

筑 波 大 学

博士（医学）学位論文

DA
2004
05009355
(1-1)

再生医工学的バイオ人工肝臓の開発を目的とした
胎仔肝臓細胞の三次元培養

2004

筑波大学大学院人間総合科学研究科

江橋 具

寄贈
江橋 具氏

05009355

略語一覽

AAT	α 1-antitrypsin
AFP	α -fetoprotein
α MEM	minimum essential medium alpha
bFGF	basic fibroblast growth factor
CCI	centrifugal cell immobilization
cDNA	complementary DNA
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
G-6-P	glucose-6-phosphatase
HGF	hepatocyte growth factor
HS	horse serum
IL	interleukin
LIF	leukemia inhibitory factor
OSM	oncostatin M
PBS	phosphate buffered saline
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
PVF	polyvinyl formal
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomal RNA
TGF- α	transforming growth factor- α
TNF- α	tumor necrosis factor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor
WE	Williams' medium E

目 次

略語一覧

第 1 章 緒言	1
1-1. 本研究の目的	1
1-2. バイオ人工肝臓の必要性	1
1-3. 人工肝臓の臨床応用	2
1-4. 組織工学的アプローチによるバイオ人工肝臓の開発	3
1-4-1. 細胞の足場の開発	
1-4-2. バイオ人工肝臓に用いられる細胞	
1-4-3. 細胞の増殖・分化を制御する因子	
第 2 章 マウス胎仔肝臓細胞の培養における基本培地および OSM の影響	8
2-1. 本章の研究目的	8
2-2. 実験方法	9
2-2-1. 胎仔肝臓細胞の取得	
2-2-2. 三次元培養用担体	
2-2-3. 培地と細胞刺激因子	
2-2-4. 培養実験	
2-2-5. DNA の計測法	
2-2-6. 肝細胞特異的機能の計測	
2-2-7. 胎仔肝細胞の分化・成熟度	
2-2-8. 電子顕微鏡による観察	
2-2-9. 統計処理	
2-3. 実験結果	16
2-3-1. DNA 量測定による細胞数計測のための検量線	
2-3-2. 基本培地を用いたマウス胎仔肝細胞の培養	
2-3-2-a. α MEM 培地を用いた培養	
2-3-2-b. WE 培地による培養	
2-3-3. 培地への OSM の添加による効果	
2-3-3-a. α MEM に OSM を添加した培養	
2-3-3-b. WE に OSM を添加した培養	

2-3-4.	培養途中で OSM の添加を停止する培養	
2-3-5.	尿素合成能	
2-3-6.	培養マウス胎仔肝細胞の分化・成熟度の評価	
2-3-7.	電子顕微鏡による観察	
2-4.	考察	40
2-4-1.	マウス胎仔肝臓細胞における OSM の効果	
2-4-2.	バイオ人工肝臓の細胞源	
2-4-3.	三次元培養した成熟肝細胞との比較	
2-4-4.	三次元培養の効果	
2-4-5.	基本培地の種類による影響	
2-5.	小括	47
第 3 章	マウス胎仔肝臓細胞の培養における LIF と VEGF の影響・・・・・・・・	48
3-1.	本章の研究目的	48
3-2.	実験方法	49
3-2-1.	細胞の取得および培養方法	
3-2-2.	細胞の評価方法	
3-2-3.	統計処理	
3-3.	実験結果	50
3-3-1.	WE に LIF を添加した培養	
3-3-2.	WE に VEGF を添加した培養	
3-3-3.	尿素合成能	
3-4.	考察	58
3-5.	小括	61
第 4 章	ブタ胎仔肝臓細胞の三次元培養における刺激因子の影響・・・・・・・・	62
4-1.	本章の研究目的	62
4-2.	実験方法	63
4-2-1.	ブタ胎仔肝臓細胞の取得	
4-2-2.	培養実験	
4-2-3.	DNA 量および肝細胞特異的機能の計測	
4-2-4.	胎仔肝細胞の分化・成熟度	
4-2-5.	電子顕微鏡による観察	
4-2-6.	統計処理	
4-3.	実験結果	67

4-3-1.	DNA 量測定による細胞数計測のための検量線	
4-3-2.	培地に WE を用いた培養	
4-3-3.	WE に OSM を添加した培養	
4-3-4.	WE に LIF を添加した培養	
4-3-5.	WE に cortisol を添加した培養	
4-3-6.	尿素合成能	
4-3-7.	培養ブタ胎仔肝細胞の分化・成熟度の評価	
4-3-8.	電子顕微鏡による観察	
4-4.	考察	83
4-4-1.	ヒト OSM とヒト LIF、および cortisol の影響	
4-4-2.	マウスの細胞とブタの細胞との比較	
4-5.	小括	86
第 5 章	マウス胎仔肝臓細胞の培養における VEGF の分泌	87
5-1.	緒言	87
5-2.	実験方法	89
5-2-1.	胎仔肝臓細胞の取得および培養条件	
5-2-2.	培地中の VEGF の計測	
5-2-3.	培養細胞の観察	
5-2-4.	統計処理	
5-3.	実験結果	91
5-3-1.	培養胎仔肝臓細胞の VEGF 分泌能の経時変化	
5-3-2.	単層培養された細胞の位相差顕微鏡による観察	
5-4.	考察	96
5-4-1.	肝細胞による VEGF の分泌	
5-4-2.	肝再生における VEGF の役割	
5-4-3.	OSM を添加することによる効果	
5-5.	小括	100
第 6 章	総括	101
6-1.	胎仔肝臓細胞の三次元培養	101
6-2.	今後の研究課題	102
引用文献		105

謝辭	117
付記	119

第 1 章 緒言

1-1. 本研究の目的

重篤な肝不全患者の自己肝が再生するまでの期間、患者の荒廃した肝臓の機能を補助できるようなバイオ人工肝臓を開発するためには、人工肝臓の装置内で高密度に培養された肝細胞の代謝機能が長期間にわたって維持される必要がある。しかし、多くのバイオ人工肝臓において使用が前提とされている成熟肝細胞は、生体内では旺盛な増殖能を示すにもかかわらず生体外ではほとんど増殖しないため、装置全体の肝機能が長期間維持できないことが問題となっている。そこで本研究では、生体外でも増殖能を示す胎児期の肝臓細胞をバイオ人工肝臓の開発に応用することを目的として、多孔質樹脂である polyvinyl formal (PVF) 樹脂を担体とした胎仔肝臓細胞の三次元培養を行い、サイトカイン、成長因子やホルモンなどの刺激因子が胎仔肝臓細胞の増殖や成熟に及ぼす影響について検討した。まず、サイトカインの一種である oncostatin M (OSM) が、三次元培養した胎仔肝臓細胞の増殖や肝特異的機能に及ぼす影響について調べた。また、OSM 以外にも胎仔肝臓細胞に効果があると考えられたいくつかの因子を用いた培養も行った。さらに、細胞種の違いによる影響の検討や培養系のスケールアップを目的として、ブタ胎仔肝臓細胞の培養実験を行った。

1-2. バイオ人工肝臓の必要性

劇症肝炎などに代表される肝機能障害に対して、投薬や血液浄化療法などの様々な治療が試みられてきたにもかかわらず、現在でも約 70% という高い致死率にとどまっている (de Groot *et al.*, 1989; 葛西と澤, 1999)。その有効な治療法として肝移植が唯一の方法であるが、ドナー肝の不足はいまだに深刻な問題である。米国では、2001 年に

肝移植の適応となった患者は約 26000 人であり、そのうち移植を受けた患者はわずか 20% にすぎず、一方で 7.7% の患者が死亡したことが報告されている (van de Kerkhove *et al.*, 2004)。日本では 1999 年に脳死移植法が制定されたものの、2003 年までにその実施例は 22 例にとどまっており、脳死肝移植による治療はほとんど期待できない状況にある。以上のことから、重篤な肝機能障害を持つ患者を治療できるような人工肝臓を開発することの意義は大きい。

肝臓は生体の臓器の中で最も多様で複雑な機能を有することから、生体内の化学工場ともいわれる。その機能はタンパクの合成から糖新生まで広範囲であり、大まかに体内の有害物質の除去と生命維持に不可欠な物質の合成の二つに別けられることから (Hori, 1988; Nyberg *et al.*, 1992; Yarmush *et al.*, 1992)、人工肝臓にはこの両方の機能を代行できることが要求される。

1-3. 人工肝臓の臨床応用

人工肝臓の臨床応用は、1950 年代後期に堀らによって世界で初めて行われた。それは肝性昏睡患者の血液の体外灌流回路とイヌの血液の回路を膜を介して交差灌流する方法であり、この治療によって患者の覚醒をみたことが報告された (Hori, 1982, 1988)。しかし、このような生体肝臓や摘出肝を用いた生物学的な人工肝臓の開発はその後あまり行われなくなり、むしろ血液ろ過、吸着や透析に代表されるような純人工的な人工肝臓の開発が主流となった。しかし、純人工的な人工肝臓を用いても救命率はさほど向上しなかったことから、純人工的な手法のみで肝臓の機能を代行することには限界があると考えられるようになった。

一方、1976 年に Seglen によってコラゲナーゼ灌流法による肝細胞の遊離法が確立されたことで、肝細胞の培養法や生化学的機能に関する研究が大きく進歩した (Seglen,

1976)。人工肝臓についても、摘出肝臓ではなく、遊離肝細胞を装置に組み込んだバイオ人工肝臓の開発が 1980 年代後半から国内外で盛んに進められるようになり、とりわけ米国とドイツで臨床応用の前段階としての検討が行われた。1990 年代に入ると、ホローファイバーモジュールの内部にブタ肝細胞、あるいはヒト肝ガン由来の株化細胞を充填した形式のバイオ人工肝臓の臨床応用が開始された (Sussman and Kelly, 1993; Rozga *et al.*, 1993; Sussman *et al.*, 1994; Gerlach, 1996)。これらの人工肝臓は、これまでに急性肝不全患者に 250 例以上も臨床応用され、多くの患者が肝移植、または自己肝の回復にこぎつけたことが報告されている。しかしながら、これらのバイオ人工肝臓は、主に肝移植までの数日間のつなぎ、いわゆる bridge-to-transplant として利用することを目的としているため、深刻なドナー不足を根本的に解決できるような手段にはなり得ない。したがって、患者自身の肝臓が回復するまでの長期間にわたって患者の肝機能を補助できる (bridge-to-recovery) ような人工肝臓の開発が切望されている。

