

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25249018

研究課題名(和文) マイクロナノバイオトランスポート機構を基軸にした肝臓組織再生

研究課題名(英文) liver tissue reconstruction based on micro-nano biotransport

研究代表者

谷下 一夫 (TANISHITA, Kazuo)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・客員上級研究員(研究院客員教授)

研究者番号：10101776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓組織再生を目的に、物質移動を伴う肝細胞組織の血管化と肝臓組織の形成の実現に取り組み、細胞の自己組織機能を誘導するマイクロナノ環境を見出す事が出来た。積層モデルと、MEMS技術を応用したマイクロ流路モデルにおいて、3次元組織形成に寄与する細胞の振る舞いを明らかにした。血管化に関しては、血管網は、増殖因子の濃度勾配の方向に伸展し、マイクロ流路では間質流によって血管網が効率的に誘導され、周皮細胞形成による血管網安定化や肝細胞による血管網形成の促進という興味深い結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To achieve the reconstructive liver tissue, we focused on the vascularization of 3 dimensional reconstructive hepatocytes tissue and found out the cellular self-organization process in the micro-nano environments. We employed the conventional layer model and microfluidics model to reveal the cellular behavior for the 3D reconstruction of vascular endothelial cell and hepatocytes. The vascularization is derived by the direction of concentration gradient of growth factors secreted with the activated hepatocytes or the mechanical stimulus of interstitial flow. It is great interest to recognize that the vascularization is stabilized by the pericyte and network of hepatocytes

研究分野：生体工学

キーワード：生物・生体工学 熱工学 再生医学 細胞・組織 マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

2012年10月に山中博士のiPS細胞のノーベル賞受賞が決定し、再生医療に対して世界的な期待が高まっている。再生医療を実現させるためには、体外で組織を再形成するという組織工学(Tissue Engineering)の技術が必要となる。特に移植のためのドナー不足が指摘されている肝疾患の治療には、再生肝臓の組織工学が必要であるが、肝細胞は体外では増殖しないという定説があり、再生臓器としては最も難しい臓器と言われていた。所が、札幌医科大学の三高教授が世界で初めて増殖性のある未分化な幹細胞を発見して、小型幹細胞と命名され、体外で著しく増殖する事に成功した。

そこで、小型幹細胞を利用したバイオ人工肝臓の可能性が明らかになり、小型幹細胞を用いた組織工学による3次元組織再構築が、研究代表者らの研究によって成功し、基盤研究A(平成20年~23年)によって、バイオ人工肝臓の可能性を明らかにした。肝臓組織は、胆汁を輸送する毛細胆管を挟むように肝細胞が列を作り、それを毛細血管が囲むような構造を形成している。胆汁は毛細胆管から胆管に輸送され、十二指腸に分泌される。研究代表者らは、これまでの研究により、肝細胞による3次元組織形成、毛細胆管の形成、胆管の形成、毛細血管の形成に成功しており、言わば肝臓組織のパーツが揃って来た段階にある。そこで、最終的に肝移植に替わる治療を実現するためには、移植するための、体外で再形成されたミニ肝臓組織が必要である。ミニ肝臓組織には、肝細胞索、毛細胆管、胆管、毛細血管が必要で、これらが肝臓機能を機能的形態的に再現された3次元組織を形成する必要がある。困難な課題は、肝細胞組織内に、毛細血管網と胆管網の形成である。血管網の形成は、再生組織の血管化(Vascularization)と呼ばれ、現在、実質臓器再生の開発において大きな障壁になっており、世界でも成功例が少ない。

そこで、研究代表者らは、組織形成に必須な三要素である幹細胞、足場、増殖因子を再検討した。その結果、足場に接着した細胞への増殖因子の輸送が、組織形成に主要な役割を果たしている事に注目し、増殖因子の輸送、即ちバイオトランスポートを巧みに制御する事が、血管化と胆管網形成の実現に繋がると考えた。

