

氏 名 アライ ケンイチ  
荒井 健一

学位の種類 博士(工学)

学位記番号 富生命博甲第68号

学位授与年月日 平成26年9月26日

専攻名 生体情報システム科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

学位論文題目 3次元肝組織デバイスの構築及び機能評価の為の基礎研究

論文審査委員  
(主査) 教授 中村 真人  
教授 篠原 寛明  
教授 二階堂 敏雄

## 学位論文内容要旨

(ふりがな)	あらい けんいち	
氏名	荒井 健一	男

## [背景及び目的]

工学的に生体組織やそれに準ずるものを作製し、疾病の治療や医薬品のスクリーニング等に用いることは、再生医療や組織工学における最大のテーマである。しかし、心臓や肝臓のような構造が複雑な臓器に関しては、生体内外いずれにおいても作製は非常に困難である。特に肝臓の組織は、生体内では肝実質細胞が 3 次元構造を構成しており血管側と胆管側という高い極性を保ち、各種レセプターなどの膜タンパク質の局在が厳密に制御されている。しかし、通常の 2 次元培養環境下では肝実質細胞の極性が制御できず、薬物の取込み及び排出など生体内における肝機能を反映させることができない。肝機能の維持さえも困難である。そこで、本研究では 3 次元培養環境を制御し、生体外で肝実質細胞の極性を維持できる 3 次元培養デバイスの作製方法を模索した。

## [方法及び結果]

本研究は以下の流れで行った。

## ① 3D バイオプリンターの改良及び 3D ゲル構造物の作製

肝実質細胞に対して 3 次元の培養環境を再現でき、かつ、細胞の極性を制御できる足場を構築する方法を模索した。作製方法はインクジェット技術を応用した 3D バイオプリンターを用いた。この装置はゲル前駆体としてアルギン酸ナトリウム溶液を塩化カルシウム存在下の溶液の中に吐出することにより、3 次元のゲル構造物を作製する。これまでの装置を改良して、様々な複雑なゲル構造物の作製を試みた。その結果、様々なゲル構造物の作製に成功した。

## ② 人工的な細胞外マトリックス上での肝実質細胞の膜極性及び肝機能の検討

細胞の膜タンパク質の局在を生体内同様に制御できる培養法を検討した。足場材料として PVLA[poly(*N-p*-vinylbenzyl-4-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-gluconamide)]を用いた。PVLA はガラクトース基を介して肝実質細胞のアシアロ糖タンパク質レセプター(ASGPR)に特異的に接着する人工ポリマーである。PVLA を表面に固定した培養基板を用いた 2 次元培養環境下では肝実質細胞は通常の培養に比べて伸展せず、肝機能を維持できることがこれまでの研究で分かっている。ASGPR は肝細胞の血管側に多く発現しているレセプターであることから、そこで、PVLA 固定基板を用いて肝実質細胞の極性及び肝特異的な機能との関係を検討した。その結果、ASGPR は PVLA が存在する培養皿表面に多く発現しており、人工的なガラクトース足場材料により、肝実質細胞の極性がコントロールできることが示唆された。

### ③ 肝実質細胞に適した 3D マイクロ微小環境の作製

アルギン酸ゲルにガラクトース基を付与することを目的に、ガラクトースキトサンを 3D のアルギン酸ゲル表面にコートする方法と、アルギン酸分子にガラクトースを修飾して、アルギン酸ガラクトースゲル(GA-gel)で 3D のゲル構造物を作製する方法を試みた。両者の方法で作製したゲルシート構造物上に肝実質細胞を播種した結果、GA-gel シート上に肝実質細胞は接着した。更に、Figure のように細胞を挟み込む形でサンドイッチ培養を試みた。その結果、胆管側に発現しているトランスポーターの MRP2 が、一部で局在が観察された。

### ④ ヒト羊膜由来上皮細胞の分化誘導法の検討

本研究の 3 次元培養デバイスを有効に利用するにはぜひヒトの細胞を用いる必要がある。そこで、ヒト羊膜由来上皮細胞を肝実質細胞に分化誘導する方法を検討した。その結果、分化誘導後、肝特異的な機能の上昇、ASGPR が発現した。今後、本研究の 3 次元培養デバイスに用いることが期待できる。

### [結論]

本研究では、3D バイオプリンターでの 3 次元ゲル構造物構築技術を用いて、細胞極性が重要な肝実質細胞での 3 次元培養デバイス構築を目指すことに取り組んだ。細胞極性とレセプターの局在性、ガラクトースとそれを認識する ASGPR レセプターに着目し、アルギン酸ガラクトースゲルを用いて検討した。ゲル表面のガラクトース基を介して肝実質細胞接着及び、細胞の極性を制御しつつ肝実質細胞での構造物が構築できる道を示すことができ、今後の 3 次元培養デバイス構築の発展に繋がることを期待される。

