



Title	肝障害時の肝機能代替に関する組織工学的研究
Author(s)	東山, 真二
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/44132
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	ひがし やま しん じ 東 山 真 二
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 17763 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	肝障害時の肝機能代替に関する組織工学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 八木 清仁 (副査) 教授 馬場 明道 教授 真弓 忠範 教授 宮本 和久

論文内容の要旨

近年、重篤な肝不全の治療法として肝臓移植が行われているが、ドナー肝の確保が困難でレシピエントの需要を満たしているとは言いがたい。そこで、特にドナー肝の入手が困難な状況における、一時的な肝機能代替を行う方法として、バイオ人工肝臓の開発および生体内異所性肝組織の構築が試みられてきた。優れたバイオ人工肝臓の構築には初代肝細胞の機能を維持し、より高密度に培養することが重要である。本研究ではバイオ人工肝臓に用いる初代肝細胞の機能維持、および新規 scaffold の創製について検討した。また、生体内異所性肝組織の構築は、単離した肝細胞を生体内において、再度、組織構築する試みで、肝臓移植に比べると患者の負担が少なく、障害を受けた肝臓が再生するまでの一時的な肝機能代替法として優れているが、バイオ人工肝臓同様に、いかに多くの細胞を生着させ機能させるかが重要となる。そこで、本研究では生体適合性に優れた3次元担体に肝実質細胞を播種し、ラット腹腔内に移植することで生体内異所性肝組織の構築を試みた。

肝星細胞は細胞外マトリックス産生の中心的役割を担い、過剰な細胞外マトリックスの沈着が肝線維化あるいは肝硬変を特徴づける病態のひとつとなっている。また、正常肝において静止期にある肝星細胞が、肝障害に伴い種々のサイトカインにより活性化され筋線維芽細胞(MFB)に形質転換することが報告されている。そして、活性化肝星細胞は、増殖能、細胞外マトリックス産生能が亢進し、自らも種々のサイトカインを産生する。肝星細胞は単離直後から *in vitro* においてもプラスチックディッシュ上で活性化を始める。したがって、肝非実質細胞の中でも特に肝星細胞に注目し、肝実質細胞との細胞間接触を伴わない共培養により、肝星細胞が肝機能維持に有効であることを明らかにした。この時、肝星細胞の conditioned medium においても効果が認められたことから、肝星細胞が単独で分泌する液性因子が肝機能維持に有効であることを示した。また、継代培養可能な MFB を I 型コラーゲンゲル上で培養したときの conditioned medium によっても肝機能を維持することを確認した。したがって、MFB を肝星細胞の代替細胞として用いることの可能性を示した。

細胞間接触を伴わない共培養において、肝機能は維持されるが生着細胞数は経時的に減少した。したがって、次に、高機能なバイオ人工肝臓構築のため細胞機能を損なうことなく生着を維持する培養基材(scaffold)の開発を行った。今回開発した新表面修飾法により固定化した、フルクトース修飾 dendrimer 上で肝実質細胞の培養を続けると、肝実質細胞がスフェロイドを形成することを見出した。従来の dendrimer 固定化法に比べ、新しい方法では、基材表面へ固定された dendrimer 量が多い。Dendrimer は、末端アミノ基が陽性荷電を帯びており、リガンド修飾 dendrimer の末端アミノ基全てが、修飾されているわけではなく、リガンド修飾 dendrimer 上でも陽性荷電を帯びて

いると考えられる。したがって、従来に比べ、基材表面におけるリガンド修飾デンドリマーの陽性荷電が増加したことにより、肝実質細胞がスフェロイドを形成したと考えられる。ガラクトースは肝実質細胞表面にあるアシアロ糖タンパクレセプターのリガンドであり、デンドリマーのリガンドに加えること (F/G デンドリマー) で、スフェロイドは生着を維持した。また、通常スフェロイド内部の細胞はネクローシスを起こしやすいのに対し、F/G デンドリマー上の肝実質細胞は、アポトーシス・ネクローシスが抑制されており、基材からのストレスも少なく、肝特異的機能を維持していた。フルクトースは酸化的な細胞障害や細胞毒性に対する保護効果が報告されており、その結果アポトーシス・ネクローシスを抑制したと考えられる。ここでガラクトースは細胞接着維持に働くと同時に、ネクローシスを起こしているもののアポトーシスは抑制しており、結果としてフルクトースとガラクトース両方を含む F/G デンドリマー上のスフェロイドは、他の表面上のスフェロイドに比べ、生着細胞数が維持されたと考えられる。リガンド修飾デンドリマーを基材表面上に固定し、細胞培養に用いるアイデアは我々独自のものである。今回、フルクトースのみならずガラクトースを同時にリガンドとして修飾することにより、リガンドの効果を相加的に現すことが出来た。

