

論文の内容の要旨

論文題目 肝前駆細胞の三次元培養と血流導入移植に関する研究

氏名 花田 三四郎

近年、再生医療の名のもとに、組織工学的手法を用いた臓器再構築に関する研究が取り組まれている。組織工学とは、細胞と足場および液性因子を用い、生体外で移植可能な組織および臓器を構築することを目的とした学問である。LangerとVacantiにより組織工学の可能性が提唱されてから約15年が経ち、平面組織においては、臨床応用可能な研究例が示されてきた。

一方、肝臓を含む大型臓器は、機能性細胞が高密度に充填されており、その酸素・栄養の物質交換を維持するための毛細血管網が縦横無尽に張り巡らされた複雑に構造化された三次元組織であり、その再構築には更なる困難を要する。肝臓は、移植治療における再生能が期待される一方で、根本的なドナー不足という問題を抱えており、組織工学の目的臓器として盛んに研究がなされている。しかしながら、それらの研究は、ステムセルの分化誘導や臓器足場の構築、埋め込み型移植などの要素技術の確立であり、現実的に代替肝組織の構築を目指した研究例は現状では極めて少ない。

肝組織工学においては、生体外における培養プロセスと生体内の移植プロセスを統合したシステム的アプローチが必要である。具体的には、生体外においては、①高い肝機能を有する移植適用可能な三次元細胞組織が必要であり、生体外においては、②生体外構築肝組織の移植実験系の確立が必要となる。それらを実施することで、現状の要素技術における問題点を抽出すべきである。

本研究では、組織工学的手法に沿った肝組織構築のための基礎的プロセスの確立しそれらを肝組織構築システムとして実施することを目的とし、肝組織構築の実現可能性の検討を行った。具体的には、培養プロセスとして、①肝前駆細胞を豊富に含む胎児肝細胞をモデル細胞として用い、発生上意義のある液性因子添加の下で三次元培養を行い、移植適用可能な肝機能レベルを有する肝組織の構築を試みた。また、移植プロセスにおいては、②血流に構築肝組織デバイスを導入する新規移植実験系を確立することで、肝組織の更なる成熟化およびその組織再構成の実現可能性を検討した。これらの一連のプロセスをシステムとして実施することは、将来の臨床を想定した肝組織工学に向けての有用な知見となると考えられる。

本論文は、「肝前駆細胞の三次元培養と血流導入移植に関する研究」という題目で、本編5章および補章により構成されている。

第1章は、本論文の緒論であり、研究の背景と目的である。はじめに、重篤肝疾患治療に関する現状について、圧倒的なドナー不足という問題に対する対策として、移植医療へのつなぎ医療としての人工肝臓および肝細胞治療についての研究例を示した。ドナー不足の根本的解決には、肝組織工学による移植可能な肝組織の構築が必要であることを述べた。しかしながら、現状の肝組織工学が要素技術の集約段階であることを研究例により示し、肝組織工学をより現実的目標とするためには、培養プロセスと移植プロセスの両面から肝組織工学を統合システムとして研究すべきであることを主張した。とくに、現段階では小動物レベルにおける実現可能性検討が必要であり、本研究の目的として、ラットをモデル動物とした肝組織構築システムの実現性検討を提示した。

第2章においては、免疫不全ラットへの移植を想定し、継代ヒト胎児肝細胞株を細胞ソースとして用いた三次元培養を行い、肝発生学上意義のある液性因子の添加により、継代培養により低下しているヒト胎児肝細胞の肝機能の回復と更なる成熟化を試みた。液性因子として、オンコスタチンMおよび肝細胞増殖因子について検討を行ったが、とくに既往の研究例においてマウス胎児肝細胞の成熟化に寄与するとされるオンコスタチンMは、アルブミン分泌能の向上という点においてヒト胎児肝細胞株においても有効であることを示した。塩溶出発泡法により作製したポリ乳酸多孔質担体を足場として用いた三次元培養は、オンコスタチンMの添加との相乗的な作用によりアルブミン分泌能およびより高度な肝機能であるチトクロムP450 1A1/2酵素活性においても顕著な亢進を示した。これは、三次元培養による細胞・細胞間相互作用の向上とともに、足場に蓄積した液性因子の局所的な作用などが肝成熟化を促進していることを示唆している。一方で、本研究によって達成された肝機能は、成熟肝機能に比べて1/20以下と非常に低く、組織工学に用いる細胞ソースとしては、不十分であったといえる。

第3章においては、移植適用に十分な肝機能を有する生体外肝組織の構築を目指し、初代ラット胎児肝より肝前駆細胞集団を採取し、その成熟化を試みた。第2章で得られた知見とともに、さらに近年有用な知見が得られているステムセルの肝分化誘導研究例から、繊維芽細胞増殖因子1、4、酪酸ナトリウムについて検討を行った。繊維芽細胞増殖因子1および4、肝細胞増殖因子を組み合わせることで、培養初期における増殖能を顕著に高め、アルブミン分泌能の亢進を確認した。また、酪酸ナトリウムはよりチトクロムP450 1A1/2酵素活性の劇的な亢進を確認した。オンコスタチンMは、肝機能の維持に有効であった。三次元培養との相乗的な効果においては、培養2週間の肝機能を相対的に維持し、その肝機能は、アルブミン分泌能に関しては成熟ラット肝細胞と同等、チ

トクロムP450に関しては半分程度と高い肝機能を実現した。また、三次元培養においては、肝細胞はPAS染色陽性であり、肝細胞と非実質細胞が層状に組織化された生体内肝組織様の形態が確認された。

第4章では、第3章で構築した生体外構築肝組織を肝組織デバイスとして用い、臨床を想定した血流導入型移植実験系の確立を目指した。具体的には、頸部動脈間に肝組織デバイスを挿入することで、血液循環内における組織再生能および高度組織形成を期待している。上記の移植実験系の実現可能性について移植手法の確立および移植後の組織学的検討を行った。肝組織デバイスは、第3章で作製した三次元肝組織に半切したカニューレに配置し蜜蝋により被覆することで作製した。移植後は、肝組織が部分的に維持されることが確かめられたが、高度な組織形成は実現されなかった。そこで、培養時に播種細胞密度を高めたデバイスを作製したところ肝組織が維持された。また、三次元肝組織に多孔質膜を配備し、部分的に血流を制限すると、より高度な肝組織の維持が確認された。このことは、細胞と血球の接触が高度な肝組織化を阻害していることが示唆された。肝組織デバイスに設計と培養条件へのフィードバックによりより高度な肝組織の構築が期待される。

第5章では、本論文の総括および今後の展望をおこなった。本研究は、肝前駆細胞をモデルとして現状困難であった成熟レベルの肝機能を実現したこと、新規移植実験系として頸動脈間血流導入移植を試みその可能性を示したことにおいて、生体組織工学における新規性のある成果であると考えられる。特に、現状の組織工学的手法における培養プロセスと移植プロセスをシステムとして統合し、その限界点の見極めとプロセスに対する相互フィードバックの必要性を示した点を強調する。今後、肝組織工学を現実のものとするには、各要素技術の発展とともに、培養と移植を常に統合システムとして捉え本質的な問題点を抽出し、相互フィードバックすることが必須であると考えられる。

また、補章として、生体外における三次元培養のスケールアップを目標として、バイオリアクターを用いた灌流培養系による継代ヒト胎児肝細胞株の成熟化およびヒト肝癌細胞株の増殖に関する研究成果を付した。