

学 位 論 文 題 名

Novel method for faster formation of rat liver cell spheroids

(ラット肝混合細胞スフェロイドの新しい迅速作製法)

学位論文内容の要旨

急性肝不全治療の新しい治療法となりうるハイブリッド型人工肝臓開発を目指し、混合スフェロイドの迅速大量作製法を確立するために本研究を行った。肝細胞は、単離の状態より細胞と細胞とが接着する肝細胞集合体(スフェロイド)の方がより機能を発現する。スフェロイド作製には一般に、細胞分散後に培養環境下で単離肝細胞を凝集させる手法が用いられるが、その作製には早いもので24時間、通常2~4日を要する。本研究でも細胞分散後に細胞培養を行ってスフェロイド作製を行っているが、細胞分散法を改変することでクラスター状の細胞塊を可能とし、また、培養法に浮遊回旋培養法を導入することにより、6時間という短時間で混合スフェロイド作製を行うことが可能であった。

現在一般的に行われている細胞分散は Seglen の考案した細胞分散法をもとにしている。すなわち、EGTA (Ethylene Glycol-bis (b-aminoethyl ether) -N,N,N',N' -Tetraacetic Acid) を含む前灌流液で組織内および細胞間の二価イオンをキレート除去することで細胞間接着を弱め、続く酵素灌流液で細胞外マトリックスを消化して単離細胞を得る手法である。使用する酵素は通常コラゲナーゼだが、その活性を増すために酵素灌流液には二価イオンであるカルシウムを添加する。しかし、この細胞分散法は完全に単離された細胞を得るには適した手法であるが、混合スフェロイドのためには凝集能が高く、完全には単離されていない細胞の方が適している。そこで、細胞分散を工夫して、スフェロイド作製に適したより凝集能の高い細胞を採取し、それを浮遊回旋培養することで、混合スフェロイドの大量迅速作製が可能と考え、肝細胞の分散法および培養法を検討することとした。

【仮説】肝細胞分散における2段階酵素灌流法で、前灌流液からEGTAを、酵素灌流液からカルシウムを除去することによって、凝集能の高い細胞が得られ、続く回旋培養によってスフェロイドが短時間で形成される。

【方法】実験動物にはWistar系雄性ラットを用いた。前灌流液中のEGTAを除去し、酵素灌流液中のCaを除去したEC(-)群と、従来法のEC(+)群を設定し両群間で以下の項目について比較検討した。分散直後の細胞収量、細胞生存率、分散時の細胞凝集率、回旋培養開始から2時間毎12時間までのスフェロイド形成率およびスフェロイドサイズを検討した。また、分散直後の肝細胞の走査型電子顕微鏡による観察、接着性細胞外基質としてラミニンの組織免疫染色を行った。形成されたスフェロイドに関しては走査型電子顕微鏡による観察、また、EC(-)群のスフェロイドに関しては非実質細胞の評価のために共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

【結果】肝細胞の収量・生存率は両群間で差は無かった。分散初期の肝細胞凝集率は有意にEC

(-)群が高かった。分散直後の肝細胞の走査型電子顕微鏡による観察では、多数の microvilli が EC (+)群に見られるのに対し、EC (-)群の肝細胞ではうろこ状の物質が microvilli を覆うように残存しているのが観察された。同時に分散直後の肝細胞のラミニン染色では、EC(-) 群がより強く染色される傾向があった。スフェロイド形成率は2時間と4時間においてEC (-)群が高かったが、6時間以降は両群に差は認めなかった。スフェロイドサイズはいずれの観察時間においてもEC (-)群が大きく、6時間の浮遊回旋培養の結果、直径70~80 μm の小型のスフェロイドが形成された。走査型電子顕微鏡では、豊富な微絨毛をもった肝細胞の球形集合体と、その表面に存在する類洞内皮細胞が観察され、所々に micro canaliculi の開口部と考えられる小孔を認めた。蛍光標識アセチル LDL と、蛍光ラテックスビーズを用いた共焦点レーザー顕微鏡でも表面に存在する非実質細胞の存在が示された。透過型電子顕微鏡では肝細胞は立方体で、肝細胞内に非常に多くのミトコンドリアを有しており、個々の細胞の代謝活性が高いことが示された。