1-4. 組織工学的アプローチによるバイオ人工肝臓の開発

組織工学あるいは再生医工学 (tissue engineering) とは、一般には「工学と医学・生物学の原理を統合することによって、荒廃した生体臓器の機能を再生し、維持し、改善することを目的とする境界領域の学問」であると理解されている (Langer and Vacanti, 1993; 大島, 2000)。その手法を特徴づける因子は、1) 細胞を三次元的に培養するための足場、2) 臓器・組織を再生させるための細胞、3) 細胞の分化・増殖を制御する細胞外マトリクス (extracellular matrix; ECM) や成長因子などのシグナル分子、の 3 つである。

1-4-1. 細胞の足場の開発

臨床応用が可能なバイオ人工肝臓を開発するためには、大量の肝細胞を装置内で高密度に培養する技術が要求される (Ohshima, 1997)。成人の肝臓には 10^{11} 個のオーダーの肝細胞があり、その機能を代行するためには肝臓の 1/10 から 1/3 の肝細胞が必要であると考えられていることから、バイオ人工肝臓のモジュールは 10^{10} 個オーダーの細胞を培養できる必要がある。この細胞を現実的な容積、すなわち数リットル以下の装置で培養するためには、 10^7 cells/cm³ 以上の高密度で肝細胞を培養する技術が必須である (Ohshima *et al.*, 1997)。

高密度に培養した肝細胞の機能を長期間維持できるような装置を開発するための研究は、これまでも数多く報告されている。例えば、肝細胞を単層培養したプレートを積層した積層平板型培養器を用いる方法 (Uchino *et al.*, 1988)、肝細胞をゲルに包埋する培養法 (Cai *et al.*, 1988, 1989)、動物細胞培養用のマイクロキャリアの表面に肝細胞を固定化して培養する方法 (Shnyra *et al.*, 1990, 1991)、さらには透析などに用いられてきたホローファイバー・カートリッジの内部に肝細胞を培養する方法 (Rozga *et al.*, 1993; Nyberg *et al.*, 1993; Sussman *et al.*, 1994) などが挙げられる。これらの肝細胞培養モジュールによって、肝細胞を 10^7 cells/cm³ に近い密度で培養できるようになった。

われわれの研究室では、肝細胞の培養の足場となる担体に多孔質の PVF 樹脂を用いる充填層型リアクターの開発を行ってきた (Yanagi *et al.*, 1992; Miyoshi *et al.*, 1994, 1996, 1998; Ohshima *et al.*, 1997, 1999)。多孔質樹脂は単位体積あたりの表面積 (比表面積) が大きいことから、細胞の高密度培養が可能であるうえに、装置のスケールアップが容易であることなどの利点を持っている。また、PVF 樹脂は、元来は工業用フィルターとして開発されたスポンジ状の樹脂で、その細かい孔が三次元的に連続しており、約 90% という高い空隙率を有している (Yamaji and Fukuda, 1992)。本研究室では、この PVF

樹脂を成熟ラットから遊離した肝細胞の三次元培養用担体として用いることで、 1.2×10^7 cells/cm³-PVF の高密度に固定化できる方法をすでに確立した (Yanagi *et al.*, 1992, Ohshima *et al.*, 1997)。また、三次元培養系においては、肝細胞のアミノ酸代謝能、アルブミン分泌能などの肝特異的機能が 20 日間以上も安定に維持され、通常の肝細胞培養法である単層培養よりもはるかに良好な結果が得られた (Miyoshi *et al.*, 1994, 1996, 1998; 三好と大島, 1998)。しかし、成熟肝細胞は生体外ではほとんど増殖しないことから、培養初期に肝細胞が高密度に固定化されたとしても、固定化細胞数の減少にともなって、培養系全体での細胞活性は次第に減少してしまう。したがって成熟肝細胞を用いる限り、培養細胞の活性を大幅に向上させることは不可能であると考えられた。

1-4-2. バイオ人工肝臓に用いられる細胞

これまで臨床応用されたバイオ人工肝臓の多くはブタ成熟肝細胞を使用している (Demetriou *et al.*, 2004; van de Kerkhove *et al.*, 2002; Mundt *et al.*, 2002)。ブタの肝細胞は大量に入手しやすいこと、肝特異的機能も良好に発現していること、倫理面でのハードルも低いことなどから、現状では最も利用しやすい細胞である。その一方で、1-4-1 項で述べたように、成熟肝細胞は活性が容易に低下することから、ブタ成熟肝細胞を用いたバイオ人工肝臓は bridge-to-transplant としての利用にとどまっている。一方、ヒト由来の細胞を用いたバイオ人工肝臓として、ヒト肝ガン由来細胞 (C3A 細胞) を用いた装置の臨床試験が行われている (Sussman and Kelly, 1993; Sussman *et al.*, 1994; Ellis *et al.*, 1996)。肝ガン由来細胞は培養系における増殖能が高いことから、培養系において長期間にわたって細胞を維持できるという利点がある。しかし、患者の発ガンの可能性や、細胞が装置から脱落して患者の血液に混入する危険性は否定できない。また近年では、正常なヒト肝細胞をバイオ人工肝臓の細胞源とする例が報告されている (Sauer *et al.*, 2002, 2003)。これは、脳死患者の肝臓のうち、脂肪肝や肝硬変などの

et al., 2002, 2003)。これは、脳死患者の肝臓のうち、脂肪肝や肝硬変などの理由で肝移植の移植片としては適さない肝臓から遊離した細胞を利用した装置である。しかし、その供給量には限界があるとともに、培養系において肝細胞を増やすことができないという問題点は未解決のままである。

肝幹細胞や胎児肝細胞などの未分化な細胞は旺盛な増殖能を有するものの、その肝特異的機能を高度に発現させることは困難であると考えられてきた。しかし、最近の再生医療分野の研究の進歩により、胚性幹（ES）細胞や胎仔肝細胞の培養条件を検討することによって細胞の分化・成熟を促し、アルブミン分泌能などの肝特異的機能の発現を誘導できることが報告されている（*Kamiya et al.*, 1999; *Chinzei et al.*, 2002）。したがって、ES 細胞、肝幹細胞あるいは胎児幹細胞などの未分化な細胞をバイオ人工肝臓に適用できる可能性は十分にあると考えられる。

1-4-3. 細胞の増殖・分化を制御する因子

肝細胞の細胞数やその機能を維持するための培養方法については、すでに 1-4-1 項で示したように種々の方法が検討されている。しかし、装置工学的な検討だけでは、大量に培養された肝細胞の活性を維持することには限界があり、細胞の増殖や機能を活性化させる ECM や成長因子のような何らかの生物学的因子を組み合わせる必要がある。

ECM は、細胞の接着や形態、あるいは細胞膜を介した細胞の活性の発現に関与する物質であり、その代表例となるコラーゲンを用いた肝細胞の単層培養の例は早くから試みられてきた。コラーゲン以外に肝細胞の培養に適した ECM としては、肝臓から調製した ECM（*Rojkind et al.*, 1980; *Enat et al.*, 1984; *Jauregui et al.*, 1986）やラミニンを多く含むゲル（*Bissell et al.*, 1987; *Ben-Ze'ev et al.*, 1988, *Lee et al.*, 1993）などがあり、これらのマトリックス上で単層培養された肝細胞は、長期間にわたって肝特

らのマトリックス上で単層培養された肝細胞は、長期間にわたって肝特異的機能を発現することが報告されている。

一方、ホルモンや成長因子などの培地への添加物が培養肝細胞に与える影響についても数多く研究されている。中でも、insulin、dexamethasone、glucagon などに加えて表皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) といった増殖因子の影響が広く研究されており (Jefferson *et al.*, 1984; Nakamura *et al.*, 1989; Waxman *et al.*, 1990; Siddiqui *et al.*, 1999)、これらの因子が肝細胞の増殖や活性の維持に有効であることが報告されている。

サイトカインである interleukin (IL) -6 は、肝再生の際に細胞の増殖を促進する中心的役割を果たす物質であり、IL-6 family のサイトカインである oncostatin M (OSM) も成熟肝細胞の細胞周期を進行させることが見いだされた (Fausto, 2000)。この OSM は、胎仔肝細胞の分化過程において重要な役割を担っていることが近年明らかにされてきた。すなわち、マウス胎仔肝臓細胞の単層培養において、OSM を添加することにより胎仔肝臓の造血機能が消失する一方で、肝機能が向上することが明らかになった (Kamiya *et al.*, 1999, 2001; Miyajima *et al.*, 2000)。これらの研究では、OSM は未成熟肝細胞を分化・成熟させる効果があり、成熟肝細胞に特異的なタンパクの発現が増強することが示された。しかし、三次元培養した胎仔肝細胞に及ぼす OSM の影響はほとんど報告されておらず、OSM を用いて培養した胎仔肝細胞をバイオ人工肝臓へ応用する試みも全く報告されていない。

第2章 マウス胎仔肝臓細胞の培養における基本培地および OSM の影響

2-1. 本章の研究目的

本章では胎仔肝臓細胞をバイオ人工肝臓の細胞源として利用することを目的として、polyvinyl formal (PVF) 樹脂を担体として用いるマウス胎仔肝臓細胞の三次元培養を行った。この際、培地への添加物として、肝細胞の成熟を促進すると考えられている oncostatin M (OSM) を用い、OSM が細胞の増殖や肝特異的機能に及ぼす影響を調べた。

2-2. 実験方法

2-2-1. 胎仔肝臓細胞の取得

実験に用いたマウス胎仔肝臓細胞は、胎生 13~15 日目の C57BL/6 マウス（日本 SLC、静岡）から取得した。妊娠マウスから子宮を摘出し、胎盤を除去したのち羊膜中の胎仔を取り出した。その後、実体顕微鏡下にて胎仔から肝臓を単離し、5% FBS (fetal bovine serum; Gibco BRL、NY) を含んだ Hanks 液 (Hanks' balanced salt solution; Gibco BRL) 中で 22 G の注射針でピペッティングすることにより細胞を分散した。細胞懸濁液は、孔径 70 μm のフィルター (Falcon 2350; Becton Dickinson Labware、NJ) を通すことにより不純物や細胞塊を取り除いた。

取得細胞数および細胞生存率は trypan blue exclusion 法により測定した。

2-2-2. 三次元培養用担体

胎仔肝細胞の培養担体には、多孔質樹脂である PVF 樹脂（カネボウ化成、大阪）を用いた (Yanagi *et al.*, 1992; Miyoshi *et al.*, 1994, 1996, 1998; Ohshima *et al.*, 1997, 1999)。

平均孔径 100 μm （空隙率約 90%）の PVF 樹脂を 2×2×2 mm の立方体状に細切して 100 個ずつ遠心ボトルに入れ、オートクレーブにて滅菌したのち、0.06% コラーゲン (Cellgen 1-PC; 高研、東京) に半日以上浸潤させることによりコラーゲンコートした。これらの担体を PBS (-) (phosphate buffered saline; 日水製薬、東京)、Hanks 液および血清添加培地により系列的に洗浄して培養に用いた。