2. 研究の目的

研究期間内に、3次元再構築された肝細胞組織に、類洞様(肝臓の毛細血管)の血管網の形成(組織の血管化)の実現を目指す。最近の研究では、増殖因子の濃度勾配の方向に血管網が伸長している事実が明らかになっている。そこで血管形成を効率的に行うために、増殖因子のバイオトランスポートによる血管誘導に着眼した。特に細胞自体から分泌

される増殖因子が、組織構築を促す事が分かっており、パラクリン輸送(近傍への細胞間拡散)と呼ばれ、細胞間において重要な相互作用の役割を担っている。もう一つの重要な要素は、足場であり、細胞が接着して構造形成を行う基盤となる。研究代表者らの研究によって、足場の役割をするコラーゲンの硬さが、血管形成に大きく依存する事が明らかになっている。そこで、コラーゲンの足場を柔らかい部分と硬い部分をもつ不均質構造にして、血管の細胞が強く反応する硬い足場を血管網形成が誘導される様にすれば、所定の血管網のデザインが可能となる。このように、現在実現が困難とされている組織の血管化を実現する手段として、足場の不均質構造によるマイクロナノ環境において、細胞が組織形成を増殖因子のバイオトランスポートによって促すプロセスを明らかにして、肝臓組織再生の組織工学を実現させる。

具体的には、二つのモデルで組織形成のプロセスを明らかにする。即ち、積層モデルと、マイクロ流路モデルである。両者とも細胞近傍での増殖因子の濃度分布と組織形成との関係を可視化して解析する事が可能である。特にマイクロ流路モデルは、細胞、足場と増殖因子の条件を明らかにした実験が可能であるため、増殖因子の輸送の効果を明らかにする事が出来る。細胞表面には、増殖因子のレセプターが発現するため、単純な拡散問題にならないため、実験に加えて、計算機シミュレーションによるアプローチも検討する。

3. 研究の方法

本研究では、二つの組織形成モデルを採用する。積層型培養モデルとマイクロ流路型(MEMS)培養モデルである。積層型は、単層の細胞シートを積層して、3次元組織にするアプローチで、マイクロ流路型は、マイクロ流路内で、異なる細胞による組織形成を実現するもので、肝臓組織のモジュール的な組織となる。これらのモデルにおいて、小型肝細胞、血管細胞、星細胞、胆管上皮細胞などの間で増殖因子のパラクリン輸送の効果的な3次元構成を見出す。そのためには、細胞の共培養(異なる細胞同士の培養)を基に、増殖因子の分布や輸送パターンを見出す。実験的アプローチに加えて、計算機シミュレーションの活用も検討した。

4. 研究成果

(1) 再生肝臓組織の再構築組織モデル

二つの再生肝臓組織のモデルを構築する。即ち積層型培養モデルとマイクロ流路型(MEMS)培養モデルである。積層型は、単層の細胞シートを積層して、3次元組織にするアプローチで、マイクロ流路型は、マイクロ流路内で、異なる細胞による組織形成を実現するもので、肝臓組織のモジュール的な組織となる。

MEMS 技術を活用して、マイクロ流路を作成し、細胞、増殖因子及び足場の三要素をマイクロ環境で統合する方法が有効である。特に間質流による影響が顕著であることが明らかになり、新しい血管網形成の重要な手法になる事を示した。

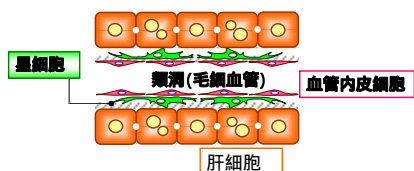


図 1 . 積層モデル

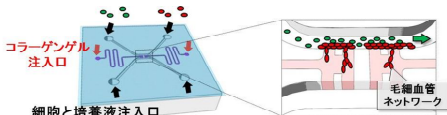


図 2 . マイクロ流路モデル

(2) マイクロ流路モデルにおける間質流の重要性

間質流とは、図 3(Rutkowski 2007)に示されるように血管内皮細胞間を透過し、血管外の間質環境にしみ出す流れを意味する。間質流による刺激は、図 6 に示されるように、細胞に 4 種類の作用が想定される。即ち、(a)細胞表面へのせん断応力、(b)細胞表面への伸展刺激、(c)細胞骨格 ECM 結合部位への刺激、(d)細胞周囲のタンパク質の再分布である。しかしながら、これらの要因は検証されておらず、予想の範囲から脱していない。

