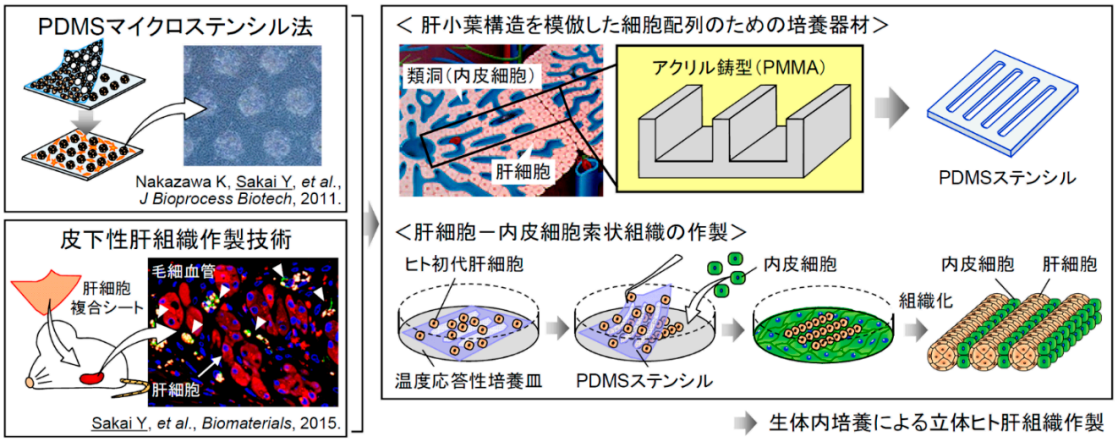
132　二次元細胞配列／三次元培養による立体ヒト肝組織作製	堺　裕輔

【目的】皮下は低侵襲性と高い安全性を両立した移植部位であるが、肝細胞の生着や立体組織化は困難を極めている。これらの課題を打開するため、肝小葉構造に基づいた細胞の立体配置を制御することができれば効率的な酸素供給等が可能となり、立体組織化が達成できると着想した。本研究では、マイクロステンシル法と皮下性肝組織作製技術を融合した二次元細胞配列／三次元培養技術を確立し、立体ヒト肝組織を作製することを目的とした。

【方法】肝小葉のサイズを踏まえて設計した鋳型（マイクロ流路）でポリジメチルシロキサン（PDMS）を重合し、多数の貫通孔を持つ PDMS ステンシルを作製した。 I 型コラーゲンをコーティングした温度応答性培養皿に PDMS ステンシルを貼り付け、ヒト初代肝細胞を播種した。培養 3 日目に PDMS ステンシルを除去した後、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を播種した。さらに、培養 6 日目にヒト脂肪由来幹細胞（hADSC）を播種し、培養 8 日目に温度を 20℃に低下させて細胞組織体を回収した。

【結果】マイクロ流路を用いることにより、ライン状の貫通孔を多数有する PDMS ステンシルを作製できた。ヒト初代肝細胞は密に凝集し、パターン化し得た。HUVEC と共培養することによって、ヒト初代肝細胞ー内皮細胞索状パターニングを作製することができた。hADSC は、HUVEC の管腔様構造の形成を支持した。ヒト肝細胞ー内皮細胞索状組織を回収することができ、移植可能な組織体であることが示唆された。

二次元細胞配列／三次元培養による立体ヒト肝組織作製の概念図



132. 二次元細胞配列／三次元培養による立体ヒト肝組織作製

堺　裕輔

長崎大学 医学部 研究高度化支援室（移植・消化器外科）

Key words：肝細胞，内皮細胞，肝臓，アレイ化，再生医療

緒　言

重篤な肝疾患に対する根治療法は肝臓移植のみであるものの、深刻なドナー不足が問題となっている。ゆえに、肝臓移植待機期間あるいは肝不全の急性期の処置として、多種多様な肝機能を一時的にでもサポートし得る治療法の開発が望まれている。実機能を担う“ヒト初代肝細胞”移植は有効な手段であるが、単離した肝細胞の著しい肝機能発現の低下、経門脈移植での頻回の塞栓等、多くの問題を抱えている。

局所麻酔での移植とグラフト除去が可能な皮下は、低侵襲性と高い安全性を両立した移植部位である［1］。しかし、代謝活性が高い肝細胞の立体組織化や血管網が乏しい皮下への生着は、酸素・栄養素供給と代謝産物除去がボトルネックとなり困難を極めている［2］。そこで我々は、二層のヒト初代肝細胞／線維芽細胞複合シートを皮下移植し、生体内で立体培養して血管誘導ヒト肝組織を作製する独自の基盤技術を確立した［3］。尿素合成や薬物代謝に関する優れた遺伝子発現が見られることから有用な移植システムとなり得ると考えているものの、単位移植肝細胞数当たりのヒトアルブミン産生レベルは生体の約 40 分の 1 であり、重篤な肝疾患に対して肝機能をサポートし得るレベルには到達していない。