2-2-3. 培地と細胞刺激因子

細胞の培養には minimum essential medium alpha (Gibco BRL) を基本とした培地 (α MEM) と Williams' medium E (Gibco BRL) を基本とした培地 (WE) の 2 種類を用

いた。これらの培地のうち、minimum essential medium alpha には血球系細胞の分化やコロニー形成を誘導する因子として知られる dexamethasone ($0.1 \mu\text{M}$, Sigma, MO) を添加し、FBS (10%)、horse serum (HS; 10%, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) および抗生物質 (0.5%, antibiotic-antimycotic, Gibco BRL) を加えた (α MEM) (Miyoshi *et al.*, 2000)。また Williams' medium E には、肝細胞の肝特異的機能を亢進する作用も持つ dexamethasone ($0.1 \mu\text{M}$) と insulin ($0.1 \mu\text{M}$, Sigma)、細胞の接着を促進する aprotinin (5000 KIU/L, Sigma)、FBS (10%) および抗生物質 (0.5%) を加えた (WE) (Yanagi *et al.*, 1992)。

胎仔肝臓細胞の刺激因子として、マウス OSM (10 ng/mL , Sigma) を培地に添加して培養を行った。

2-2-4. 培養実験

胎仔肝臓細胞の培養実験は、PVF 樹脂を担体とする三次元培養と、対照として通常の培養方法であるディッシュを用いる単層培養を行った。単層培養では、0.06% コラーゲンでコートした直径 35 mm のディッシュ (Falcon 1008) に、 $0.19 \sim 1.00 \times 10^6$ 個の細胞を懸濁した血清添加培地 (2.0 mL) を滴下することにより播種した。三次元培養においては、PVF 樹脂担体への細胞の播種は、Yang らによって開発された、遠心操作を用いる centrifugal cell immobilization (CCI) 法により行った (Yang *et al.*, 2001)。この方法では、担体 100 個 (体積 0.8 cm^3) を入れた遠心ボトル (直径 27 mm、高さ 80 mm、アシスト、東京) に、所定量 ($0.39 \sim 4.72 \times 10^7$ 個) の遊離胎仔肝臓細胞を懸濁した培地 (5 mL) を入れ、このボトルを $300 \times g$ で 1 分間遠心処理した。その後、担体に付着せずボトル底部に沈殿した細胞を軽く振とうすることにより再懸濁し、再度、遠心操作を行った。これらの遠心と再懸濁の操作を 6 回繰り返すことによって、担体に細胞を

播種した。CCI 法による細胞の播種効率は、 $63.4 \pm 4.7\%$ （平均値 \pm 標準偏差、 $n=26$ ）であった。

細胞を播種した PVF 樹脂は 50 個（体積 0.4 cm^3 ）ずつ直径 35 mm のディッシュ（Falcon 1008）に移し、2.5 mL の培地を加えて培養を行った。細胞が良好に増殖した場合には、50 個の PVF 樹脂を直径 60 mm のディッシュ（Falcon 1007）に移し換え、培地を 8 mL 添加して培養を行った。三次元培養、単層培養ともに 37°C 、5% CO_2 の条件で培養し、培地交換は週 2 回行った。培地交換の際には培地をサンプリングし、肝特異的機能を計測するまでの期間、 -80°C で保存した。

2-2-5. DNA の計測法

三次元培養系においては、固定化された細胞を担体から剥離して細胞数を計測することは困難である。そこで、培養期間中の細胞数の指標として、Hoechst 33342 を用いた DNA 量の測定を行った（Lydon *et al.*,1980;Sriram *et al.*,1992）。Hoechst 33342 は DNA の AT 配列に特異的に結合する蛍光色素であり、その蛍光強度を測定することによって全細胞の DNA 量を求めることができる。

単層培養の細胞数を求める場合には培養ディッシュに 0.05 U/mL のプロナーゼ溶液（pronase、Sigma）を 1 mL、また三次元培養の場合には PVF 樹脂 10 個を試験管に入れてプロナーゼ溶液を 2 mL 加え、それぞれ 37°C で 1 時間以上静置した。次に、単層培養では、ディッシュの細胞をセルスクレイパーで剥離したのちプロナーゼ溶液ごと試験管に移し、さらに 1 mL のプロナーゼ溶液を加えてディッシュを洗浄したのち、この溶液も試験管に移した。単層培養と三次元培養から得られたこれらの試験管内の細胞は、超音波破碎機によって破壊されたのち、この懸濁液 200 μL を 2 mL の Hoechst 33342 溶液（Hoechst 33342 solution;10 μM ，同仁化学研究所、熊本）に添加して DNA に蛍光色素

を結合させた。この溶液の蛍光強度を分光蛍光光度計（励起光 348 nm、入射光 452 nm; FP-6300, 日本分光株式会社、東京）で計測した。なお、DNA 量の計測における検量線は、既知量のサケ精子由来の DNA（Sigma）と既知数の細胞を用いて作製した。

2-2-6. 肝細胞特異的機能の計測

肝細胞により培地中に分泌されたアルブミンの濃度は、サンドイッチ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を用いて測定した (Miyoshi *et al.*, 1996, 1998)。測定 of 1 次抗体には goat IgG fraction to rat albumin (ICN Pharmaceuticals, CA)、2 次抗体には peroxidase-conjugated sheep IgG fraction to rat albumin (ICN Pharmaceuticals) を用いた。

まず初めに、1 次抗体 (100 μ L/well) で 96 穴のプレート (Coster 3590; Coster, NY) をコートし、4°C にて 1 晩静置した。ブロッキングは、4 倍に希釈した Block Ace (150 μ L/well, 大日本製薬、大阪) を加えて、37°C で 3 時間インキュベートすることにより行った。次に、既知濃度のアルブミン標準液および -80°C にて保存しておいた培地上清サンプル (200 μ L/well) の吸着を行った。このとき、標準液には 200 ng/mL のマウスアルブミン (ICN Pharmaceuticals) を用い、段階的に希釈したサンプルとともに 4°C で 1 晩静置した。その後、2 次抗体 (100 μ L/well) を加えて室温で 2 時間吸着させた。ここまでの過程において、各々のステップごとに Tween 20 (1% (v/v); 和光純薬工業、大阪) を含む PBS でプレートを洗浄した。最後に発色反応の基質となる 2.5 g/L のオルトフェニレンジアミン 2 塩酸塩と 30% 過酸化水素水 (0.5 mL/L) を含むクエン酸バッファー (pH 7.4; 100 μ L/well) を加え、暗所、室温にて約 20 分反応させたのち、8 N 硫酸 (50 μ L/well) を添加して反応を停止させた。このプレートの 490 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Biomek Plate Reader; Beckman, CA) で測定し、サンプ

ル中のアルブミン濃度を求めた。

また、肝細胞により培地中に分泌された尿素の濃度は、尿素窒素測定キット（尿素窒素 B-テスト；和光純薬工業）を用いて測定した。

2-2-7. 胎仔肝細胞の分化・成熟度

培養胎仔肝臓細胞の分化・成熟度は、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて調べた。単層培養および三次元培養した細胞から Isogen（ニッポンジーン、東京）を使用して total RNA を抽出し、0.7 μ g の total RNA から Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR（Invitrogen、CA）を用いて逆転写して（42°C 50 分）complementary DNA (cDNA) を作製した。その後、これらの cDNA を鋳型として Taq DNA polymerase（Gibco）を用いて PCR を行い、cDNA を増幅した。このとき用いたプライマー配列を表 2-1 に示す。また PCR 反応には GeneAmp PCR system 2400（Perkin Elmer、MA）を用い、94°C 30 秒 → 58°C 30 秒 → 72°C 30 秒の操作を 20~35 サイクル行い、PCR 産物は 1.2%アガロースゲル（和光純薬工業）にて展開して、紫外線照射のもとで撮影した。

2-2-8. 電子顕微鏡による観察

培地交換の際に中性緩衝ホルマリンで固定保存した PVF 樹脂は、定法にしたがってオスミウムで再度固定したのち、脱水、乾燥し、金／パラジウムで蒸着した（Yanagi *et al.*, 1992）。これらの試料を走査型電子顕微鏡（JSM-6320F; 日本電子、東京）を用いて観察した。

表 2-1. RT-PCR に用いたプライマー配列

α -fetoprotein	5' -ACA GGA GGC TAT GCA TCA CC- 3'
	5' -TGG ACA TCT TCA CCA TGT GG- 3'
albumin	5' -CGA GAA GCT TGG AGA ATA TGG- 3'
	5' -GTC AGA GCA GAG AAG CAT GG- 3'
glucose-6-phosphatase	5' -TGC ATT CCT GTA TGG TAG TGG- 3'
	5' -GAA TGA GAG CTC TTG GCT GG- 3'
α 1-antitrypsin	5' -TCG ATC CTA AGC ACA CTG AGG- 3'
	5' -GGC TTG TAA GAC TGT AGC- 3'
β -actin	5' -TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC- 3'
	5' -GAT CCA CAT CTG CTG GAA GG- 3'

2-2-9. 統計処理

全ての実験結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で示した。培養 1 日目との比較は paired t-test により、また培地の違いによる比較は student's t-test により、危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意水準とした。

2-3. 実験結果

本研究では、PVF 樹脂を担体とする胎仔肝臓細胞の三次元培養と、対照としてのコラーゲンコート・ディッシュによる単層培養を異なる培地条件下で並行して行い、基本培地やサイトカインなどの刺激因子が細胞の増殖や肝特異的機能の発現に及ぼす影響について検討した。胎仔肝臓細胞の培養には、基本培地として α MEM と WE の 2 種類の培地を用い、これらに OSM を添加した培養を行った。また、細胞の播種密度の影響を調べるために、それぞれの培養実験において、高密度と低密度の 2 通りの播種密度を設定した（表 2-2）。

2-3-1. DNA 量測定による細胞数計測のための検量線

本研究では、培養細胞の細胞数を測定するため、Hoechst 33342 を用いて DNA 量を計測したのち細胞数に換算した。この方法の妥当性を確かめるために、まず遊離直後の胎仔肝臓細胞を用いて細胞数と DNA 量の相関を調べた結果を図 2-1 に示す。検量線を作成した結果、細胞数と DNA 量との間には良好な直線関係があったことから、DNA 量を測定することによって細胞数を算出できることが確認できた。また、この直線の傾きから、 1×10^6 個の細胞には約 $11.3 \mu\text{g}$ の DNA が含まれていることがわかった。

