

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09222

研究課題名(和文) 肝組織由来スフェロイド(LTOSs)を用いた複合型肝細胞シートの開発

研究課題名(英文) Research on the Development of Composite Hepatocyte Sheets Using Liver Tissue-Derived Spheroids (LTOSs)

研究代表者

丸橋 繁 (MARUBASHI, Shigeru)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20362725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝組織本来の微少組織構築が形成される複合型肝細胞シート(複合型LTOSsシート)の作成を目指して研究を行なった。正常肝組織から肝細胞単独分離法を応用して、LTOSsを分離する方法を工夫し最適化した。精製したLTOS細胞は、死細胞は少なくViabilityが保たれていた。LTOS細胞の培養法では、添加物の最適化を行い、Matrigelを用いた3D培養を行い、EZSPHEREを用いることで効率的に培養が可能であった。一方、複合型LTOSシートの作成方法や最適化条件の確立まで明らかにすることはできなかった。今後の継続研究においてこれらの課題を明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は、多彩な機能を有しており、再生可能臓器であることはよく知られた現象であるが、そのメカニズムは依然として不明な点が多い。一方で、肝細胞としてばらしてしまうと非常に弱い細胞になる。これまで肝不全や肝硬変に対し、肝細胞移植やliver budの作成など、さまざまな研究が行われてきているが、依然として臨床応用のレベルには達していない。本研究で着想したLTOSは、肝臓の機能を持つ最小単位概念を塗り替える可能性があり、将来の肝臓機能の細胞レベルでのコントロールを可能とする技術につながる可能性が見出された、重要な研究成果となった。今後、継続的な研究を予定しており、さらなる発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We conducted research aiming to create a composite liver cell sheet (composite LTOSs sheet) where the original microtissue structure of liver tissue is formed. We adapted and optimized a method to isolate LTOSs using a hepatocyte isolation technique from normal liver tissue. The purified LTOS cells had minimal dead cells and maintained viability. For LTOS cell culture, we optimized additives, performed 3D culture using Matrigel, and efficiently cultured cells using EZSPHERE.

However, we were unable to establish the method for creating and optimizing composite LTOS sheets and their conditions. It is planned to address these challenges in future ongoing research.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝再生 肝細胞 3D培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝疾患に対する再生医療は機能的肝細胞の分化誘導研究に始まり、近年目覚ましい進歩をとげているものの、肝細胞再生医療の有効性は現時点では不明確である。これまでに、iPS 細胞からの肝原基の作成や、肝細胞から細胞シートを作成するなど、いくつかの革新的な技術が報告されてきた。(Nature 499:481-4, 2013, Nat med 13:880-5, 2007)しかし、これらの方法でも肝細胞とこれを取り囲む支持組織としての特徴は認められるものの、胆管成分などを含む高度な肝機能を有する「肝組織」までは至っていない。

このような背景の中、末期肝硬変・肝不全の治療法として、本来の肝組織の持つ再生能力を操作し、少量の肝細胞塊から肝組織を再生し、さらに高度な組織機能を構築するためにはどのようにすれば良いか、という本研究の核心をなす学問的問いに到達した。

この命題を解決するため本研究では、従来の肝細胞再生医療の技術に加え、細胞間接着に着目した。腫瘍を培養する際に、細胞間接着をすべて外してしまうと、元々の組織の性質が失われ増殖能が妨げられる、一方で細胞間接着をある程度保持した状態すなわち cancer tissue -originated spheroids (CTOSs) では元の組織の性質が保たれ増殖が容易であることが報告された (PNAS 108 (15) 6235-6240, 2011)。そこで我々は、この技術を正常肝組織に応用し、肝組織から細胞間接着をある程度保持した肝微小組織 liver tissue-originated spheroids (LTOSs) を用いて、肝再生機構を制御することにより、有効な組織機能をもつ肝組織の作成が可能であると着想した。