生体臓器としての肝臓は、秩序立った肝細胞と内皮細胞の索状構造（肝類洞）や肝細胞極性等を構築することで肝小葉を構成しており、豊富な細胞間相互作用と高い物質交換効率を実現して複雑多岐にわたる肝機能を維持している［4］。すなわち、肝類洞のような肝小葉構造に基づいた細胞立体配置を制御することができれば、効率的な相互作用と酸素供給等が可能になり、優れた生着、肝細胞の立体組織化、より高い肝機能発現の維持が達成できると着想した。本研究では、マイクロステンシル法［5］と皮下性肝組織作製技術［3］を融合することによって、複雑な立体細胞配列を実現する独自の二次元細胞配列／三次元培養技術を確立し、立体ヒト肝組織を作製することを目的とした。

方　法

1. PDMS ステンシルの設計及び作製手順

既存の 35 mm ディッシュに用いるため、ポリジメチルシロキサン製マイクロステンシル（PDMS ステンシル）（Sylgard 184; Dow Corning, Midland, MI, USA）の外径を 33 mm、内径（培養範囲）を 29 mm に設計した。肝小葉のサイズ（グリソン鞘～中心静脈：約 1 mm）を踏まえ、PDMS ステンシルの貫通孔は 300 μm × 1,000 μm とした。NC 型微細加工機を利用し、前述の設計条件でアクリル鋳型を切削加工した。10% Pluronic F127（両親媒性ブロック共重合体、Sigma−Aldrich Japan, Tokyo, Japan）をコーティングした PDMS 平板を鋳型に貼り付け、マイクロ流路を作製した。流路に PDMS を導入し、48 時間以上、室温で重合した（図 1）。PDMS ステンシルを鋳型から取り外し、立体形状を SEM で観察した。I 型コラーゲンをコーティングした温度応答性培養皿（UpCell; CellSeed, Tokyo, Japan）に PDMS ステンシルを貼り付け、培養器材を完成させた。

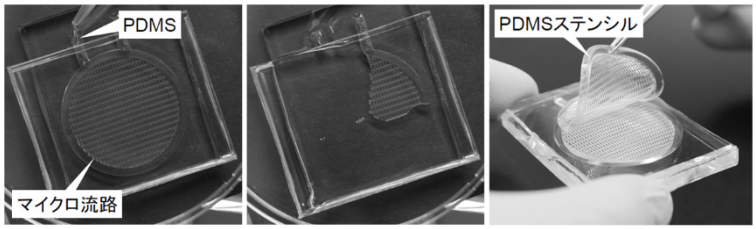


図 1. PDMS ステンシルの作製手順
鋳型と PDMS 平板を貼り合わせたマイクロ流路に PDMS を導入。
重合後、鋳型から PDMS ステンシルを剥離。

2. ヒト初代肝細胞と内皮細胞のマイクロパターニング共培養

インフォームドコンセントを得た肝癌等の患者から外科的に切除した肝組織の非腫瘍部（約 30 g）を用い、二段階コラゲナーゼ灌流法でヒト初代肝細胞を調製した［6］。密度勾配遠心後、トリパンブルー染色によって生存率が 80%以上のものを実験に用いた。

PDMS ステンシルにヒト初代肝細胞を 4.5×10^4 cells/cm^2 で播種して貫通孔底面に沈降させ、接着させた。培養 3 日目に PDMS ステンシルを除去した後、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を 5.2×10^4 cells/cm^2 で播種してステンシルがあった領域に接着させた。培養 6 日目にヒト脂肪由来幹細胞（hADSC）を 3.1×10^4 cells/cm^2 で播種し、培養 8 日目に温度を 20℃に低下させて細胞組織体を剥離・回収した（図 2）。4%パラホルムアルデヒドで固定し、断面を HE 染色した。

ヒト初代肝細胞と HUVEC の挙動を観察するため、細胞をトレースすることができる CellTracker (Molecular Probes, Eugene, OR, USA）を用いた。培養 3 日目にパターン化肝細胞を 10 μM CellTracker Orange CMRA で 20 分染色した後、5 μM CellTracker Green CMFDA で染色した HUVEC を播種した。蛍光顕微鏡を用い、肝細胞（赤）と HUVEC（緑）を検出した。

