

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24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650106

研究課題名（和文） 毛細胆管と胆管の融合による複合肝組織再生手法の革新

研究課題名（英文） Innovative method of combined hepatic tissue regeneration by the connection of bile canaliculi and bile ducts

研究代表者

須藤 亮 (SUDO RYO)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：20407141

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞周囲の酸素環境と柔軟性をコントロールすることによって複合肝組織を生体外で再構築することを目的とした。すなわち、従来の培養方法では個別に再生されていた毛細胆管（肝細胞から再生される）と胆管（胆管上皮細胞から再生される）を生体外で融合することを試みた。細胞周囲の酸素環境は酸素透過性の高いシリコーン樹脂を用いることで調節し、柔軟性は細胞培養の足場となるコラーゲンゲルの硬さを変えることで調節した。その結果、細胞周囲の酸素環境が胆管と毛細胆管の融合において重要な制御因子となることを見出した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to reconstruct a combined hepatic tissue by controlling oxygen concentration and elasticity in cellular microenvironments. Specifically, we aimed to combine bile canaliculi, which are formed by hepatocytes, and bile ducts, which are formed by biliary epithelial cells. Oxygen concentration was controlled using an oxygen permeable silicone membrane while elasticity was controlled by changing the elasticity of collagen gel that is a cellular scaffold. We found that oxygen concentration around cells is an important regulatory factor for combining bile ducts and bile canaliculi.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	330,000	3,130,000

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：人工臓器工学・再生医工学

1. 研究開始当初の背景

肝臓は生命維持に関わる重要な臓器であり、その再生手法の開発が強く望まれている。我々は、従来研究において小型肝細胞と呼ばれる肝前駆細胞を用いて毛細胆管を再生させることに成功した (Sudo *et al.*, *Journal Cellular Physiology*, 2004)。しかし、再生した毛細胆管は閉鎖系であるために小型肝細胞が分泌した胆汁は出口のない毛細胆管中に蓄積してしまう問題があった。生体内の肝臓では、毛細胆管を通る胆汁は胆管に流れ込むことで肝臓外に排出されている。すなわち、肝細胞が形成する毛細胆管は、胆管上皮細胞が形成する胆管へ連続的につながっている。そこで、次の研究として我々は胆汁の排泄経路となる胆管の再生に取り組み、胆管上皮細胞を独自の方法で培養することによって胆管を再生することに成功した (Hashimoto *et al.*, *American Journal Pathology*, 2008)。

従来研究では肝臓を構成している胆管と毛細胆管を個別に再生させる方法を確認した。さらに研究を進展させるためには、再生した毛細胆管と胆管を融合し、複合組織の再生を実現することが必要となる。肝細胞と胆管上皮細胞を混合した培養を行ない、胆管と毛細胆管を融合させることが実現されると肝臓再生における画期的な成果となる。しかし、通常の培養皿を用いた場合、細胞の酸素消費量が多いため細胞への酸素供給が不十分であることが考えられる。そこで、酸素透過性が高いシリコン膜を用いることによって胆管と毛細胆管の形態形成を最適化し、両者を融合した複合肝組織の再生を実現するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では酸素透過性の高いシリコン膜を用いて細胞周囲の酸素環境や弾性率を制御し、小型肝細胞および胆管上皮細胞を培養する。その時、これらの細胞が毛細胆管や胆管を再生する形態形成と細胞周囲の酸素環境、弾性率との関係を明らかにすることを目的とした。さらに、胆管・毛細胆管の形成プロセスにおける多細胞のダイナミクス（細胞接着・遊走・管腔形成）を実験的に明らかにすることで、胆管と毛細胆管が融合する最適な酸素環境・弾性率を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、「培養デバイスの作成」→「培養条件における工学的な因子（酸素透過性・培養担体の弾性率）の制御」→「再構築された組織の形態学的・機能的な評価」といった