### 2. 研究の目的

肝組織再生では、肝細胞の生存に必須な細胞間接着を保ちつつ、支持細胞・組織との相互作用を最適化し、立体組織内部への血管誘導促進と肝細胞の増殖・成熟を実現する必要がある。この命題を解決するために、我々は独自に、3次元培養技術を応用した癌細胞の培養技術とこれまで教室で臍島細胞を用いて研究してきた間葉系幹細胞シートを併用する手法を考案した。本研究の独自性・創造性は肝組織から得られる細胞間接着を有した肝組織スフェロイド; Liver tissue-originate spheroids (LTOSs)を用いることである。この LTOSs を間葉系幹細胞と血管内皮細胞で作成したシート上で培養することにより、肝組織本来の微小組織構築が形成されることが期待される。また独自性・創造性として、教室で行って来た臍島シートを肝細胞支持組織として使用することである。臍島と LTOSs の類似性に着目しシート化した間葉系幹細胞 (MSC あるいは ADSC) に血管内皮細胞 (VEC) を加え、肝細胞の LTOSs を積層化した複合型肝細胞シート (複合型 LTOSs シート) を作成し、肝組織再生に必要な立体組織の作製を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1. 肝組織より LTOSs の作成と培養方法の確立

B6 マウスより肝臓を摘出し、肝組織を 2mm 角に刻み、Liberase (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、東京) で 2 時間分解し、微小肝組織を分離する。Liberase の濃度および作用時間は肝細胞が単離せず接着した状態を保持する最適な条件で行う。まずは、100  $\mu$  および 40  $\mu$  の Cell strainer を利用して LTOSs を回収する。最終的な回収効率や cell viability を最適化するための様々な手順や条件を決定する。

#### 2. 間葉系幹細胞シートを用いた複合型 LTOSs シートの作成

B6 マウスの皮下脂肪より脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) を分離し、シート状に培養し、その上に LTOSs とマウス血管内皮細胞を散布し積層化した複合型肝細胞シートを作成する。

#### 3. ヒト型コラーゲン様リコンビナントペプチド (RCP, Cellnest, 富士フィルム) を用いた複合型 LTOSs シートの作成

RCP を加工し、多孔性 RCP を作成する。これを 3D 骨格として、LTOSs 細胞、MSC、血管内皮細胞を共培養し、複合型 LTOSs シート (RCP シート) を作成する。複合型遊離肝細胞シートを作成し、肝機能評価における複合型 LTOSs 肝細胞シートとの比較対照とする。

### 4. 研究成果

正常肝組織から肝細胞単独分離法を応用して、LTOSs を分離した。肝細胞単独分離法では、40  $\mu$  m のフィルターを用いているが、LTOSs の場合は 200  $\mu$  m フィルター、77  $\mu$  m スフェロイドキャッチ (WATSON CO., LTD, Tokyo) を用いて LTOSs を採取した。採取した LTOSs を 50%、70% パーコールを用いて死細胞や肝細胞以外の単細胞 (Kupper 細胞、胆管上皮細胞、星状細胞など) と分離し、Viability の高い LTOSs を分離した。分離した LTOSs は、EZSPHERE (AGC Techno Glass Co. Ltd., Tokyo) を用いて多孔性 RCP との複合共培養を行なった。

肝細胞分離法で得た細胞懸濁液を 77  $\mu$ m スフェロイドキャッチを用いて LTOSs を作製した(Fig1)。LTOSs の構成細胞の生存率を確認するために、PI/Calcein-AM 染色を行なった。培養直前の LTOSs では、死細胞は少なく、Viability は保たれていた。(Fig1)



Fig1

作製した LTOSs を HE 染色(Fig2)、PAS 染色(グリコーゲン, Fig3)、免疫染色として抗 CK18 抗体(肝細胞, Fig4)、抗 CK7 抗体(胆管上皮細胞, Fig5)、抗 CD31 抗体(血管内皮細胞, Fig6)を用いて染色した。培養直後の LTOSs では肝細胞(Fig3)、胆管上皮細胞(Fig4)、血管内皮細胞(Fig5)を確認した。しかし、PAS 染色(Fig3)では一部の肝細胞で染色されるのみであった。