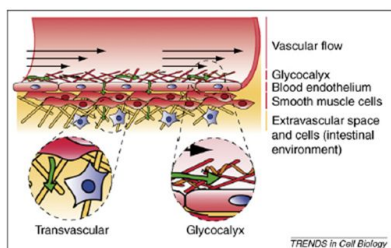


図 3 . 血管内細胞間を透過して血管外の間質環境に染み出す流れが間質流である。

マイクロ流路における実験では、外的に負荷される力としての間質流の影響が重要である。研究代表者らは、コンフルエント状態の内皮細胞の表面にせん断応力を負荷させる事によって、著しい血管網形成効果が得られる事を見出している(Ueda et al. 2004)。せん断応力負荷による効果は、増殖因子の濃度に依存する事も明らかにされており、細胞表面(a)に負荷されるせん断応力と伸展刺激は、同様な力学刺激受容機構の存在が考えられる。さらに興味深い点は、細胞骨格と ECM 結合部位への刺激である。研究代表者らは、ECM であるコラーゲンゲルの硬さが血管形成に著しい効果を与える事を見出している

(Yamamura et al. 2008)。柔らかいコラーゲンゲルでは、密な分布の血管網形成となったが、深く浸透しなかった。硬いゲルでは、血管網の密度は低いが、深く浸透した。特に注目すべきは、接着斑タンパク質のピンキュリンの発現に顕著な違いが見られた。柔らかいゲル内の管腔では、ピンキュリンの発現が低い、硬いゲルでは管腔では、偏縁部に多く発現している。同時にアクチンの発現は硬いゲルでは偏縁部に明確に発現している。これらの結果から、牽引力が硬いゲルに相応して生じており、牽引力を支えるための強固な接着斑が形成されたと思われる。これらの結果は、間質流による力学的刺激の受容機構を検討する上で、極めて重要な側面を示していると思われる。そこで、細胞表面に負荷される力と ECM への刺激という側面から、間質流による力学的刺激の受容機構が、血管網形成に重要な役割を演じている。

(3) 組織再構築を実現するための増殖因子の役割

最大の問題は、増殖因子の濃度勾配を組織内でリアルタイムに計測する手段が開発されていない。そこで、組織のサンプル標本を直接 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による方法によって、サンプル組織全体の平均値として計測して、その影響に関して検討を行った。増殖因子の濃度場の把握が重要で、今後さらに検討が必要である。

(4) 微小液滴マイクロ流路による細胞のスクリーニング

分担者の関口らは、微小液滴マイクロ流路 (Droplet-based microfluidics) 内に細胞を閉じ込め、酵素などの影響を調べる手法を開発した。細胞が閉じ込められている液滴を多数生成する仕組みを開発して、細胞のスクリーニングを効率的に達成する事を示した。細胞による 3 次元組織形成には、個々の細胞の特性が重要であり、高効率のスクリーニング手法が有用であることが明らかになった。

(5) 血管内皮前駆細胞による血管網形成

分化能力(まだ色々な細胞に変わってゆく能力をもつ未成熟な細胞。iPS 細胞は、最も未成熟な細胞)を持つ血管内皮前駆細胞から、増殖因子が分泌して、血管網を誘導する事が研究代表者らによって明らかにされている。図 7 に示されるように、下部の EPC から VEGF が分泌されて、上下で濃度勾配が形成されており、上部の内皮細胞層から、血管網が誘導されている。前駆細胞の血管網形成能に重点を置く。分化機能を有する血管内皮前駆細胞を用いて血管網形成を試みた。血管内皮前駆細胞から、多種類の増殖因子が分泌して、血管網を誘導する事が知られている。そこで、積層型培養モデルにおいて、前駆細胞の影響により、3 次元血管網が顕著に増殖して、前駆細胞