2-3-2. 基本培地を用いたマウス胎仔肝細胞の培養

胎児期の肝臓は、肝機能の他に造血器官としての機能も持ち合わせている。そこで本章では、肝細胞の培養に広く用いられている WE と、造血系細胞の培養にしばしば使用される α MEM を基本培地として用いた。

表 2-2. 基本培地を用いた培養における播種条件

培養条件	培地	播種密度	播種細胞数*
単層培養	αMEM	高密度 (H)	1.00 (n=6)
	WE	高密度 (H)	0.96 (n=4)
		低密度 (L)	0.19 (n=3)
三次元培養	αMEM	高密度 (H)	16.2 (n=6)
	WE	高密度 (H)	23.6 (n=4)
		低密度 (L)	1.94 (n=3)

* 単層培養 [10^6 cells/dish]

三次元培養 [10^6 cells/ 0.4 cm^3 -PVF]

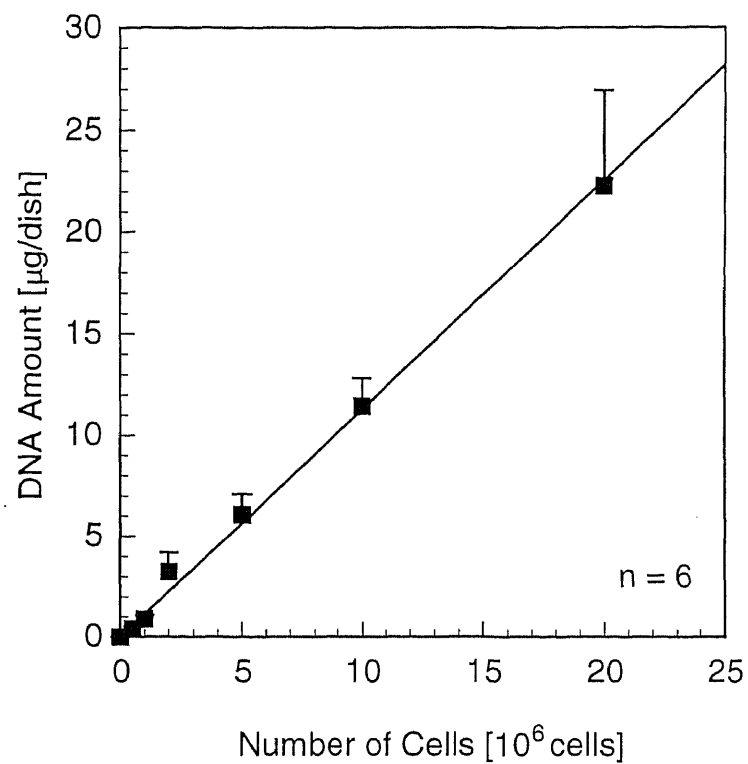


図 2-1. 遊離直後の胎仔肝臓細胞を用いた DNA 測定法の検量線

遊離直後のマウス胎仔肝臓細胞を用いて検量線を作成した結果、 1×10^6 個の細胞には約 11.3 μg の DNA が含まれていることがわかった。(Mean \pm SEM)

2-3-2-a. α MEM 培地を用いた培養

まず、 α MEM を用いて胎仔肝臓細胞の培養を行ったときの細胞播種条件を表 2-2 に示す。また、これらの実験における DNA 量の経時変化を図 2-2 に、肝細胞のアルブミン分泌量の経時変化を図 2-3 に示す。なお、DNA 量の経時変化を示したグラフの縦軸は、ディッシュ内で培養された細胞の全 DNA 量を示している。すなわち、単層培養では 35 mm のディッシュ 1 枚、三次元培養では PVF 樹脂 50 個、つまり 0.4 cm³（以後、これらを培養単位と呼ぶ）に固定化されているすべての細胞の DNA 量を示している。またアルブミン分泌量の結果についても、培養単位内の全細胞によるアルブミンの分泌量を 1 日あたりの分泌量に換算して示した。

培地に α MEM を用いた培養では、単層培養、三次元培養のいずれの培養においても細胞は良好に増加した（図 2-2）。単層培養（●）では培養開始直後に細胞が増加して培養開始時の 2 倍以上に達し、その後も細胞数は良好に維持された。三次元培養（■）でも DNA 量は徐々に増加して、およそ 35 μ g/dish に達した。

このときの肝細胞のアルブミン分泌量の経時変化を図 2-3 に示す。単層培養（●）では培養初期に細胞が増殖したにもかかわらず、アルブミン分泌量は急激に低下して、培養 2 週間以降はほとんど分泌されなかった。一方、三次元培養（■）では細胞が増殖していた期間、すなわち培養開始後 2 週間は分泌量が徐々に減少し、培養 16 日目には約 80 ng/day/dish の値にまで低下した。しかし、細胞の増殖速度が緩やかになるにつれて徐々に分泌量は増加する傾向が見られ、培養終了時には約 120 ng/day/dish の活性が認められた。

2-3-2-b. WE 培地による培養

肝細胞の培養に広く用いられている WE 培地を用いて同様の培養実験を行ったとき

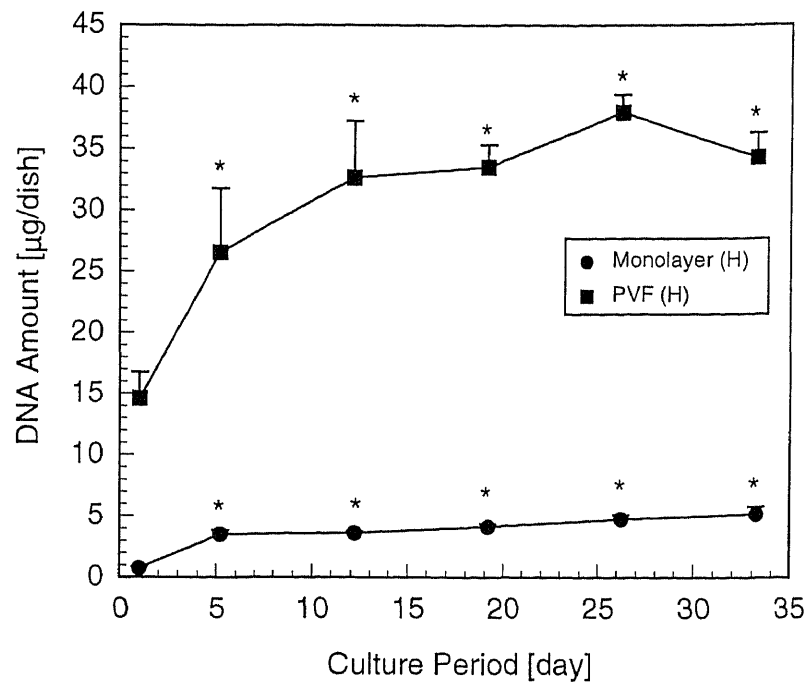


図 2-2. 培地に α MEM を用いた培養における DNA 量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=6; ■, 三次元培養 (高密度), n=6

培地に α MEM を用いた場合には、いずれの培養においても細胞は良好に増殖した。
(Mean \pm SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

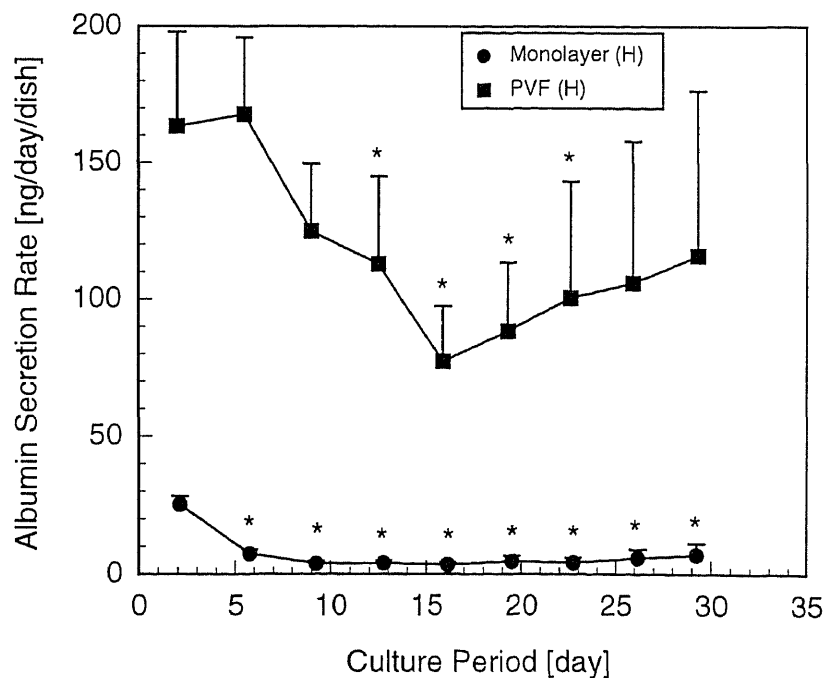


図 2-3. 培地に α MEM を用いた培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=6; ■, 三次元培養 (高密度), n=6

培地に α MEM を用いた場合には、三次元培養においてアルブミン分泌量が比較的良好に維持された。(Mean \pm SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

の、細胞の播種条件を表 2-2 にあわせて示す。また、DNA 量の経時変化を図 2-4 に、アルブミン分泌量の経時変化を図 2-5 に示す。

培地に WE を用いた場合には、単層培養（●、○）では細胞数は良好に維持され、培養後半にはわずかに増殖した。三次元培養（■）では DNA 量は徐々に減少し、培養開始時には約 10 $\mu\text{g}/\text{dish}$ であった DNA 量が培養終了時にはおよそ 4 $\mu\text{g}/\text{dish}$ にまで減少した。アルブミン分泌量については、単層培養（●、○）では培養開始直後から急激に低下して、培養 2 週間目以降はほとんどアルブミンは分泌されなかった。三次元培養でも、低密度に播種した場合（□）にはほとんどアルブミンは分泌されなかった。それに対して、高密度に播種したもの（■）では、培養開始直後は急激にアルブミン分泌量が低下して 10 日目には培養開始時の 1/2 以下になったものの、その後は培養終了時まで 400 ng/day/dish 以上の活性が良好に維持された。

これまでに述べた、基本培地（ αMEM と WE）を用いた培養の結果から、単層培養ではいずれの培地を用いた場合にも DNA 量を維持することができたが、アルブミン分泌量は急激に低下した。一方、PVF 樹脂を用いた三次元培養では、培地に WE を用いた場合には DNA 量は徐々に低下したものの、 αMEM を用いた場合には細胞数は良好に増加した。また αMEM と WE は細胞の活性に及ぼす影響が異なることも確認された。すなわち、細胞の増殖に関しては WE よりも αMEM の方が良好であったのに対して、単位細胞数あたりのアルブミン分泌量については WE 培地を用いた方が良好に維持される傾向があった。例えば、三次元培養（■）において、培養 25 日目の DNA 量は WE では約 7 $\mu\text{g}/\text{dish}$ であるのに対して αMEM では約 35 $\mu\text{g}/\text{dish}$ であった。しかしながら、その時点でのアルブミン分泌量は WE では 400 ng/day/dish 以上の活性が得られたが、 αMEM では約 100 ng/day/dish と WE の 1/4 以下であった。したがって、単位細胞数あ