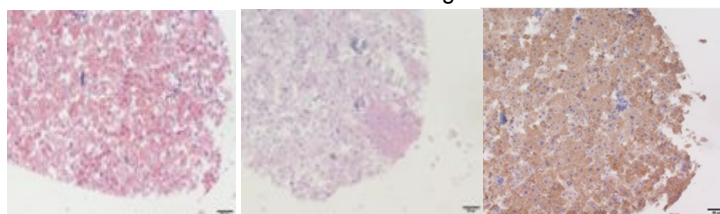


Fig2

Fig3

Fig4

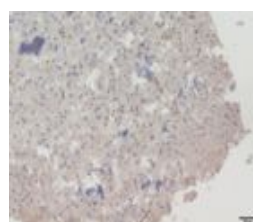


Fig5

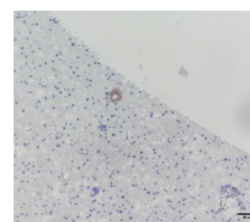


Fig6

回収した LTOSs を、EZSPHERE を用いて培養をした。培養液は、Mouse Hepatic Progenitor Organoid Culture(Veritas,Tokyo)を用い、添加物は OSM、TNF- $\alpha$  をそれぞれ添加し、比較した。培養した LTOSs の Viability は、培養 4 時間後、培養 1 日目、培養 4 日目に、PI/Calcein-AM 染色を行ない確認した。培養 4 時間後では、OSM、TNF- $\alpha$  で差は認めなかったが(Fig6,7(上段: OSM, 下段: TNF- $\alpha$  )), 培養 1 日目(Fig8(上段: OSM, 下段: TNF- $\alpha$  )), 4 日目(Fig9(上段: OSM, 下段: TNF- $\alpha$  ))では優位な差は認めないものの、OSM を添加した LTOSs の方が、生細胞が多い傾向にあった(Fig6, Fig8, Fig9)。

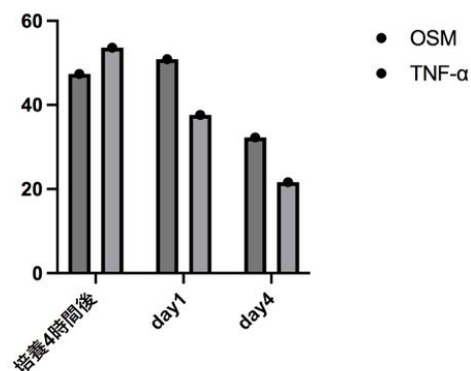


Fig6

培養 4 日目の LTOSs を PI/Calcein-AM 染色で観察すると、中心で死細胞の数が増加していた(Fig9)。原因としては、スフェロイドの中心は、酸素や栄養の供給が悪く、中心壊死を起こしやすい。そのため、細胞死を抑制することが知られている ROCK キナーゼ阻害剤の添加や量の調整が必要であると考えられた。

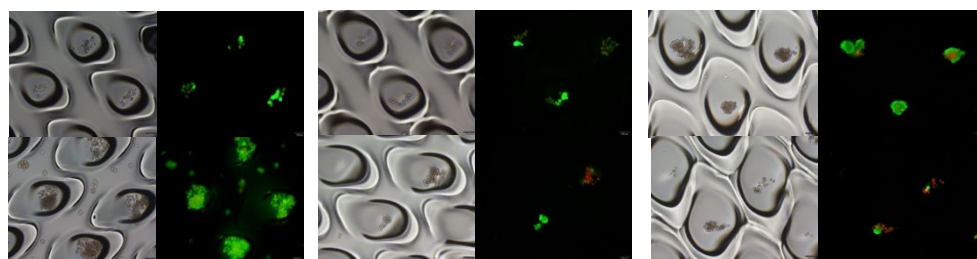


Fig7

Fig8

Fig9

以上のように、LTOS の分離、培養の方法と最適化条件について、研究を進めることができた。一方で、複合型 LTOS シートの作成方法や最適化条件の確立まで明らかにすることはできなかった。今後の継続研究においてこれらの課題を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武藤 亮  (MUTO Makoto)  (10791478)	福島県立医科大学・医学部・助手   (21601)	
研究分担者	鈴志野 聖子  (SUZUSHINO Seiko)  (20816376)	福島県立医科大学・医学部・助手   (21601)	
研究分担者	石亀 輝英  (ISHIGAME Teruhide)  (50583358)	福島県立医科大学・医学部・講師   (21601)	
研究分担者	清水 裕史  (SHIMIZU Hiroshi)  (70553709)	福島県立医科大学・医学部・講師   (21601)	
研究分担者	佐藤 直哉  (SATO Naoya)  (90622332)	福島県立医科大学・医学部・助教   (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------