F/G デンドリマーを用いた肝実質細胞と肝星細胞との共培養では、コントロールあるいは通常の共培養と比べ生着細胞数が維持された。またこの時、細胞あたりのウレア合成能について、F/G デンドリマーを用いた共培養では、通常の共培養と同等の高い値を示した。したがって、F/G デンドリマーを肝細胞の培養基材として用いることにより、肝星細胞との共培養を行うことで、更に高機能を発現するバイオ人工肝臓の開発が期待される。

最後に、これまでに行ってきた肝実質細胞 scaffold の研究から、肝実質細胞を播種した 3 次元担体をラット腹腔内に移植し、生体内異所性肝組織の構築について検討した。その結果、肝実質細胞の培養における 3 次元担体として連通管構造をもった多孔質ヒドロキシアパタイトディスク (IP200) の有効性を示した。これまでに肝実質細胞はヒドロキシアパタイトへ直接には生着しないとの報告があった。しかし、今回用いた IP200 は均一な小孔が互いに規則正しくつながった連通管構造をしており、また、原料として珊瑚を用いているため、詳細は明らかではないが、これらの要因で肝実質細胞が直接ヒドロキシアパタイトに生着したものと考えられる。

無アルブミンラットへの IP200 による肝実質細胞の移植においては、血清アルブミン濃度の上昇が見られ、移植した肝実質細胞が生着し、機能していることが確認された。この時、IP200 内では血管新生が起こっており、組織化した肝実質細胞には血流から栄養分が供給され、また、アルブミンを分泌していると考えられた。また、IP200 に F/G デンドリマーを修飾でき、*in vitro* において、通常の IP200 よりも肝実質細胞の生着数が多かったことから、IP200 を表面修飾することによって、より多くの肝実質細胞が移植できる可能性を示した。

本研究において、デンドリマーは 2 次元培養に限らず、3 次元担体にも適用できることを示した。また、デンドリマーは、リガンドの選択により細胞に応じた基材表面の創出が可能であり、組織工学全般の発展に大きく貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究はバイオ人工臓器の開発および肝細胞移植法の確立を目的に行われた。まずバイオ人工肝臓に用いる肝実質細胞の機能を長期間維持する培養法の検討を行い、肝臓に存在する非実質細胞のひとつである肝星細胞との共培養を試みた。細胞間接触を伴う混合培養では肝細胞の増殖を促し、細胞間接触を伴わない共培養では肝特異機能である尿素合成能、アルブミン分泌能が有意に維持されることを見いだした。その効果は申請者が樹立した細胞株においても保持され、細胞源供給の観点から実用的にも評価される結果を得た。さらに樹木状多分岐高分子であるポリアミドアミンデンドリマーを培養基材に固定化し、末端アミノ基をフルクトース、ガラクトースによって修飾する事により肝実質細胞の生存性、機能維持に適した機能性培養基材の創製にも成功している。検討は 2 次元的な培養法に止まらず、肝細胞移植を目的とし、多孔性ヒドロキシアパタイト (HA) を用いて 3 次元的に肝細胞を培養することを試みている。遠心分離を利用し HA 内部の気孔まで肝細胞を充填する高密度培養法を考案し、従来法の約 4 倍の細胞数を HA ディスクに播種する事を可能にした。無アルブミンラットを肝障害モデル動物として使用し移植実験を行った。腹腔に移植した肝細胞充填 HA ディスク内には血管新生が確認され、少なくとも 3 週間のアルブミン分泌が検出された。本研究はバイオ人工肝臓ならびに肝細胞移植の臨床応用に向け、非常に重要な結果を含んでおり、学位論文として相応しい成果であると判断する。