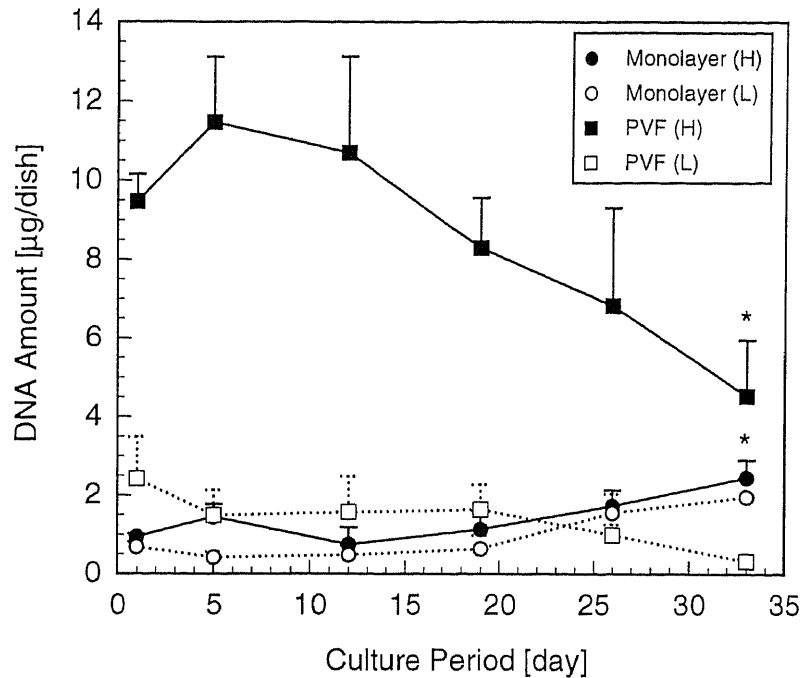


図 2-4. 培地に WE を用いた培養における DNA 量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=4; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=4; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE を用いると、単層培養では DNA 量が増加したものの三次元培養では徐々に減少する傾向が見られた。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

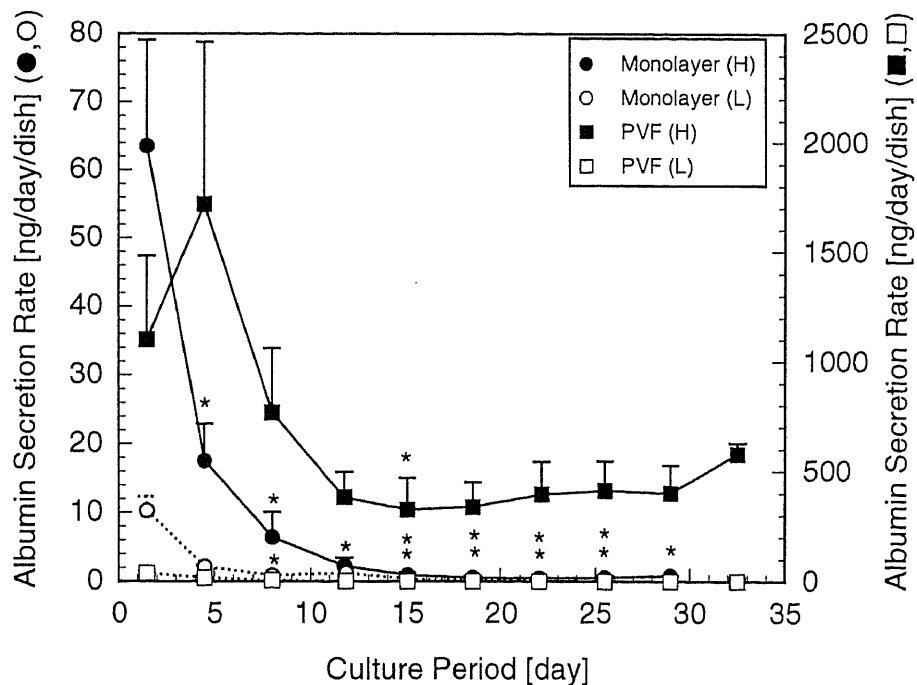


図 2-5. 培地に WE を用いた培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=4; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=4; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE を用いた場合、三次元培養で高密度に播種したもの (■) でアルブミン分泌量は培養初期に著しく低下したものの、その後は安定した分泌活性を維持した。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

たりの活性は WE の方が 20 倍以上も高いことがわかった。

2-3-3. 培地への OSM の添加による効果

胎仔肝臓細胞の培養において、 α MEM および WE は、細胞の増殖と活性の発現に関してそれぞれ長所と短所があり、これらを両立するような満足すべき結果は得られなかった。そこで次に、OSM を添加した培地を用い、OSM が細胞の増殖や活性に及ぼす影響について検討した。

2-3-3-a. α MEM に OSM を添加した培養

まず、 α MEM に OSM を添加した培地 (α MEM+OSM) を用いた培養を行った。このときの播種条件を表 2-3 に、また DNA 量の経時変化を図 2-6 に示す。

細胞の DNA 量については、単層培養において高密度に播種した場合 (●)、培養開始時に約 1 μ g/dish であった DNA 量が培養 2 週間目には約 8 μ g/dish にまで増加し、その後も安定に維持された。この値は、培地に OSM を添加しなかった場合 (図 2-2、約 6 μ g/dish) よりもわずかに高い値であった。一方、三次元培養では、高密度に播種した場合 (■) には培養開始直後に DNA 量が急激に増加したものの、その後は徐々に低下した。DNA 量が最大となった培養 12 日目の値は、OSM を添加しなかった培養

(図 2-2) の最大値とほぼ同等であったが、最大値に達するまでの期間は α MEM+OSM を用いた場合の方が短かったことから、OSM を添加することにより細胞の増殖速度が高まったことがわかった。三次元培養で細胞を低密度に播種した場合 (□) には、培養 19 日目に DNA 量が増加した。これらの DNA 量を高密度に播種したもの (■) と比較すると、培養 1 日目には高密度の約 1/5 であった DNA 量が培養終了時には約 1/2 にまで上昇していたことから、OSM を添加した培養では低密度に播種した条件下でも十分

表 2-3. Oncostatin M 添加培地を用いた培養における播種条件

培養条件	培地	播種密度	播種細胞数*
単層培養	α MEM+OSM	高密度 (H)	1.00 (n=3)
		低密度 (L)	0.20 (n=3)
	WE+OSM	高密度 (H)	1.00 (n=3)
		低密度 (L)	0.20 (n=3)
三次元培養	α MEM+OSM	高密度 (H)	20.8 (n=3)
		低密度 (L)	2.00 (n=3)
	WE+OSM	高密度 (H)	21.7 (n=3)
		低密度 (L)	2.50 (n=3)

* 単層培養 [10^6 cells/dish]

三次元培養 [10^6 cells/ 0.4 cm^3 -PVF]

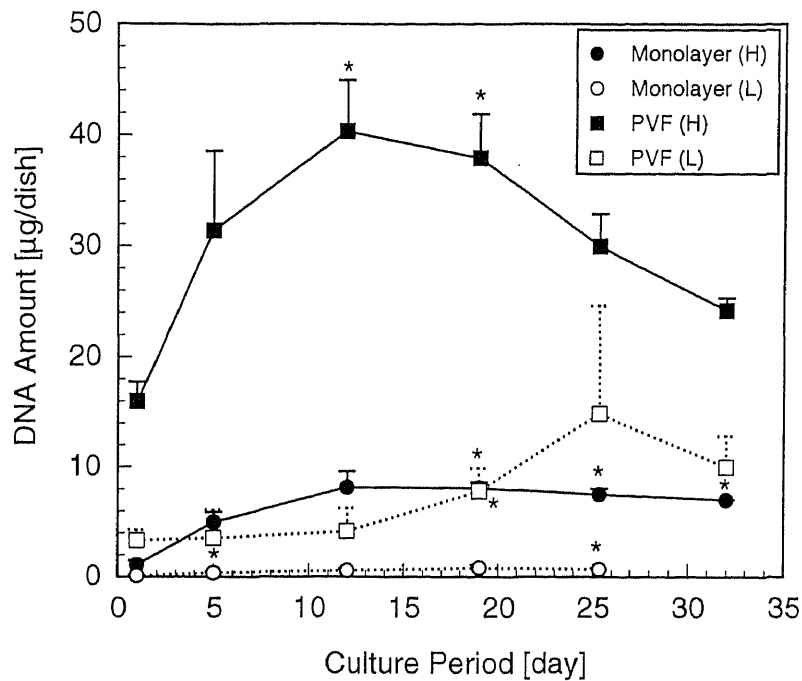


図 2-6. 培地に α MED+OSM を用いた培養における DNA 量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), $n=3$; ○, 単層培養 (低密度), $n=3$
 ■, 三次元培養 (高密度), $n=3$; □, 三次元培養 (低密度), $n=3$

培地に α MED+OSM を用いると、単層培養では DNA 量が増加し、三次元培養でも OSM を添加しなかった場合に比べて速い速度で細胞が増殖した。(Mean \pm SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

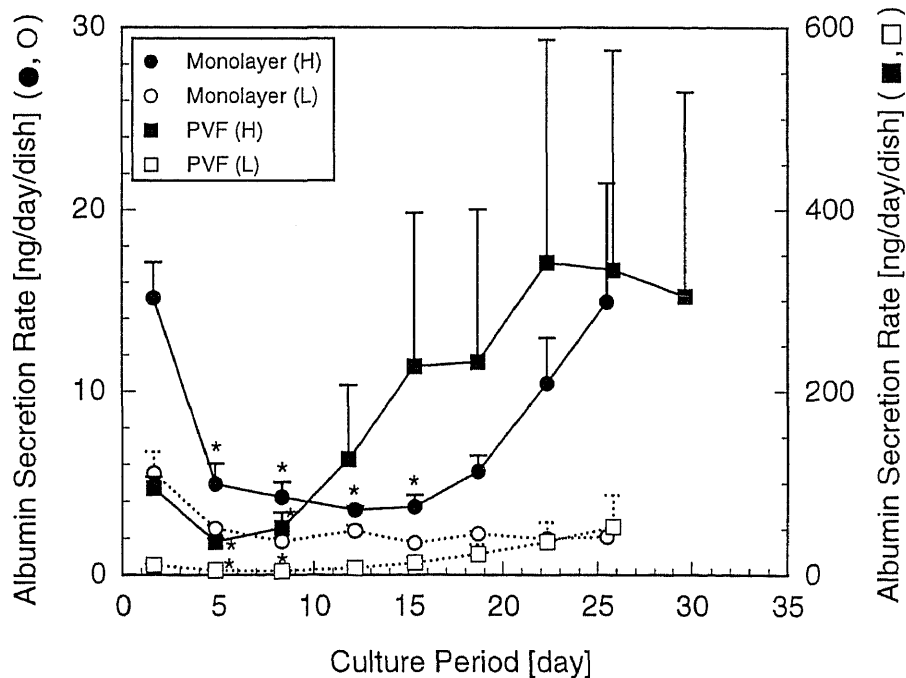


図 2-7. 培地に α MED+OSM を用いた培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), $n=3$; ○, 単層培養 (低密度), $n=3$
 ■, 三次元培養 (高密度), $n=3$; □, 三次元培養 (低密度), $n=3$

