

L12**血管内皮細胞との共培養による肝細胞組織内部での血管網構築の試み**

(九大工)○谷秀樹・(九大院工)(学)稻森雅和・(正)水本博・(正)梶原稔尚*

[緒言]

再生医療や人工臓器開発の分野において、分散状態の細胞から生体類似の組織構造を作製する技術が求められている。その中でも、毛細血管網の構築は、巨大な細胞組織体を維持するために重要視されている。我々は、肝細胞から構成される球状細胞組織体（スフェロイド）の表面を血管内皮細胞で被覆し数個集積させて再組織化を行う手法により、スフェロイドの融合によって形成された巨大組織体内部での血管内皮細胞の規則的な配置と毛細血管網の構築を試みてきた。一方、肝細胞を種々の細胞と共に培養することによって、細胞間相互作用によって肝特異的機能が向上することが期待されている。そこで本研究では血管内皮細胞に被覆されたスフェロイドを血漿分離用中空糸に充填することによって再組織化を行い、スフェロイド化や内皮細胞との共培養が肝細胞の生存率や機能発現に与える影響について検討した。

[実験方法]**1.スフェロイド形成方法**

初代ラット肝細胞を $1.0 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ の密度で 6 well-plate 上に播種し、80rpm で 1 日間浮遊旋回培養を行うことでスフェロイドを形成した。金属メッシュを用いて直径 $100\sim150\mu\text{m}$ のスフェロイドを回収した。次に、スフェロイド表面を I 型コラーゲンで被覆し、アガロースコートした 100mm dish にスフェロイドと正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を $2.0 \times 10^6 \text{ cells/dish}$ の条件で播種した。その後 4 日間培養することによりスフェロイド表面を HUVEC で被覆した。

2.中空糸での共培養

内皮細胞で被覆されたスフェロイドのうち、直径 $300\mu\text{m}$ 以下の分画を回収した。回収したスフェロイドを血漿分離用中空糸(直径 $330\mu\text{m}$)に $7.0 \times 10^5 \text{ cells}$ の条件で播種した後、中空糸の先端から 3cm の部分で切断し 6 well-plate 内で 14 日間旋回培養を行った。評価として、細胞数並びに形態変化、そして肝機能評価としてアンモニア除去能とアルブミン分泌能の評価を行った。なお比較対象として行った中空糸への播種条件を以下に示す。

- (1)肝細胞(シングルセル)
- (2)肝細胞(シングルセル)+HUVEC(シングルセル)
- (3)肝細胞(スフェロイド)

(4) HUVEC 被覆スフェロイド**[実験結果]**

浮遊旋回培養を行った肝細胞は培養 1 日目にはスフェロイドの形成が観察された。培養 1 日目のスフェロイドの粒径分布を Fig.1 に示す。スフェロイド粒径は培養経過とともに増大する傾向が示された。成熟した肝細胞は増殖しないため、この結果はスフェロイド同士の融合によるものと考えられる。よって本検討では、 $100\sim150\mu\text{m}$ のスフェロイド分画を得るための培養期間は 1 日間にした。形成後、回収したスフェロイドの表面にコラーゲンをコートし、HUVEC と共に培養を行うことにより肝細胞スフェロイドの表層に HUVEC が接着し、単層上に表層を覆うことが示された。

[まとめ及び今後の予定]

内皮細胞によって表層を覆われた肝細胞スフェロイドを形成できることを確認した。現在、細胞数と肝機能について評価中である。

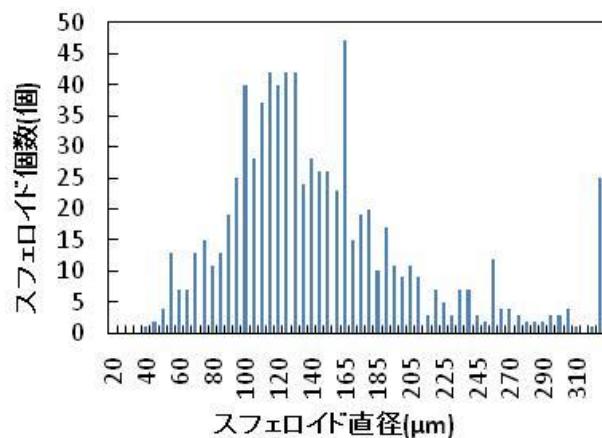


Fig.1 スフェロイド粒径分布(培養 1 日目)

*TEL: 092-802-2746 FAX: 092-802-2796
E-mail: kajiwara@chem-eng.kyushu-u.ac.jp