一連の研究を通して毛細胆管と胆管を融合させる工学的な培養手法の開発に取り組んだ。

(1) 酸素透過性シリコン膜を組み込んだ自作培養デバイスの作成

シリコン樹脂を用いて酸素透過性膜を有する培養デバイスを作成した。シリコン樹脂はマイクロ流体デバイスに使われており、酸素透過性が高く、細胞培養への適合性もよい。がん細胞を用いた培養系ではシリコン膜を用いて酸素透過性を上げることによって三次元組織形成が促進されることが最近の論文で報告されている。そこで、本研究においてもシリコン膜を用いることで毛細胆管-胆管培養系における酸素供給量を増加させた。図1に示すように小型肝細胞を培養する場所 (SHs) と胆管上皮細胞を培養する場所 (BECs) が分かれている。

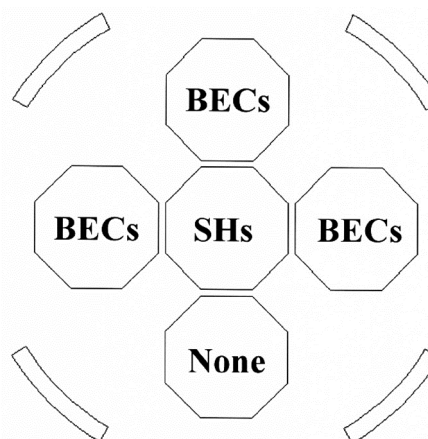


図1 シリコン樹脂製培養デバイス。BECsの部分には胆管上皮細胞を、SHsの部分には小型肝細胞を培養する。

(2) 自作培養デバイスにおける培養担体の弾性率制御

我々の開発した胆管再生の培養系ではコラーゲンゲルサンドイッチ法を利用しているが、コラーゲンゲル重合時におけるpHを変えることによってゲルの弾性率を調節し、ゲルの弾性率が毛細血管の再生において重要な役割を持つことを明らかにしている

(Yamamura *et al.*, *Tissue Engineering*, 2007)。そこで、胆管再生に用いるコラーゲンゲルを同様の方法で作成し、異なる弾性率を有するコラーゲンゲルを用いて胆管の再生を試みた。

(3) 毛細胆管-胆管複合培養系における形態形成プロセスの解明

酸素透過性シリコン膜を組み込んだデバイスで毛細胆管 - 胆管複合培養系を構築し、弾性率・酸素環境と複合肝組織の形態形成についての関係を検討した。特に、毛細胆管・胆管の運動を記録・解析し、形態形成のプロセスを明らかにした。

4. 研究成果

(1) 胆管上皮細胞および小型肝細胞の培養における細胞配置制御

シリコン樹脂製培養デバイスを用いてラットの肝臓から分離した小型肝細胞および胆管上皮細胞を培養した。細胞は図1のように指定された場所に播種することで、小型肝細胞と胆管上皮細胞が接着し増殖する位置を制御した。小型肝細胞と胆管上皮細胞はそれぞれコロニーを形成し、増殖することでコロニーの面積は徐々に大きくなった(図2)。

小型肝細胞と胆管上皮細胞はそれぞれ別の場所で培養されているが、培養経過に従ってコロニーが大きくなり、最終的には両者のコロニーを約 100 μm 程度に近接させることが可能である(図3)。このように近接させることによって小型肝細胞が形成する毛細胆管と胆管上皮細胞が形成する胆管を長期培養において融合できる可能性を示した。