培地に OSM を添加すると単層培養、三次元培養ともに高密度に播種した培養において培養後期にアルブミン分泌量が増加する傾向が見られた。また三次元培養の低密度に播種したものでも、アルブミン分泌活性は増加した。(Mean \pm SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

に細胞が増殖する傾向が示された。

アルブミン分泌量の経時変化を図 2-7 に示す。単層培養では細胞を低密度に播種した場合（○）には、培養期間を通じてほとんどアルブミンは分泌されなかった。しかし、高密度に播種した場合（●）には、培養初期は OSM を添加しなかった場合と同様に分泌量が低下したものの、細胞数が一定になった 3 週間目からは分泌量が急激に回復した。一方、三次元培養では、高密度に播種した場合（■）には細胞が増殖している時点（培養 5 日目）からアルブミン分泌の活性は上昇する傾向を示し、培養 4 週目には約 350 ng/day/dish の活性が認められた。さらに細胞を低密度に播種した場合（□）にも、 α MEM+OSM では培養終了時点で培養 1 週間目の約 10 倍の分泌量が認められ、活性はさらに上昇を続ける傾向がみられた。したがって、OSM は細胞の増殖だけでなく、アルブミン分泌能の発現にも有効であることがわかった。

2-3-3-b. WE に OSM を添加した培養

WE 培地に OSM を添加した培地（WE+OSM）を用いた培養実験における培養条件を表 2-3 に、このときの DNA 量の経時変化を図 2-8 に示す。単層培養においては、高密度に播種した場合に（●）培養 2 週間目に DNA 量がわずかに増加し、その後も安定に維持される傾向があった。三次元培養では高密度（■）、低密度（□）のいずれの播種条件においても培養開始時から細胞が良好に増殖し、高密度の培養においては培養終了時の DNA 量は培養開始時の 7 倍にまで達した。低密度に播種した場合でも、培養終了時には高密度に播種したものの 1/3 以上の DNA 量に達した。これらの結果を、OSM を添加しなかった場合（図 2-4）と比較すると、いずれの培養条件下においても、OSM を添加しなかった場合よりも DNA 量は増加していた。三次元培養では OSM を添加しないと DNA 量は減少する傾向を示したのに対して、OSM を添加すると DNA 量は良好

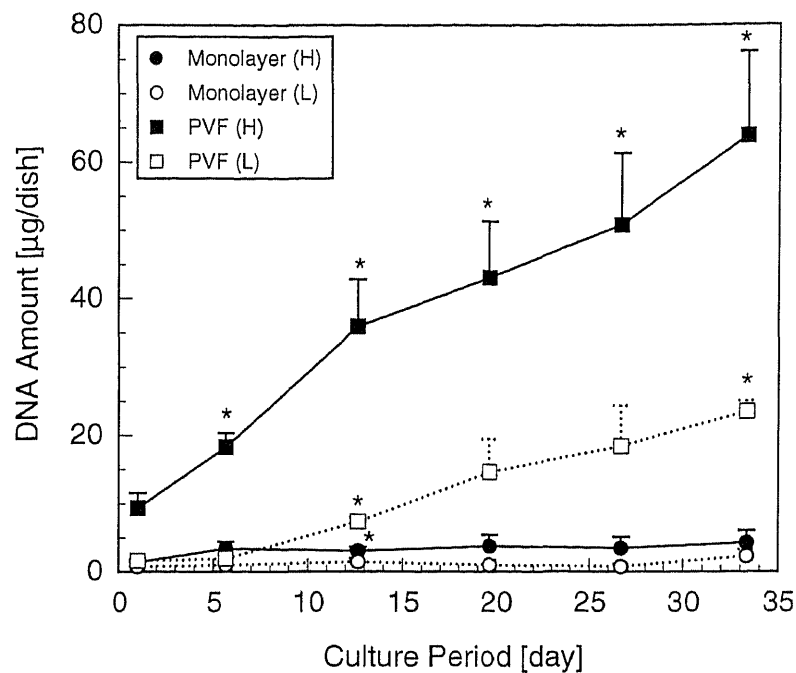


図 2-8. 培地に WE+OSM を用いた培養における DNA 量の経時変化

- , 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3
 ■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+OSM を用いると DNA 量は良好に増加し、特に三次元培養において一定の割合で上昇した。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

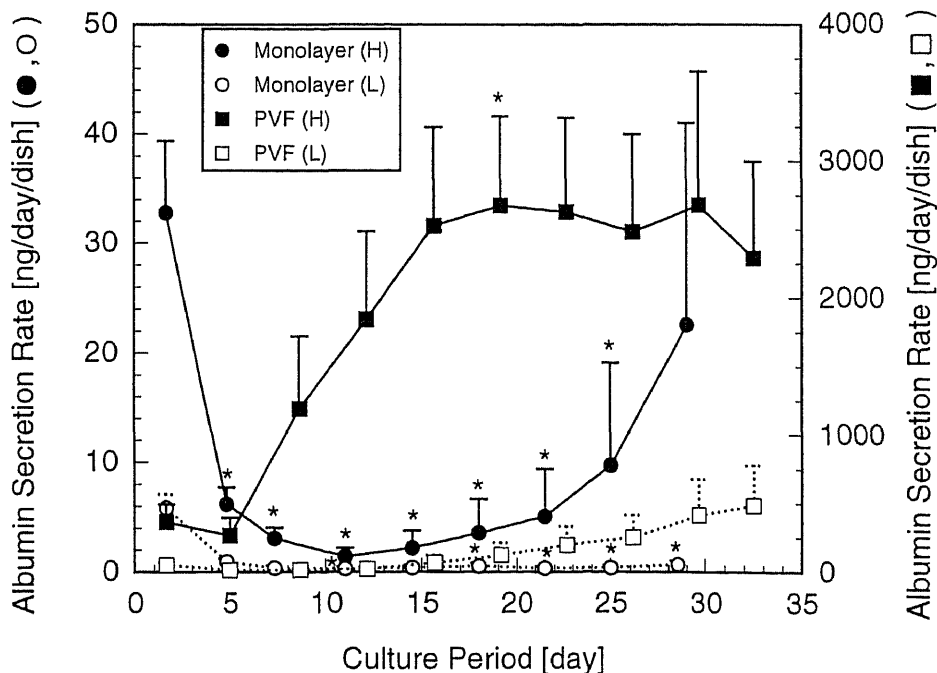


図 2-9. 培地に WE+OSM を用いた培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

- , 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3
 ■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+OSM を用いるとアルブミン分泌量は急激に上昇し、三次元培養の高密度に播種したものでは 2.5 μg/day/dish 以上の分泌量が得られた。また三次元培養では低密度に播種したものでも培養後期に活性が上昇する傾向が見られた。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

に増加し、培養終了時には OSM を添加しなかった場合の 10 倍以上の値が得られたことから、OSM が細胞の増殖に極めて有効であることが示された。

アルブミン分泌量の経時変化を図 2-9 に示す。単層培養で細胞を高密度に播種したものの (●) では、培養 10 日目以降に次第に活性が回復する傾向が見られた。しかし、低密度に播種した場合 (○) には、OSM を添加しなかった場合と同様にアルブミンはほとんど分泌されなかった。一方、三次元培養においては OSM を添加することによって著しくアルブミン分泌能が改善された。高密度に播種した場合 (■) には、培養 5 日目頃から急激に活性が上昇して、培養 3 週間目以降は OSM を添加しなかった場合

(図 2-5) の 6 倍を超える $2.5 \mu\text{g/day/dish}$ 以上の分泌量が培養終了時まで良好に維持された。さらに、細胞を低密度に播種した場合 (□) にも、培養 5 日目から活性が次第に上昇する傾向を示し、培養終了時には培養初期の活性の約 35 倍に達した。したがって、基本培地として WE を用いた場合にも、OSM は細胞の増殖と活性の上昇に非常に有効であり、とりわけ三次元培養においては細胞を低密度に播種した場合にもアルブミン分泌能を亢進することがわかった。

ここまでの培養実験で得られた、それぞれの培地や OSM が胎仔肝臓細胞の増殖や肝特異的機能であるアルブミン分泌能に及ぼす影響を表 2-4 にまとめて示す。これは培養 4 週間目の三次元培養で高密度に播種した場合の結果である。

基本培地を用いた培養では、細胞の増殖には αMEM が適していたのに対し、アルブミン分泌能は WE を用いた方が高い傾向を示した。次に、OSM を添加した培養では、基本培地に WE を用いた場合に細胞の増殖やアルブミン分泌能が著しく改善された。このときのアルブミン分泌能は、基本培地による培養よりも 1 桁近く高い活性が長期間にわたって安定して維持された。

表 2-4. 培地条件が細胞の増殖能や機能に及ぼす影響
(三次元培養 (高密度))

	OSM (-)	OSM (+)
DNA量 [$\mu\text{g}/\text{dish}$]		
αMEM	37.98 ± 1.27	$30.02 \pm 2.89^*$
WE	$6.83 \pm 2.15^\dagger$	$50.86 \pm 10.55^*$
アルブミン分泌量 [$\text{ng}/\text{day}/\text{dish}$]		
αMEM	113.80 ± 57.87	333.60 ± 57.87
WE	412.76 ± 134.40	$2482.23 \pm 714.66^{*\dagger\dagger}$

* $p < 0.05$ vs. OSM (-)

$^\dagger p < 0.05$ vs. αMEM

$^{\dagger\dagger} p < 0.05$ vs. αMEM+OSM

以上の結果から、胎仔肝臓細胞の肝特異的機能の一つであるアルブミン分泌能を発現させるための基本培地としては WE が有効であることがわかったため、以下の実験では WE を基本培地に用いた。