【考察】前灌流液から EGTA を除去し、酵素灌流液から Ca を除去する本細胞分散法によって、得られる肝細胞は凝集能が高く、スフェロイド作成に適していた。また、得られた細胞を浮遊回旋培養することによって、スフェロイドは6時間という短時間で形成され、仮説の正しさが証明された。

現在一般的に行われている Seglen 法は、基本的に二つのステップによって構成されている。1番目は前灌流液中のキレート剤によって組織および細胞間隙の2価陽イオンを除去し、いわゆる chemical digestion を行ない、続く酵素灌流によって細胞外期質の消化を行って単離細胞を得るという手技であるが、本法における前灌流の目的は血管内の脱血のみである。逆にキレート剤を用いると次の酵素灌流に用いるコラゲナーゼの酵素活性が減弱してしまうので、凝集能の強い細胞は得られるが、収量および生存率が極端に低下する。なぜならば、コラゲナーゼなどの基質消化酵素はその働きのためには2価の陽イオンが必要であり、細胞外基質が消化されるまでに時間がかかるため、細胞の生存率が低下する。本手法では、前灌流でカルシウムなどの2価陽イオンを完全にキレートしないことが特徴である。そのため、コラゲナーゼの作用は、酵素灌流液にカルシウムを添加した場合と比較して mild であり、EC (-)群の単離肝細胞にはより多くのラミニンが細胞周囲に存在していることより、肝細胞は周囲に細胞外基質が残存したまま分散されると考えられる。ラミニンは細胞外基質の中でも代表的な接着性の基質であり、EC (-)群の肝細胞が従来の分散法である EC (+)群より凝集能が高いことと一致する。加えて非実質細胞は肝細胞周囲に存在するが本法においては肝細胞と同時に収穫され、非実質細胞を多く含む混合スフェロイドが形成されたと考えられる。また、単層培養と比較すると、浮遊回旋培養は細胞同士が接触する機会が多いために、さらにスフェロイド形成が促進されたと考えられる。

【結語】人工肝臓の main bioreactor となりうる混合細胞スフェロイドを6時間という短時間で作製することに成功した。今後のハイブリッド型人工肝臓への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Novel method for faster formation of rat liver cell spheroids

(ラット肝混合細胞スフェロイドの新しい迅速作製法)