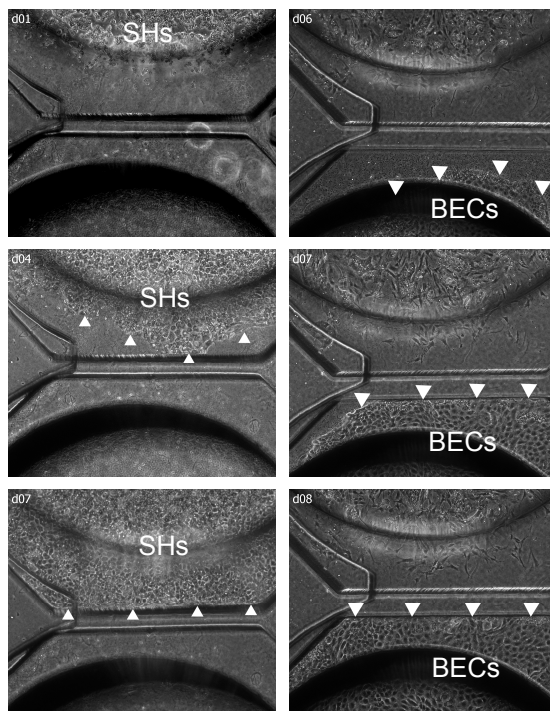


図 2 シリコン樹脂製培養デバイスにおける小型肝細胞と胆管上皮細胞の培養経過。左側：小型肝細胞の位相差顕微鏡写真（上から培養 1, 4, 7 日目）。矢頭はコロニーの輪郭を示す。右側：胆管上皮細胞の位相差顕微鏡写真（上から培養 6, 7, 8 日目）。

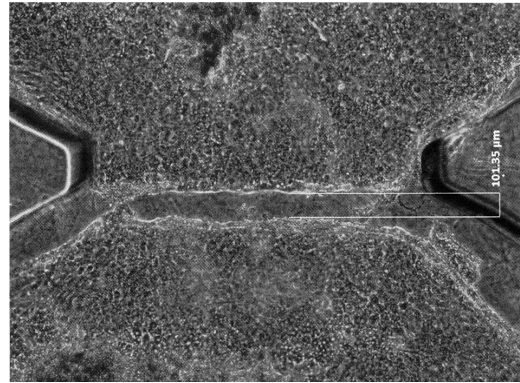


図 3 隣り合う区画で培養した小型肝細胞コロニーの近接部分。2 つの細胞コロニーには約 100 μm のギャップで近接している。

(2) シリコン樹脂製培養デバイスにおける胆管の再生

我々はこれまでに通常の培養皿を使用して胆管上皮細胞から胆管を再生させる手法を確立してきた。この手法を本研究におけるシリコン樹脂製培養デバイスに応用することで、デバイス内部においても同様の胆管

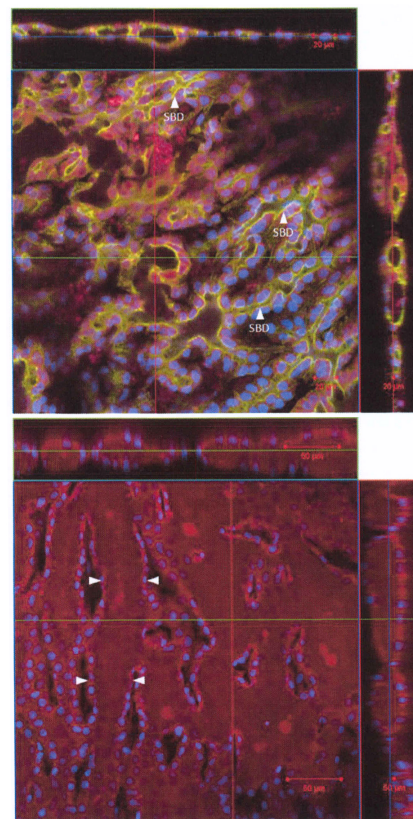


図 4 シリコン樹脂培養デバイスにおいて再生した胆管の蛍光染色画像。上：培養 31 日目に細胞を固定し、三重染色（緑：cytokeratin 19、赤：F-actin、青：核）を行い、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。下：培養 46 日目に固定し、二重染色（赤：F-actin、青：核）を行った。矢頭は胆管を示している。

再生を再現させることに成功した(図4)。培養31日目の蛍光染色画像では内径10 μm 程度の細い胆管が確認され、培養46日目には内径50 μm 程度の胆管に成長していた。

(3) シリコン樹脂製培養デバイスにおける小型肝細胞・胆管上皮細胞の共培養

本研究では小型肝細胞と胆管上皮細胞を近接させて培養し、両者が形成する毛細胆管と胆管が部分に融合することを示唆する現象が観察された。生体外の細胞培養系における三次元複合組織の再生は、非常に複雑なプロセスであるため現在のところ方法論が確立されていない。従来研究では、生物学・医学分野における研究が主体であり、要素還元論に基づく分子生物学的なアプローチが行われてきた。このような研究手法によって細胞内でのシグナル伝達などが詳細に解明されてきたが、細胞集団が組織を形成していく方法論の構築に対しては必ずしも有効であるとはいえない。細胞の統合性を研究するためには、細胞集団を対象として培養環境の場をコントロールする必要がある。特に、拡散や弾性率の制御といった力学的因子を制御するためには工学的な手法を利用した再構成論的アプローチが必須となる。また、細胞集団の挙動をモニタリングし、細胞の移動現象を定量的に評価する必要がある。これらの培養条件を複合的に制御する工学的なアプローチを行なうことによって初めて複合組織の再生が実現するものと考えられる。したがって、本研究のような工学に基づく複合組織再生手法は大変重要である。