2-3-4. 培養途中で OSM の添加を停止する培養

これまでの結果から、OSM は胎仔肝臓細胞の増殖や活性の発現に対する強力な刺激因子であることがわかった。しかし、OSM は前述の通り、IL-6 family のサイトカインであることから、OSM が体内に入れば炎症反応を誘起する可能性がある。つまり、OSM を含む培地により培養された肝細胞をそのまま利用したバイオ人工肝臓を臨床応用することは、患者に何らかの悪影響を与える可能性が高い。したがって、このような細胞を用いた人工肝臓を臨床応用するためには、使用前の一定期間 OSM を含まない培地で培養することにより培養系の OSM を除去しておく必要がある。

そこで本項では、まず WE+OSM を用いて胎仔肝臓細胞を増殖させ、その後に培地を WE に交換する実験を行うことで細胞の活性がどのように変化するかを調べた。

本実験での細胞の播種条件を表 2-5 に示す。この実験においても、2-3-2 項や 2-3-3 項で述べた培養実験と同様に、単層培養と三次元培養のそれぞれにおいて高密度と低密度の 2 通りの播種条件で培養を行った。また培地に WE+OSM を用いた三次元培養ではアルブミン分泌量が培養 2 週間以降に安定したことから（図 2-9）、本実験では培養 14 日目に培地を WE+OSM から WE に変更した。対照として、WE+OSM で引き続き培養を行った実験も並行して行った。これらの実験におけるアルブミン分泌量の経時変化を図 2-10 と図 2-11 に示す。単層培養では（図 2-10）、細胞を高密度に播種したもので、培地を WE+OSM から WE に変更しても（○）、変更しなかったもの（●）と比較し

表 2-5. 培養途中で oncostatin M を除いた培養における播種条件

培養条件	培地	播種密度	播種細胞数*	培地変更日 [day]
単層培養	WE+OSM→WE	高密度 (H)	1.00 (n=4)	14.3
		低密度 (L)	0.20 (n=3)	13.7
三次元培養	WE+OSM→WE	高密度 (H)	20.8 (n=4)	14.3
		低密度 (L)	2.00 (n=3)	13.7

* 単層培養 [10^6 cells/dish]

三次元培養 [10^6 cells/ 0.4 cm^3 -PVF]

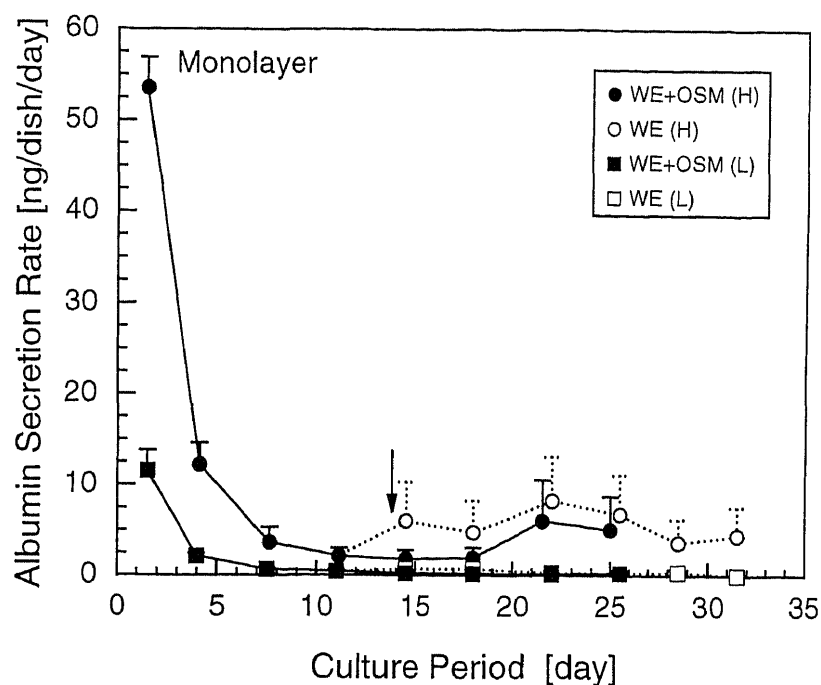


図 2-10. 培養途中で培地を WE+OSM から WE に変更した単層培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, WE+OSM (高密度), n=3; ○, WE (高密度), n=3

■, WE+OSM (低密度), n=3; □, WE (低密度), n=3

培養約 14 日目に培地を WE+OSM から WE に変更してもアルブミン分泌量はほとんど変化しなかった。
(Mean ± SEM)

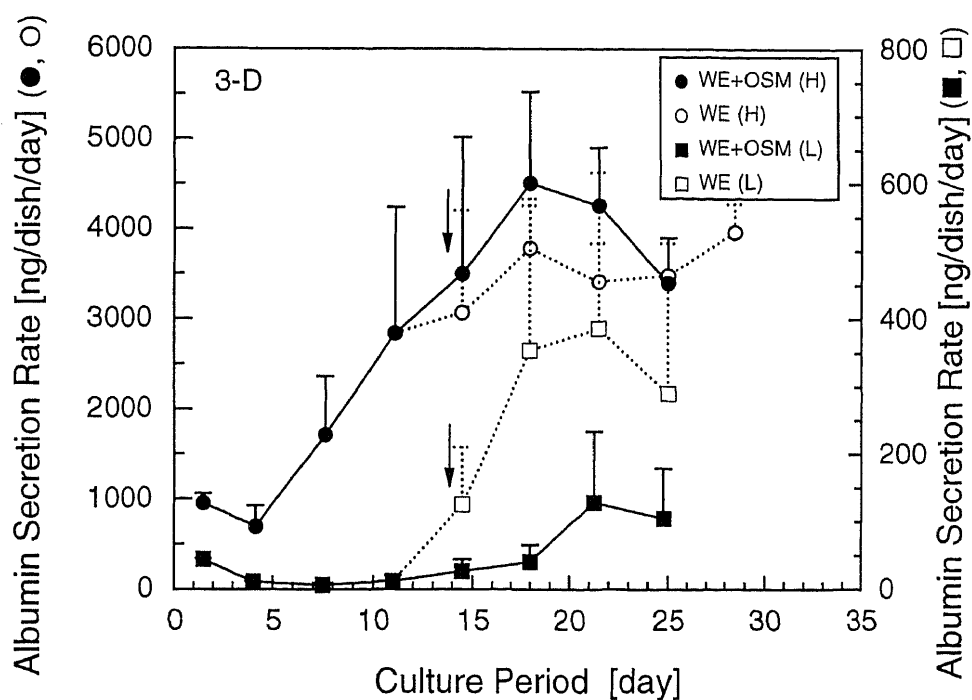


図 2-11. 培養途中で培地を WE+OSM から WE に変更した三次元培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, WE+OSM (高密度), n=3; ○, WE (高密度), n=3

■, WE+OSM (低密度), n=3; □, WE (低密度), n=3

培養約 14 日目に培地を WE+OSM から WE に変更しても、アルブミン分泌量の変化はほとんど認められなかった。(Mean ± SEM)

てほとんどアルブミン分泌活性は変化しなかった。なお、低密度に播種したもの（■、□）ではいずれの培養条件でもアルブミンはほとんど分泌されなかったことから、培地を変更することによる細胞への影響は確認できなかった。一方、三次元培養の場合には（図 2-11）、高密度に播種したものの培地を WE に変更すると（○）その後の活性は変更しなかったもの（●）よりわずかに低かった。しかし、いずれの場合にも 4.0 $\mu\text{g/day/dish}$ 前後の活性を安定して維持していたことから、OSM の添加を停止することによる大きな欠点は認められなかった。細胞を低密度に播種したものでは、培地を WE に変更した場合（□）に活性は変更直後から急激に上昇する傾向が見られ、培養 11 日目に約 20 ng/day/dish であった分泌量に変更後には 10 倍以上にまで上昇した。対照となる WE+OSM で培養を継続した場合（■）にも、アルブミン分泌量は徐々に上昇する傾向が見られたものの、WE に変更したものと比較すると上昇は緩やかであった。

以上の結果から、OSM を用いて胎仔肝臓細胞を増殖させたのちに OSM の添加を停止しても、細胞の活性はそれほど低下しないことがわかった。したがって、OSM を含んだ培地を用いて前培養された培養胎仔肝臓細胞をバイオ人工肝臓の細胞源として使用する場合には、臨床応用前に OSM を含まない培地を用いて細胞を培養することにより、細胞の活性を低下させることなく患者への OSM による悪影響を低減できる可能性が示唆された。

2-3-5. 尿素合成能

肝細胞の特異的機能の指標として、アルブミン分泌量に加えて尿素窒素合成量を測定した。基本培地と OSM 添加培地を用いた培養での、単層培養および三次元培養の結果をそれぞれ図 2-12 および図 2-13 に示す。これらの図では尿素窒素合成量の結果を培養開始からの積算値として求めた。

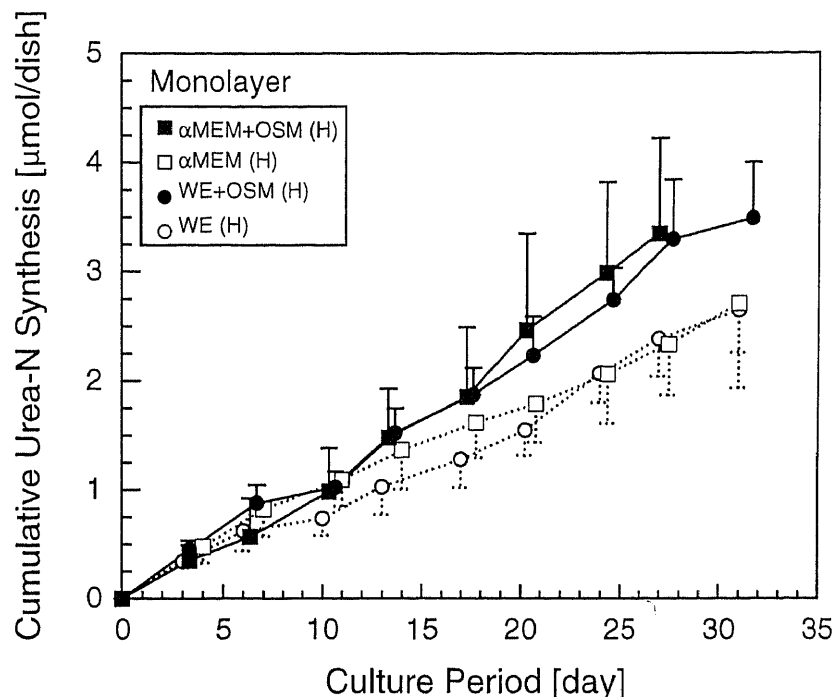


図 2-12. 基本培地および OSM 添加培地を使用した単層培養における尿素合成量の積算値

■, αMEM+OSM (高密度), n=3; □, αMEM (高密度), n=6
●, WE+OSM (高密度), n=3; ○, WE (高密度), n=4