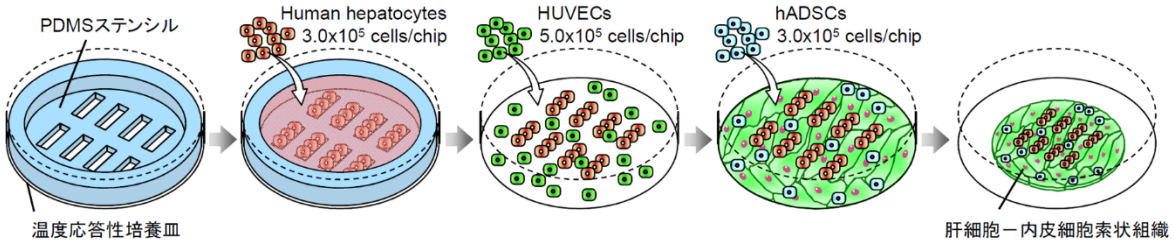


図 2. ヒト肝細胞－内皮細胞索状組織の作製手順
温度応答性培養皿貼り付けた PDMS ステンシルにヒト初代肝細胞を播種。ステンシルを除去した後、HUVEC と hADSC を播種してヒト肝細胞－内皮細胞索状組織を作製。

3. 肝障害モデルマウスの作製

長崎大学の「遺伝子組み換えマウス作製支援」により、Fah 遺伝子ノックアウトマウス（高チロシン血症 I 型）の作出を試みた。CRISPR-Cas9 システムを利用して、Fah 遺伝子の Exon 9 に対する 2 種類の gRNA を受精卵にインジェクションし、産仔のジェノタイピングを行った。

結果および考察

1. 完全な貫通孔を有する PDMS ステンシル

マイクロ流路を用いることにより、ほぼ全ての孔が貫通した PDMS ステンシルを作製し得た。PDMS ステンシルを SEM で観察したところ、精度よく貫通孔が形成していた（図 3）。あらかじめ作製した閉鎖的なマイクロ流路構造は、鋳型に PDMS を導入した後に平板を貼り合わせるのと比較して、効率的な貫通孔形成に大いに寄与したと考えられる。

さらに切削ドリルの種類によって、格子部分の形状を設計することが可能であった。格子形状をドーム型等にすることにより、播種した肝細胞を効率よく貫通孔底面に沈降することができると期待される。

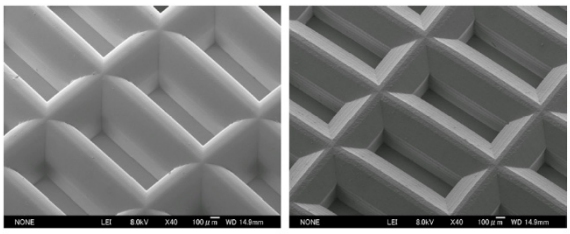


図 3. PDMS ステンシルの SEM 像

2 種類のドリルで鋳型を切削加工し、作製した PDMS ステンシルの SEM 像。
いずれも精度よく貫通孔が形成。

2. ヒト肝細胞－内皮細胞索状組織の形成及び特徴

培養 3 日目までに、やや立体的な厚い肝細胞パターンを形成した（図 4、上段）。PDMS ステンシル部分を除く実際の単位培養面積あたりで換算すると、ヒト初代肝細胞の播種密度は 1.8×10^5 cells/cm^2 であり、我々が以前報告した最適密度よりも約 2 倍高い [7]。これにより立体的な肝細胞形態を示し、パターン化して間隔を設けたことで良好な生存を維持できたと考えられる。さらに、HUVEC との共培養によって肝細胞の伸展は抑制され、立体構造を維持できたことが明らかとなった。

間隙を埋めていた HUVEC は、hADSC 播種後 1 日目には管腔様構造を形成することが判った（図 4、下段）。hADSC に支持されたことによって、劇的な立体的形態変化をもたらしたと考えられる。肝細胞－内皮細胞索状組織断面の HE 染色も同様に、立体的な肝細胞と HUVEC（hADSC を含む）が交互に配列され、一部で管腔様構造を形成したことを明らかにした。培養組織体に血管網を構築するために、ランダムに内皮細胞と間葉系幹細胞を混合する他の研究と同様の結果であるが [8]、細胞のみで規則的な血管網有する肝細胞組織体を作製した研究は他にない。現在、SEM 及び TEM による詳細な形態解析を進めている。

