞の機能性組織培養技術の開発と代謝系臓器構築への展開、第44回化学関連支部合同九州大会、2007年7月7日、北九州国際会議場、北九州市 Hiroyuki Ijima, Toru Yokonuma, Yasuo Kakeya, Shinji Sakai, Koei Kawakami、Expression of maintenance of liver specific function of primary rat hepatocytes co-cultured with hepatic non-parenchymal cells in collagen gel、TERMIS NA 2007 Conference and Exhibition、2007年6月14日、Toronto, ON (Westin Harbour Castle), Canada Hiroyuki Ijima, Toru Yokonuma, Shinji Sakai, Koei Kawakami、Spheroid

formation and expression of liver specific function of primary rat hepatocytes co-cultured with hepatic non-parenchymal cells、ASAIO's (American Society for Artificial Internal Organs) 53rd Annual Conference、2007年6月7日、Chicago, IL (Palmer House Hilton), USA

掛谷泰雄、松尾健、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、初代ラット肝細胞の薬物代謝酵素活性に及ぼす培養環境の影響、化学工学会第72年会、2007年03月、京都大学

横沼徹、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、肝細胞と血管内皮細胞との共培養による肝機能発現の検討、日本生物工学会九州支部鹿児島大会、2006年12月、鹿児島大学

武井孝行、境慎司、井嶋博之、川上幸衛、任意形状の血管様構造体の作製およびHep G2との共培養、第58回日本生物工学会大会、2006年09月、大阪大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井嶋 博之 (IJIMA HIROYUKI)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：10274515

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：