の活用の重要性が明らかになった。

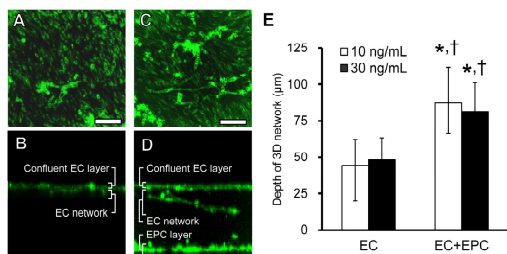


図4. 内皮細胞層から形成された3次元血管網(Abe et al. 2013)

(6) 葉状仮足による血管網形成の促進と間質流による3次元血管網形成

血管網が伸展する先端には、葉状仮足が増殖因子の濃度勾配の方向に伸長する。即ち、濃度勾配により血管網の伸展方向の制御が可能になる。そこで、葉状仮足と3次元血管網形成との関係を明らかにした。

マイクロ流路内で、上皮細胞との共培養により、血管内皮細胞による3次元血管網の構築を行った。マイクロ流路内で重要な要因は、間質流の影響によって3次元血管網の構築が促進される点である。間質流の影響として、2つの要因が考えられる。一つは、間質流による微小対流による流体力学的な刺激による影響である。二つ目は、間質流によるバイオトランスポート機構によるプロセスである。両者は相互に関連している要因であり、間質流による対流拡散機構の詳細を明らかにする必要がある。マイクロ流路デバイスの長所は、間質流による対流拡散機構を可視化する事が可能であるという点で、本研究のアプローチの主流となる。マイクロ流路内で、肝細胞の3次元培養と関わって、血管網の3次元構築が実現するので、間質流の影響を明らかにする必要がある。間質流の程度を増やす事によって、内皮細胞から血管網の芽(スプラウト)が増加する。毛細血管網は、間質流の影響を受けて、血管網が促進される。間質流の影響の基で、血管網が増殖された後に、肝細胞を加え、毛細血管網が間質流の影響により、3次元血管網が、肝細胞の3次元培養と容易に混合する事がわかった。

そこで、得られた研究実績の概要は以下の通りである。3次元血管網の形成には、細胞配置と増殖因子の濃度勾配が、血管径の成長に影響を及ぼす事が明らかになった。正に、バイオトランスポートが血管網形成に主たる影響を及ぼす結果となった。このような血管網形成におけるバイオトランスポートは、マイクロ流路を活用する事により、極めて微細な形態を把握事が出来るので、有効な手段であることが、改めて確認出来た。さらに血管網形成で重要な側面が、血管吻合である。マイクロ流路デバイスによって、毛細血管吻合の条件を実験的に検討を行った。肝細胞組織内の血管網形成が最終的な目的であるが、微小培養環境において、肝細胞供給因子と血

管網との相互作用を定量評価する事が出来た。肝細胞組織内で血管網形成が進行する場合には、肝細胞組織内に深く浸透させる必要がある。即ち、肝細胞組織内で形成された血管伸長がどの程度生じるかを定量的に評価した。

(7) ペリサイトによる血管網安定化

血管網形成で重要な点は、血管網を安定化させているペリサイトの存在である。生体内の毛細血管では、周囲にペリサイトという壁細胞が被覆することで、血管構造と機能が安定化する。そこで、マイクロ流路デバイスで、血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養を行ったところ、ペリサイトを伴う毛細血管網が再構築された。血管基底側から VEGF を供給したところ、ゲル環境内に VEGF による濃度勾配が形成され、血管新生が促進された。マイクロ流路デバイスでは、ゲル環境において、VEGF の濃度勾配を形成させる事ができる。血管新生モデルにおいて、増殖因子の濃度勾配の形成が、血管網形成のために重要な役割を果たしている事が分かった。正にバイオトランスポートが血管網形成において重要な要因である。

