

審査の結果の要旨

氏名 高山 利夫

本研究は、大型再生臓器を創成する際の問題点である、栄養血管網の不十分な誘導による細胞壊死を改善するために、細胞のスフェロイド化と血管新生誘導素材の使用が有用であるかの検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 素材の選択

一般に、細胞移植に適応可能な血管新生誘導素材に望ましい条件を検討し、独立行政法人物質・材料研究機構と共同開発した素材が、コラーゲンとクエン酸誘導体より合成したイオンコンプレックスゲル (ion complex gel; IC gel) である。IC gel は、コラーゲンを主成分とした電荷の異なる 2 種類の液体を混合することでイオン結合によりゲルを形成する。IC gel は、ヒト臍帯静脈内皮細胞と高い親和性を有していることが確認された。

2. 既存マテリアルに対する IC gel の優位性

IC gel を、マトリゲルおよび 1%粗コラーゲンと比較検討した。各サンプルを Wistar 系野生型ラットに移植し、5 日目に摘出。組織切片を作製し、血管内皮抗原 (vWF) および血管平滑筋抗原 (α SMA) に対する免疫染色を行った。また、IC gel と bFGF の相乗効果を評価するために、IC[1%]・IC[2%]・1%粗コラーゲンに bFGF を添加して移植用サンプルを作製し、同様に比較検討を行った。実験の結果、IC gel は、IC[1%]・IC[2%]ともにマトリゲルや 1%粗コラーゲンと比較して生体内で有意差を持って高度な血管新生誘導能を有していることが確認され、その効果が bFGF 添加によりさらに増強されることが判明した

3. GFP 遺伝子導入ラットからの初代肝細胞スフェロイド作成

初代肝細胞を採取するために使用した動物は、ドナー由来細胞の存在確認を容易にするため GFP 遺伝子導入ラットとした。リン酸緩衝液を主成分とした前灌流液を門脈内投与して十分に肝臓内の血液を排除した後、タンパク分解酵素を含むコラゲナーゼ液で灌流処理し、肝臓を摘出した。処理した肝細胞を、専用プレートにて培養すると 1-2 日程度でスフェロイドを形成し、励起波長 480 nm の UV 光で緑色の発色が確認された。

4. スフェロイドと血管新生誘導素材を併用することの有用性

使用動物は T 細胞系免疫不全動物であるヌードラットとし、比較検討のため以下の 4 群を設定した。①群：採取直後の遊離肝細胞をスフェロイド形成させずに、IC gel も用いず移植した群，②群：肝細胞をスフェロイド化させるが、IC gel を用いず直接移植した群，③群：採取直後の遊離肝細胞をスフェロイド形成させずに、IC gel と混合して移植した群，④群：肝細胞をスフェロイド化させ、かつ IC gel と混合して移植した群。これらを移植後 5 日目と 10 日目に摘出，組織切片を作製し，抗 GFP 抗体を用いた免疫染色によりドナー由来肝細胞の存在確認を行うとともに，vWF 染色にて血管新生の評価も行った。実験の結果，5 日目と 10 日目いずれの時点でも，④群が，肝細胞の存在面積・血管新生面積ともに他の 3 群と比較して有意に高値であった。

5. 移植肝細胞の代謝能発現の確認

肝細胞スフェロイドと IC gel を混合して移植したサンプルが肝臓固有の代謝機能を持つかどうかの評価を，CYP2E1 に対する免疫染色を行って確認した。その結果，移植後 4 ヶ月までの時点で，GFP 染色陽性細胞が同時に CYP2E1 染色にも陽性であることが確認された。

以上，本論文はラット肝細胞を移植する実験系において，細胞のスフェロイド化と，血管新生誘導素材である IC gel の併用が，移植細胞の生存率向上に有用であることを明らかにした。本研究により確立された方法は，今後の再生大型臓器創成のための基盤的技術となり得ると考えられ，学位の授与に値するものと考えられる。