毛細胆管の再生には国内外のグループが成功しているが、いずれの場合も胆管に接続していないことが大きな問題になっていた。したがって、排出系を有する毛細胆管ネットワークの再生が実現することで、肝臓再生研究におけるブレイクスルーにつながるだけでなく、三次元複合組織を対象とする新しい再生医療・ティッシュエンジニアリングの進展に大きく貢献できる。また、胆管と毛細胆管の接合部分はヘリング管と呼ばれ、肝細胞と胆管上皮細胞の両方の性質を有する幹細胞が存在すると考えられている。生体外でヘリング管が再生できると、肝臓における幹細胞研究の発展にも貢献することができる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計12件)

- ① 須藤 亮、生体外における肝臓再生への工学的アプローチ、分野横断型医工学研究プラットフォーム BASIC 特別講演会、2012年2月29日、宮城
- ② 須藤 亮、マイクロ流体デバイスを用いた三次元組織再生への工学的アプローチ、バイオフィジオロジー研究会、2012年2月25日、京都
- ③ Ryo Sudo, Microfluidic culture models for

investigating normal and cancer cell behaviors, バイオメカニクス懇話会, 2012年1月16日, 北海道

④ Yuyang Lee, Ryo Sudo, Tomoya Komatsu, Norihisa Miki, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Microfluidic hydrostatic deposition patterning for a confined hepatocyte-biliary epithelial cell co-culture system, 2011 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2011年11月7日, 愛知

⑤ Ryo Sudo, Kaoru Matsuo, Tomoya Komatsu, Mariko Ikeda, Toshihiro Mitaka, Kazuo Tanishita, Effects of the mechanical properties of substrates on the in vitro formation of bile ducts by biliary epithelial cells, International Symposium on Mechanobiology, 2011年11月5日, Shanghai, China

⑥ 須藤 亮、マイクロ流体デバイスを用いた三次元組織の再生、東京大学マイクロ・ナノ多機能デバイス研究ネットワーク 第3回シンポジウム、2011年7月4日、神奈川

⑦ Yuyang Lee, Ryo Sudo, Tomoya Komatsu, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Microfluidic hydrostatic deposition patterning for investigating hepatocyte-biliary epithelial cell interactions, 日本生体医工学会, 2011年4月29日, 東京

⑧ 谷下一夫、須藤 亮、胆管様ネットワーク再形成に関する組織工学、胆道閉鎖症研究会、2010年12月11日、東京

⑨ Ryo Sudo, A bioengineering approach to liver tissue engineering, Biofrontier Symposium 2010, 2010年11月11日、石川

⑩ Tomoya Komatsu, Ryo Sudo, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Kazuo Tanishita, Effect of extracellular matrix stiffness on ductular formation of biliary epithelial cells, 6th World Congress of Biomechanics, 2010年8月1日, Singapore

⑪ Kaoru Matsuo, Tomoya Komatsu, Toshihiro Mitaka, Mariko Ikeda, Ryo Sudo, Kazuo Tanishita, PLGA membrane sandwich culture model of biliary epithelial cells for reconstruction of bile duct, 第49回日本生体医工学会、2010年6月25日、大阪

⑫ 松尾薫、小松那也、三高俊広、池田満里子、須藤亮、谷下一夫、生体吸収性薄膜による胆管上皮細胞の管腔構造形成、第17回肝細胞研究会、2010年6月19日、秋田

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 亮 (SUDO RYO)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：20407141

(2) 研究分担者

谷下一夫 (TANISHITA KAZUO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：10101776

(3) 連携研究者

池田 満里子 (IKEDA MARIKO)

慶應義塾大学・理工学部・名誉教授

研究者番号：00051368