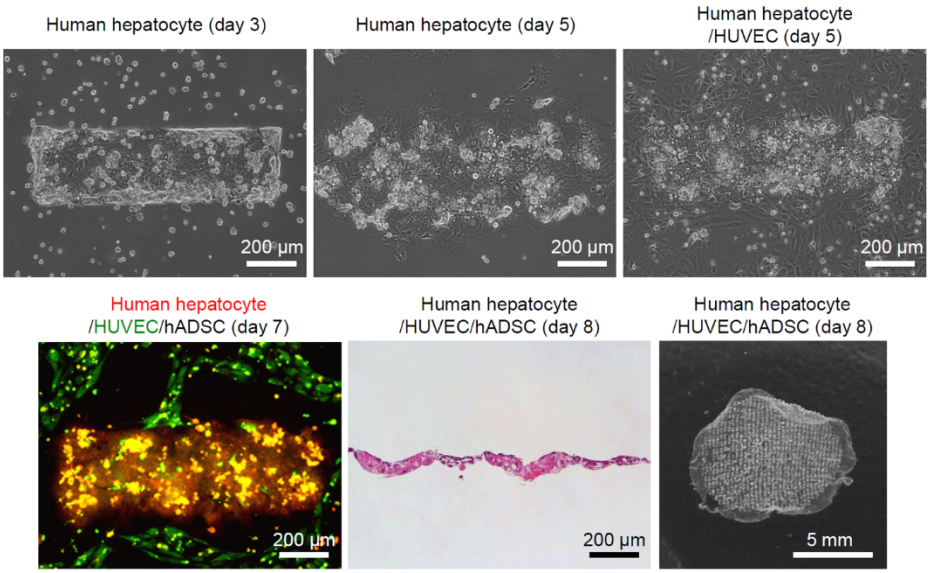


図 4. ヒト肝細胞－内皮細胞索状組織

位相差顕微鏡像（上段）。hADSC を播種して形成させた HUVEC の管腔様構造の蛍光顕微鏡像と HE 染色像及びヒト肝細胞－内皮細胞索状組織の外観（下段）。

3. 高チロシン血症 I 型重度免疫不全マウスの作出と応用

肝細胞－内皮細胞索状組織をより立体組織化するため、生体内培養に利用し得る高チロシン血症 I マウスを作出した。ジェノタイピングの結果、6 種類の欠損パターンが確認された。現在、高チロシン血症 I 型重度免疫不全マウス（Fah(+/-)/NSG マウス）はヘテロ欠損であるため、ホモ欠損マウス（Fah(-/-)/NSG マウス）を利用する準備を進めている段階である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北九州市立大学国際環境工学部環境生命工学科中澤研究室の中澤浩二教授である。本研究の一部は、科学研究費補助金（Grant Number 16H05908、研究代表者：堺裕輔）によって実施された。

文　献

1) Ohashi K. Liver tissue engineering: The future of liver therapeutics. Hepatol Res. 2008 Nov;38 Suppl 1:S76-87. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2008.00431.x.

2) Lee H, Cusick RA, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R, Vacanti JP. Effect of implantation site on hepatocytes heterotopically transplanted on biodegradable polymer scaffolds. Tissue Eng. 2003 Dec;9(6):1227-32. DOI: 10.1089/10763270360728134.

3) Sakai Y, Yamanouchi K, Ohashi K, Koike M, Utoh R, Hasegawa H, Muraoka I, Suematsu T, Soyama A, Hidaka M, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S. Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered hepatocyte/fibroblast sheets in mice. Biomaterials. 2015 Oct;65:66-75. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.046. Epub 2015 Jun 27.

4) Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. FASEB J. 1999 Nov;13(14):1883-900. PMID:10544172.

5) Nakazawa K, Shinmura Y, Higuchi A, Sakai Y. Effects of culture conditions on a micropatterned co-culture of rat hepatocytes with 3T3 cells.J Bioprocess Biotech. 2011 Sep 30;S3:002. DOI: 10.4172/2155-9821.S3-002.

6) Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, Irons G, McLain JR, Michalopoulos G. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. J Natl Cancer Inst. 1982 May;68(5):771-8. PMID:7040771.

7) Sakai Y, Koike M, Soyama A, Hidaka M, Kuroki T, Eguchi S. Rapid production of engineered human primary hepatocyte/fibroblast sheets. Data Brief. 2015 Oct 9;5:498-501. DOI: 10.1016/j.dib.2015.09.044. eCollection 2015 Dec.

8) Sasaki K, Akagi T, Asaoka T, Eguchi H, Fukuda Y, Iwagami Y, Yamada D, Noda T, Wada H, Gotoh K, Kawamoto K, Doki Y, Mori M, Akashi M. Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique. Biomaterials. 2017 Jul;133:263-274. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.034. Epub 2017 Feb 28.