



Title	Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique
Author(s)	佐々木, 一樹
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67123
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 佐々木 一樹		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	佐々木 一樹
	副 査 大阪大学教授	石井 美也
副 査 大阪大学教授	竹原 伸	
論文審査の結果の要旨		
<p>本研究の内容は、交互積層による細胞コート法 (Layer by Layer: LbL法) を利用し、ヒト凍結肝細胞を用いて機能的血管化三次元肝組織の構築を試みたものである。LbL法では、細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチン、ゼラチンを用いて個々の細胞をコーティングし、細胞間接着を促すことで三次元組織構築を可能としている。</p> <p>In vitroでは、密な血管網を伴った三次元肝組織を構築し、肝細胞単独に比して、機能面でアルブミン (Alb) 産生能、Cytochrome P450 (CYP) 活性が向上することを示した。</p> <p>In vivoでは、LbL法により構築した血管化三次元肝組織をNOD/SCIDマウスに移植し、宿主血管と移植片血管との連続性が構築されることを示したほか、非血管化三次元肝組織を移植した場合に比して、移植後早期より高いAlb 産生能を有することを明らかにした。</p> <p>本知見は、LbL法により構築された三次元肝組織中の血管が生体内で血液を灌流させ、肝細胞のviabilityおよび機能向上に寄与することを示唆するもので、学術上有益であり、再生医療への応用が期待されると考える。</p> <p>したがって、著者は、博士（医学）の学位授与に値する。</p>		

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	佐々木 一樹
論文題名 Title	Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique (交互積層による細胞コート法を用いた機能的血管化三次元肝組織の構築)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>2010年10月の臓器移植法の改正以降、本邦における脳死下臓器提供数は増加したが、ここ数年は年間50例程度と横ばいであり、ドナーの絶対的な不足は続いている。本邦の肝臓移植においては、その提供を生体ドナーに依存しており、今後、これに代わる再生医療や細胞移植の発展が期待されている。</p>	
<p>肝臓は、約70%を構成する肝細胞の他に、内部に豊富な血管を有する類洞構造を持ち、これらは肝細胞の生存、機能維持に寄与している。ヒト肝組織と同様の機能的三次元肝組織を人工的に構築するためには、1)基盤となる肝細胞の選択(ヒト凍結初代肝細胞(cryopreserved human primary hepatocytes: CPH), iPS細胞由来肝細胞、切除標本からの灌流法による肝細胞採取など)、2)肝組織の構築手法(細胞シート、organ bud、脱細胞化など)、3)肝細胞の生存、機能維持のための血管構造の導入などが課題としてあげられる。</p>	
<p>我々は、細胞レベルから三次元組織の構築を可能とする手法として、大阪大学大学院生命機能研究科 明石 満教授により開発された交互積層による細胞コート法(layer-by-layer法: LbL法)に着目した。LbL法は、細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチン溶液とコラーゲンの変性体であるゼラチン溶液を用いて細胞をコートイングし、個々の細胞の表面にナノレベルの薄膜を形成させる手法である。LbL法により形成された薄膜が「分子のり」の役割を果たし、細胞同士の接着を促すことで、三次元組織の構築が可能となる。同研究室では、これまでにLbL法を用いて、皮膚、心筋、血管壁モデル等の三次元組織構築について報告してきた。</p>	
<p>そこで、本研究では、LbL法を用いて、CPHからなる機能的血管化三次元肝組織を構築し、<i>in vitro</i>、および、<i>in vivo</i>での機能評価、形態学的評価を行うことを目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>血管構造を有する三次元肝組織を構築するにあたり、構成細胞の検討を<i>in vitro</i>にて行った。その結果、LbL法を行ったCPH、ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC)およびヒト皮膚線維芽細胞(Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF)を各々4:1:4の比率で混合後、3日間培養することで、組織内に豊富な血管構造を持つ三次元肝組織の構築が可能であった。構築した血管化三次元肝組織について、培養液中のヒトAlbumin(hAlb)濃度をEnzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)法で測定したほか、Cytochrome P450(CYP)活性を測定し、タンパク合成能と薬物代謝能についてCPH単層群とで比較検討した。その結果、LbL法により構築した三次元肝組織では、CPH単層群に比して、有意に高いhAlb産生を認めるとともに($P<0.01$)、CYP活性についても有意に高い傾向を認めた($P<0.01$)。</p>	
<p>次に、LbL法により構築したCPHからなる三次元肝組織を重度複合免疫不全マウス(NOD/SCIDマウス)に移植し、生体内におけるhAlb産生能と形態学的評価を行った。血管化三次元肝組織、非血管化三次元肝組織、および肝細胞懸濁液の3群をそれぞれNOD/SCIDマウスの皮下に移植し、マウス血清中hAlb濃度を移植前、移植後3日目、7日目、14日目、21日目と経時的にELISA法で測定するとともに、移植後21日目に摘出したグラフト組織について形態学的に評価した。血管化三次元肝組織を移植した群では、移植後3日目より有意に高いhAlb産生を認め、その傾向は移植後21日目まで維持された($P<0.01$)。また、形態学的評価では、非血管化三次元肝組織内には多数の風船様変性した肝細胞を認めたのに対して、血管化三次元肝組織内では、肝細胞の変性はより少なかった。さらに、構築された血管と宿主の血管の連続性が確認された。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>交互積層による細胞コート法を用いて、ヒト凍結初代肝細胞からなる機能的血管化三次元肝組織を構築し、生体内における安定した組織生着と優れたタンパク合成能を確認した。本手法は、今後の再生医療における組織構築法の一つとして有用な技術となり得ると考えられた。</p>	