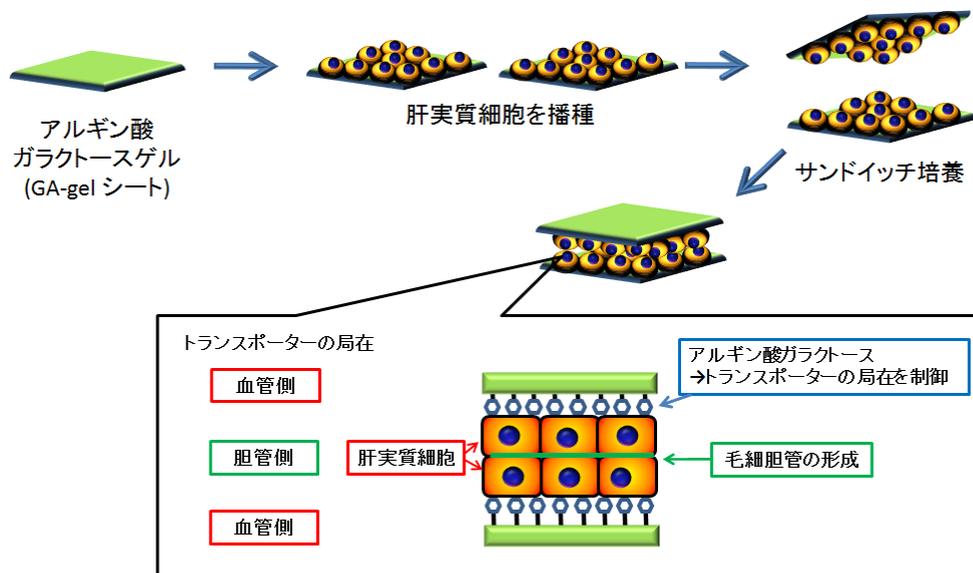


Figure サンドイッチ培養の概略図

アルギン酸ガラクトースゲルシートに肝実質細胞を接着させ、挟み込むように培養して細胞を 2 層に形成する。ガラクトースと接着している部分を血管側、細胞間を胆管側と認識させ、細胞膜のトランスポーターの局在を制御することを目的とした。

## 審査結果の要旨

平成 26 年 8 月 7 日に荒井健一氏の博士学位論文の公聴会を開催し、本学位論文の審査を行った。

本申請者は、組織工学技術を応用し、疾病の治療や医薬品のスクリーニング等への応用する肝組織の 3 次元培養デバイスの開発を目指して研究を行った。肝組織が肝機能を発揮し維持するためには、3 次元培養だけではなく、肝実質細胞の血管側と胆管側という極性を制御する必要があると考え、3 次元で肝実質細胞の極性を制御した 3 次元培養デバイスを作製する方法を検討した。

以下、4 つの章立てで研究内容が報告された。

1 章：3D バイオプリンターの改良及び 3D ゲル構造物の作製：細胞の 3 次元培養環境を人工的に制御するために、研究室で開発してきたインクジェット 3D バイオプリンター装置を改良した。画像をもとに、さらに高さ方向を制御して 3 次元構築できるように改良し、その結果、格段に複雑な 3 次元ゲル構造物の作製ができるようになった。

2 章：人工的な細胞外マトリックス上での肝実質細胞の極性及び肝機能の検討：肝実質細胞培養に有効な足場材料として PVLA[poly(*N-p*-vinylbenzyl-4-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-gluconamide)]に着目した。PVLA はガラクトース基を介して肝実質細胞のアシアロ糖タンパク質レセプター(ASGPR)に特異的に接着する人工ポリマーである。ASGPR は、肝実質細胞の血管側に発現していることから、PVLA 固定基板を用いて肝実質細胞の極性の制御の可能性を検討した。その結果、ASGPR は培養基板側の面に発現していることが確認でき、ガラクトース基を持つ足場材により、肝実質細胞の極性が制御できることが示された。

3 章：肝実質細胞に適した 3D マイクロ微小環境の作製：3D バイオプリンターで用いているアルギン酸ゲルにガラクトース基を付与する方法を複数検討した。アルギン酸分子にガラクトース基を修飾しゲル化させたアルギン酸ガラクトースゲル (GA-gel) が肝実質細胞の接着に優れた材料であることを見出し、そこで、GA-gel 側が血管側、細胞同士が接着する側が胆管側となるように、細胞が接着した GA-gel のシートを 2 枚、細胞付着面同士を合せて、サンドイッチ培養を試みた。その結果、細胞同士が接着する側に胆管側で発現するトランスポーターの MRP2 が、発現しているのが観察され、肝実質細胞の極性制御が可能であることを示すことができた。

4 章：ヒト羊膜由来上皮細胞の分化誘導法の検討：3 次元培養デバイスでは、ヒトの肝実質細胞を用いる必要がある。そこで、ヒト羊膜由来上皮細胞を肝実質細胞に分化誘導する方法を検討した。分化誘導後、肝特異的な機能の上昇、ASGPR の発現も確認できた。

以上をまとめると、1 章で 3 次元構築造物を自在に 3 次元構築する 3D バイオプリンターの改良、2 章で肝実質細胞の極性を制御するガラクトース基材料の有効性の確認、3 章でアルギン酸分子にガラクトース基を修飾した GA-gel の創出を行い、GA-gel で肝実質細胞の極性を制御する有効性を実証したこと、加えて 4 章ではヒト羊膜由来上皮細胞からの誘導でヒト肝実質細胞を得る道にもチャレンジしたことが報告された。

本論文は、肝臓の組織工学に細胞の極性制御という独自の概念を提案し、それに有効な材料を創出し、極性制御の道を実証したものである。今後の組織工学による有効な肝組織 3 次元培養デバイス構築に向っての大きな一歩を創出したと評価できる。

3D バイオプリンターの改良については国際学会で発表するとともに、国際誌に投稿、掲載されたが、2011~2012 年度の IOP 出版の High-light paper に選出されている。他の研究成果につ

いては、早々に論文発表の予定であることを確認した。

以上、本学位論文は博士学位論文として十分な内容を含むものとして、本審査会は、本論文を博士（工学）の学位に値すると判定した。