3次元の血管網形成に関しては、血管網の安定化を達成させるために、間葉系幹細胞と血管内皮細胞との共培養系では、間葉系幹細胞が壁細胞ペリサイトに分化することで、血管の安定化に寄与する事が明らかになり、さらにペリサイトは血管を被覆する事で、血管の成熟化を促し、結果的に血管系の縮小という血管のリモデリングを引き起こしており、血管網形成の安定化の要因として、極めて興味深い結果と思われる。

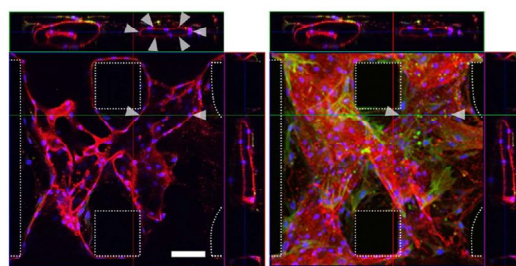


図5. HUVEC と HMSC とを 1:1 で共培養させた結果、大きく安定な血管が形成された。右図で、緑がペリサイト、赤が HUVEC、青が核である。(Yamamoto et al. 2013)

(8) 肝細胞との共生

肝細胞と血管内皮細胞の共培養系を実験的に実現するには、微孔性膜を介して、肝細胞と血管内皮細胞の単層積層構造を構築する。マイクロ流路を用いる場合には、コラーゲンゲルを挟むように、肝細胞側と血管内皮細胞を培養して、血管内皮細胞側から、毛細血管網が進入して、3次元組織構築された肝細胞に進入する。本研究では、これらの二つの組織構築モデルを中心にして、肝細胞組織の血

管化を目指す。それで、このような共培養系において、両者が組織構築を進行させるには、増殖因子が必須である。一方、このような増殖因子は、肝臓を構成する細胞から分泌され、異なる細胞のレセプターに結合して、組織形成を促進する事が分かっている。例えば、肝細胞から VEGF や EGF, TGF- β 、星細胞からは VEGF, PDGF、HGF、bFGF、クッパー細胞からは、VEGF が分泌され、これらのレセプターが類洞（毛細血管）の細胞に存在するレセプターに結合して、肝細胞組織に血管網が誘導される。これらの増殖因子は、組織形成に、協調的効果やシナジー効果をもたらす事が生物学分野の研究で明らかになっているので、肝臓組織再生には、増殖因子の分泌による輸送過程に伴う濃度場形成とレセプター発現により、時空間的濃度場の変動によって、組織形成のリモデリングが生じる事が分かった。

積層型培養モデルを用いて、星細胞の介在が、肝細胞と血管内皮細胞による 3 次元組織形成に影響を及ぼす事を明らかにした。特に興味深い結果は、星細胞が足場である微孔性膜のマイクロナノ孔構造を検知して、1 ミクロン程度の孔径において有効な介在機能を発揮している。

肝臓組織内に血管網を導入する血管化に関しては、肝細胞と血管内皮細胞を共培養すると、血管が肝細胞に向かって伸長して行く。そこで、肝細胞と同程度の大きさを持つマイクロゲルビーズを肝細胞の混成組織を血管化するための要因を明らかにした。さらに、肝細胞が分泌する因子が血管形成を促進するという仮説の基で、肝細胞調整培養液で修飾させたゲル内で 3 次元血管網が形成された。肝臓組織形成のためのバイオトランスポートとして有用な結果と思われる。さらに、脱細胞化肝臓内で、血管内皮細胞と間葉系幹細胞を共培養させた所、内皮細胞の遊走が見られ、血管新生を誘導する要因として有用な知見と思われた。