急性肝不全治療の新しい治療法となりうるハイブリッド型人工肝臓開発を目指し、肝混合細胞スフェロイドの迅速大量作製法を確立するために本研究を行った。

肝細胞は、単離状態よりスフェロイドの方がより高い機能を長期間発現する。スフェロイドは、肝細胞分散に続き、培養環境下で単離肝細胞を凝集させて作製し、通常3～4日を要する。この作製時間の短縮のためには凝集能が高く、完全には単離されていない細胞が適しており、肝細胞分散のスタンダードである Seglen 法の2段階酵素灌流法の前灌流液から EGTA を、酵素灌流液から Ca^{++} を排除することで凝集能の高い細胞塊を得、続く回旋培養によってスフェロイドが短時間で形成されると仮説を立てた。Wistar 系雄性ラットを用い、前灌流液中の EGTA と、酵素灌流液中の Ca^{++} を排除した EC (-) 群と、従来法の EC (+) 群を設定し両群間で細胞分散法、分散後の細胞状況、スフェロイド形成状況、スフェロイド形態について比較検討した。細胞分散法では肝細胞の収量・生存率は EC (+) 群 ($2.64 \pm 0.84 \times 10^8$ 個、 $92.1 \pm 2.2\%$)、EC (-) 群 ($2.63 \pm 0.85 \times 10^8$ 個、 $92.6 \pm 2.5\%$) と有意差は無く、従来法と比べ遜色はなかった。分散初期の肝細胞凝集率、非実質細胞率は EC (+) 群 ($46.9 \pm 8.6\%$ 、 $11.2 \pm 4.3\%$)、EC (-) 群 ($63.0 \pm 10.7\%$ 、 $21.1 \pm 7.3\%$) と、EC (-) 群が有意に高かった。走査型電子顕微鏡 (SEM) では、EC (-) 群の肝細胞はうろこ状の物質が微絨毛を覆い、細胞外基質の残存と考えられ、ラミニン染色でも EC (-) 群がより強く染色される傾向があった。スフェロイド形成率は2時間と4時間において EC (-) 群が高く、スフェロイドサイズはいずれの観察時間においても EC (-) 群が大きく、6時間の浮遊回旋培養の結果、直径 $70 \sim 80 \mu\text{m}$ の小型のスフェロイドが形成された。スフェロイドの SEM では、豊富な微絨毛をもった肝細胞の球形集合体と、その表面に存在する類洞内皮細胞が観察され、共焦点レーザー顕微鏡では肝細胞に対しておよそ 30% の非実質細胞がスフェロイド表面に存在することが示された。新しい細胞分散法は従来と比べてマイルドな肝細胞分散法であり、肝細胞周囲に存在する細胞外基質ならびに非実質細胞が肝細胞と同時に採取されるため、分散直後より凝集塊が多く、非実質細胞を多く含む肝細胞塊が得られたと考えられる。また、回

旋培養は細胞同士が接触する機会が多いため、新しい分散法で得られた凝集能の高い細胞を回旋培養する事でさらにスフェロイド形成が促進されたと考えられる。本研究によって人工肝臓のバイオリアクターとなりうる混合細胞スフェロイドを6時間という短時間で作製することに成功し、今後のハイブリッド型人工肝臓への応用が期待される。

審査にあたって、まず小柳教授より①実際の機能検査は行ったか、②非実質細胞の **paracrine** はどのような物質が考えられるか、③臨床応用に向けての今後の展望の質問が出された。これに対して①形態維持の困難さから長期の機能検討は行っていないが、初期およびコラーゲンゲル環境化では単層培養よりも高い機能を発揮することをデータを示して解答した。② IL-10 などの液性因子が考えられるが詳細は判明していない、③スケールアップを図るためにブタを用いた肝細胞分散、スフェロイド形成について検討中であることを解答した。続いて藤堂教授より①移植が一般的治療法になりつつある中で人工肝臓の存在意義、②スフェロイド機能を十分に発揮するための足場作りとしての方法に対して質問が出された。これに対して、①日本における肝移植の現状を説明し、健常人からの肝臓提供を伴わない劇症肝炎治療法としての意義、②形態維持のためのゲル環境および企業との共同研究でカプセル化を検討していることを説明した。最後に浅香教授より、①人工肝臓は携行型になりうるのか、②合成能までも代償するのは難しいのではないか、③アルブミン以外の物質産生能でもスフェロイドは有用なのか、**m-RNA** はみたか、④なぜスフェロイドを早く作る必要があるのか、⑤回旋培養における回転数とスフェロイド形成の関係、⑥ブタやヒトでも本実験（ラット）と同じ結果が得られると思うかの質問が出された。これに対して、①将来的には携行型が望ましいがどの程度先で実現されるかは不明、②アルブミンや凝固因子などは補充で解決可能、不足であれば肝細胞への遺伝子導入で対応できる可能性、③**m-RNA** は検討していないが、アンモニア解毒能ではスフェロイドが優れていた。④肝不全患者の治療までに要する時間の短縮を意図した、⑤予備実験のデータを示し、120rpm が至適回転数である、⑥種によって違いがあり、ブタについては **collagenase** などの条件等、分散方法について検討中であることを説明した。

この論文は、わずか6時間という世界最速の肝混合細胞スフェロイド作製法を示したものであり高く評価された。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位等と併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。