

# L13

## 人工肝臓装置開発に向けた中空糸オルガノイド培養法によるES細胞の肝細胞分化

(九大工)○宮沢徹・(九大院工)(学)網本直記・(正)水本博・

(北九大環境工)(正)中澤浩二・(九大院工)(正)井嶋博之・(正)船津和守・(正)梶原稔尚\*

### 【緒言】

肝臓は極めて多くの機能を営む臓器であり、現在の最先端の技術をもってしても人工的に肝臓そのものを作ることは困難である。従って重篤な肝疾患患者に対する根本的治療法は肝移植のみとされている。しかし、ドナー不足は深刻であり、待機中に死亡する例も多い。そこで移植までの橋渡し、あるいは肝移植に代わる新たな治療法の確立が求められている。その1つとして機能性肝細胞を充填したモジュールを用いて、体外から肝機能補助を行うハイブリット型人工肝臓が挙げられる。

ハイブリット型人工肝臓の開発には、十分量の細胞の確保と良好な肝機能維持の工夫が必要である。現在我々は細胞ソースとして無限増殖能を持ち生体を構成するあらゆる細胞に分化することの出来る胚性幹細胞

(ES細胞)に着目している。ES細胞を治療に用いるには適切な方法で肝細胞に分化させることが必要である。そこで我々は中空糸内で細胞がオルガノイドを形成する中空糸／オルガノイド培養法 (Fig.1) をマウスES細胞に適用し、肝分化誘導因子を添加した培地で培養することで肝特異的な遺伝子の発現や肝機能を確認し、この手法を利用した人工肝臓開発に取り組んでいる。

一方、マウスのような齧歯類とヒトのような靈長類ではES細胞の形態、未分化維持機構、表面抗原や増殖能等に一部違いがあることが知られている。そこで本研究ではヒトと同じ靈長類で性質もよく似たカニクイザルES細胞に着目した。最適な靈長類ES細胞の肝分化条件を開発するために、まずこれまでに確立したマウスES細胞の肝分化の条件をカニクイザルES細胞に適用して肝分化を試みた。

### 【実験方法】

不活性化したマウス胎仔纖維芽細胞（フィーダー細胞）上にてカニクイザルES細胞をコロニー状で増殖させ、必要細胞数を確保した。

トリプシンを用いてES細胞を分散状態で回収した。1.5 cmのセルローストリニアセテート (CTA) の中空糸6本を束ねたバンドルを作製し、 $1 \times 10^5 \text{ cells/bundle}$ となるようにカニクイザルES細胞を遠心播種し、旋回培養を行った。培養にはIMDMを基礎培地とした培地を行い、培地交換は毎日行った。培養期間は3週間で、細胞形態、細胞数および肝細胞への分化能の評価を行った。

### 【実験結果および考察】

中空糸内に充填したマウス、カニクイザルES細胞は播種直後には中空糸端部で小さな凝集塊を形成した。その後細胞培養に伴って凝集塊は中空糸内を伸長し中空糸内部全体を占めるに至った。次にそれぞれの細胞を用いた場合の中空糸内での細胞密度変化を Fig.2 に示す。この結果、両細胞種では到達細胞密度が大きく異なっていることが示された。この違いは倍加時間の違い、また細胞分化に伴う細胞の大きさの変化や組織構造が異なっていることが予想され、今後より詳細な検討が必要である。

### 【結論】

マウスES細胞とカニクイザルES細胞では中空糸内部での増殖挙動が大きく異なることが示された。

現在この違いの原因を明らかにするために中空糸内部の解析を行っている。また、培地に肝細胞への分化誘導因子を添加し肝機能評価を行っている。

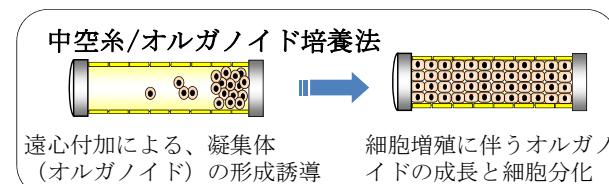


Fig.1 中空糸／オルガノイド培養法

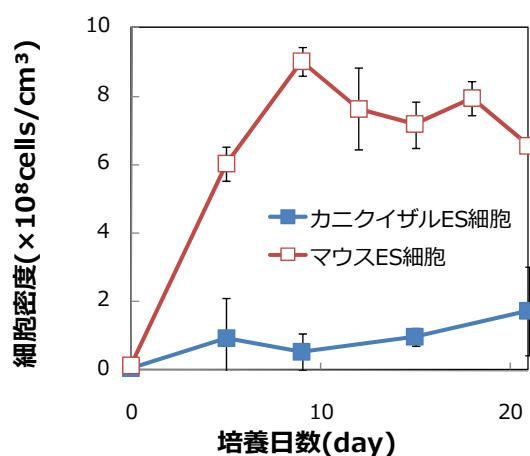


Fig.2 培養経過に伴う細胞密度変化

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