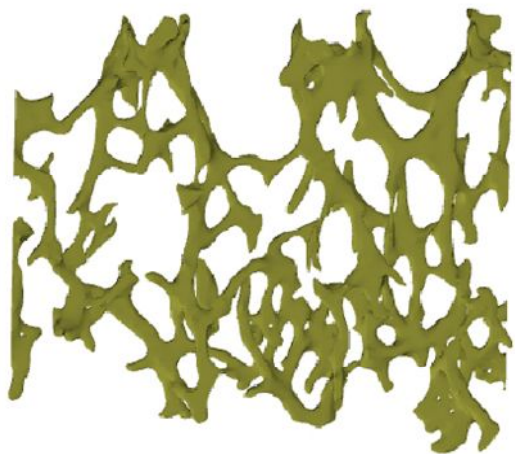


図 6, 共焦点画像から再構築されたマイクロ流路内 3 次元血管網 (STL データ)

(9) 計算機シミュレーション

マイクロ流路内で形成された肝臓組織用ネットワークや血管網ネットワークは、共焦点レーザ顕微鏡により得られたスライス画像を、マテリアライズ社が開発したソフトによって、3 次元の STL データに変換する事が出来、ゲル内の圧力分布や拡散に関してダルシーフローの解析方法を明らかにした。

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 4 件)(総数 20 件)

Ryo Sudo (4 番目、6 名) Fabrication of type I collagen microcarrier using a microfluidic 3D T-junction device and its application for the quantitative analysis of cell-ECM interactions. *Biofabrication* 査読有り、8 巻、2016 年、035014 (10 pages)

T. Sekiguchi (7 番目、9 名) Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes", *Biosensors & Bioelectronics* 査読有り、67 巻、2015、379-385

Ryo Sudo, Multiscale tissue engineering for liver reconstruction, *Organogenesis* 査読有り、10 巻、2014 年、216-224

Ryo Sudo(6 番目、8 名), Kazuo Tanishita (8 番目、8 名) Endothelial progenitor cells promote directional three-dimensional endothelial network formation by secreting vascular endothelial growth factor, *PLoS One* 査読有り、8 巻、2013 年、e82085

[学会発表](計 5 件)(総数 60 件)

Ryo Sudo, Reconstruction of vascularized hepatocyte tissues by hepatocyte-conditioned medium in a microfluidic device, 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2016年8月16-20日(8/19 発表) Disney's Contemporary Resort, Orlando, FL, USA

T. Sekiguchi, Single Cell Encapsulated Microdroplet Formation

Using TIP-Streaming and Deterministic Lateral Displacement”, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2015), 2015.10.25-29, Gyeongju, Korea (2015) pp.379-381 (発表日:10/26 ポスター)

Ryo Sudo, Construction of microvascular networks under controlled culture microenvironments, 15th International Congress of Biorheology and 8th International Conference on Clinical Hemorheology (ISB-ISCH 2015), 2015年5月24~28日 (5/28発表) Korea University, Seoul, Korea

Ryo Sudo, Kazuo Tanishita, The effect of interstitial flow on the formation of microvascular networks in a microfluidic device The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), 2014年4月14~17日, Miyakomesse (Kyoto, Japan)

谷下一夫, 須藤亮, 間質流制御による3次元血管ネットワークの形成, 第36回日本バイオレオロジー学会年会, 2013年6月6~8日, 九州大学 西新プラザ (福岡県福岡市)

〔図書〕(計2件)

Ryo Sudo, Seok Chung, Yoojin Shin, Kazuo Tanishita Springer, Vascular Engineering (Editors: Kazuo Tanishita, Kimiko Yamamoto) Integrated vascular engineering: vascularization of reconstructed tissue, 2016-04, 297-332

谷下一夫, 須藤亮, 森北出版, 細胞のマルチスケールメカノバイオロジー, 2017年, 119-149

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷下一夫 (TANISHITA, Kazuo)

早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構・客員

上級研究員

研究者番号: 10101776

(2) 研究分担者

須藤亮 (SUDO, Ryo)

慶應義塾大学工学部・準教授

研究者番号: 20407141

関口哲志 (SEKIGUCHI, Tetsushi)

早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構・上級研究員

研究者番号: 70424819

(3) 連携研究者 無し

(4) 研究協力者 無し