単層培養では培養期間を通して尿素合成量はほぼ一定に保たれていた。OSM を添加した培養ではわずかに活性が上昇する傾向が見られた。(Mean ± SEM)

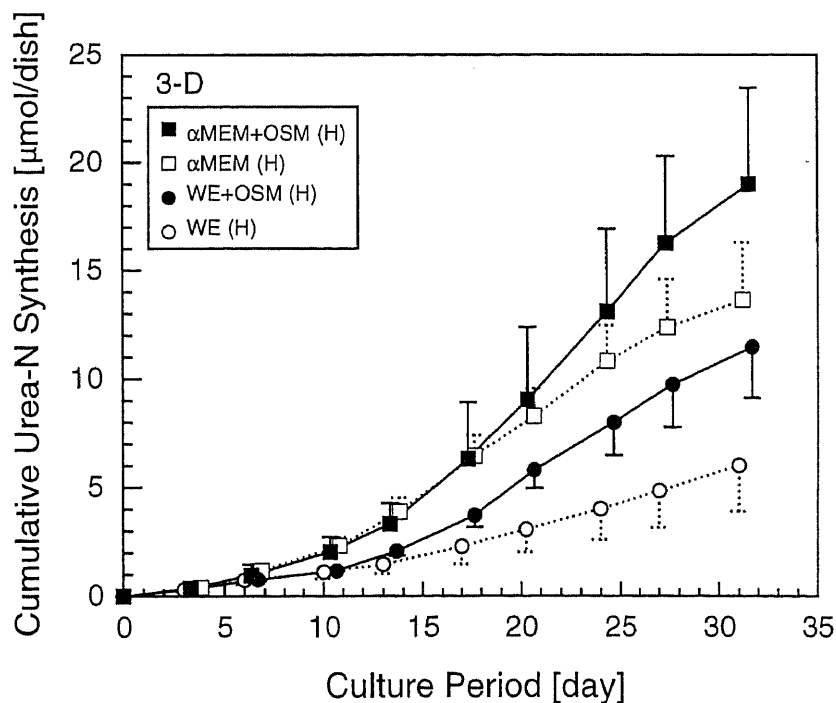


図 2-13. 基本培地および OSM 添加培地を使用した三次元培養における尿素合成量の積算値

■, αMEM+OSM (高密度), n=3; □, αMEM (高密度), n=6
●, WE+OSM (高密度), n=3; ○, WE (高密度), n=4

三次元培養では、培地に OSM を添加した場合の培養中期に活性が上昇する傾向を示し、培養終了時にはそれぞれ基本培地を用いた培養の 1.5 倍以上の値が得られた。(Mean ± SEM)

培地に基本培地と OSM 添加培地を使用した単層培養を比較すれば（図 2-12）、OSM 添加培地を用いた場合（■、●）に尿素窒素合成量がわずかに高い傾向が得られた。特に α MEM+OSM を用いた場合（■）には、DNA 量が増加から減少へと転じた 2 週間目以降に尿素合成曲線の傾きがわずかに大きくなったことから、細胞あたりの活性が上昇したことがわかった。一方、培地に OSM を添加しなかった場合には、 α MEM（□）では培養期間を通してほぼ一定の割合で尿素が分泌されたのに対して、WE を用いた場合（○）には DNA 量が増加した培養後期に活性が上昇する傾向であったことから、細胞数との相関が認められた。三次元培養においては（図 2-13）、培地に α MEM+OSM を用いた場合（■）に、DNA 量が最大値に達した培養 2 週間以降に活性が急激に上昇して、その後 DNA 量が減少するとともに活性もわずかに低下する傾向が見られた。培地に WE+OSM を用いた培養（●）では、DNA 量は α MEM+OSM のときよりも多かったにもかかわらず、尿素合成能はその 2/3 程度にとどまった。また、OSM を添加しなかった培養（□、○）と比較すると、OSM を添加した培地ではいずれも培養中期に活性が上昇して、それぞれ OSM を添加しなかった場合の 1.5 倍以上の合成量が得られた。

以上の結果から、培養胎仔肝細胞の尿素合成量是用いた培地条件や培養条件により異なるものの、その違いはアルブミン分泌量のように明確ではなく、いずれの条件においても比較的安定に維持されることがわかった。

2-3-6. 培養マウス胎仔肝細胞の分化・成熟度の評価

胎仔肝細胞の長期培養実験において、アルブミン分泌能と尿素合成能の 2 つの肝特異的機能を測定した結果から、特に三次元培養系においてアルブミン分泌能が上昇することが確認された。アルブミンは肝細胞の代表的な分化マーカーであることから、本研究で用いた胎仔肝細胞が培養中に分化・成熟している可能性が考えられた。しか

し、アルブミン分泌量の増加は主に細胞数の増加によるものなのか、あるいは個々の細胞が成熟することに起因しているのかは明確ではなかった。そこで、培養細胞が培養期間中に分化・成熟しているかどうかを確かめるために、未成熟肝細胞の指標である α -fetoprotein (AFP) と、成熟肝細胞の指標であるアルブミン、glucose-6-phosphatase (G-6-P) および α 1-antitrypsin (AAT) の 4 種類のマーカーについて RT-PCR を行い、培養細胞がこれらのマーカーをどの程度発現しているのかを確認した。この実験では、培地に WE、または WE+OSM を用いて高密度に細胞を播種した単層培養と三次元培養における、細胞の培養 1 日目と 35 日目の細胞から RNA を抽出して使用した。また、対照としてマウス胎仔肝臓細胞を用いた。

RT-PCR を行い、PCR 産物を電気泳動した結果を図 2-14 に示す。まず未成熟肝細胞のマーカーである AFP は、培養 1 日目にはいずれの培地でも強く発現していたのに対して、培養 35 日目には発現量が低下していた。特に WE+OSM を用いた三次元培養において、AFP の発現はほとんど認められなかった。次に、肝細胞の代表的な分化マーカーであるアルブミンに関しては、三次元培養では培養 35 日目の方が培養 1 日目よりも発現量が増加していた。それに対して単層培養では、WE を用いた培養で messenger RNA (mRNA) の発現は認められず、OSM を添加した培養でもわずかな発現しか認められなかった。妊娠後期または出生時期から発現する肝細胞のマーカーである G-6-P および AAT も、三次元培養ではいずれの培地を用いたときにも培養 1 日目よりも 35 日目の方が発現は強かった。また、これらのマーカーの 35 日目の発現量は、三次元培養では OSM の有無にかかわらずほぼ同程度であったが、単層培養では OSM を添加した培養の方が強く発現していることがわかった。

以上の結果から、培養胎仔肝細胞は培養期間の経過に伴って mRNA レベルで分化・

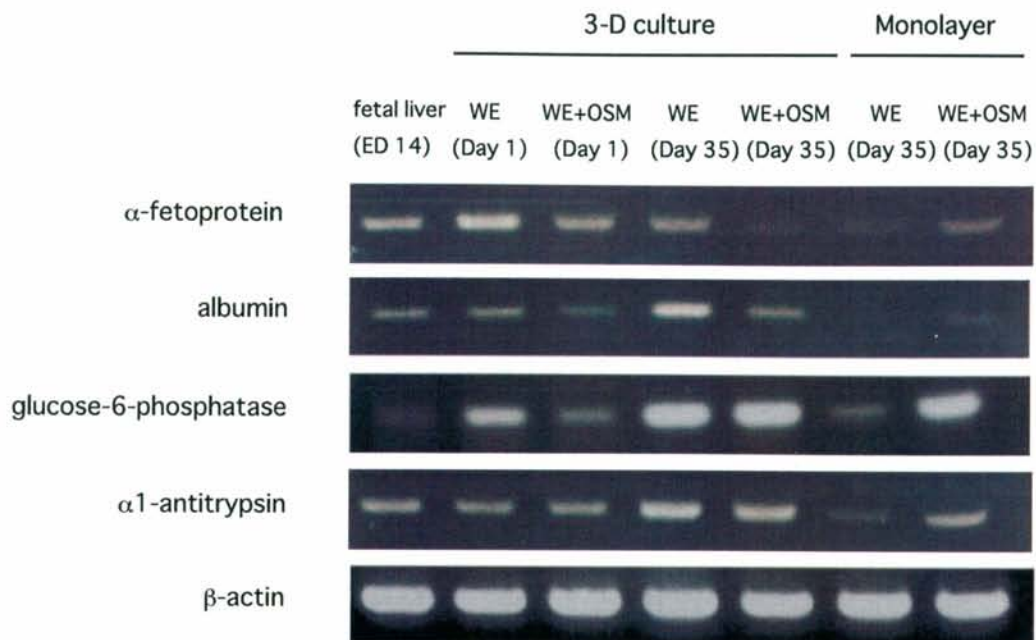


図 2-14. WE または WE+OSM を用いた培養における肝細胞の分化・成熟度の評価

培養期間が経過するにつれて細胞は分化・成熟していることが確認された。特に、培地に OSM を添加した場合には、成熟肝細胞の指標となるタンパク（アルブミン、G-6-P、AAT）の mRNA の発現量が高まっていることがわかった。また、単層培養よりも三次元培養の方がこれらの発現量は高かった。

成熟していることがわかった。さらに、OSM は細胞の分化や成熟を促進する効果があることが示唆された。

2-3-7. 電子顕微鏡による観察

三次元培養の実験において、細胞を高密度に播種した場合の、培養終了時に担体に固定化されていた細胞を電子顕微鏡で観察した写真を図 2-15 に示す。ここで、図 2-15-a は培地に α MEM を用いた場合の培養 33 日目のもの、図 2-15-b は培地に α MEM+OSM を用いた場合の培養 39 日目のもの、さらに図 2-15-c は培地に WE+OSM を用いた場合の培養 41 日目のもので、すべて担体表面の写真である。

培地に α MEM を用いた場合には（図 2-15-a）担体の骨格の上に細胞が球状を保ったまま接着しているのが確認された。一方、OSM を添加した培養では（図 2-15-b、2-15-c）、いずれの培地の場合にも PVF 樹脂の骨格表面に大きな細胞凝集塊を形成しているのが確認された。さらに、大量の ECM が細胞凝集塊の表面や周囲に分泌されており、細胞と立体的な構造を構築していることがわかった。このように、三次元培養では生体内の肝臓により近い構造をとることで、肝特異的機能が単層培養よりも良好に維持されたことが示唆された。

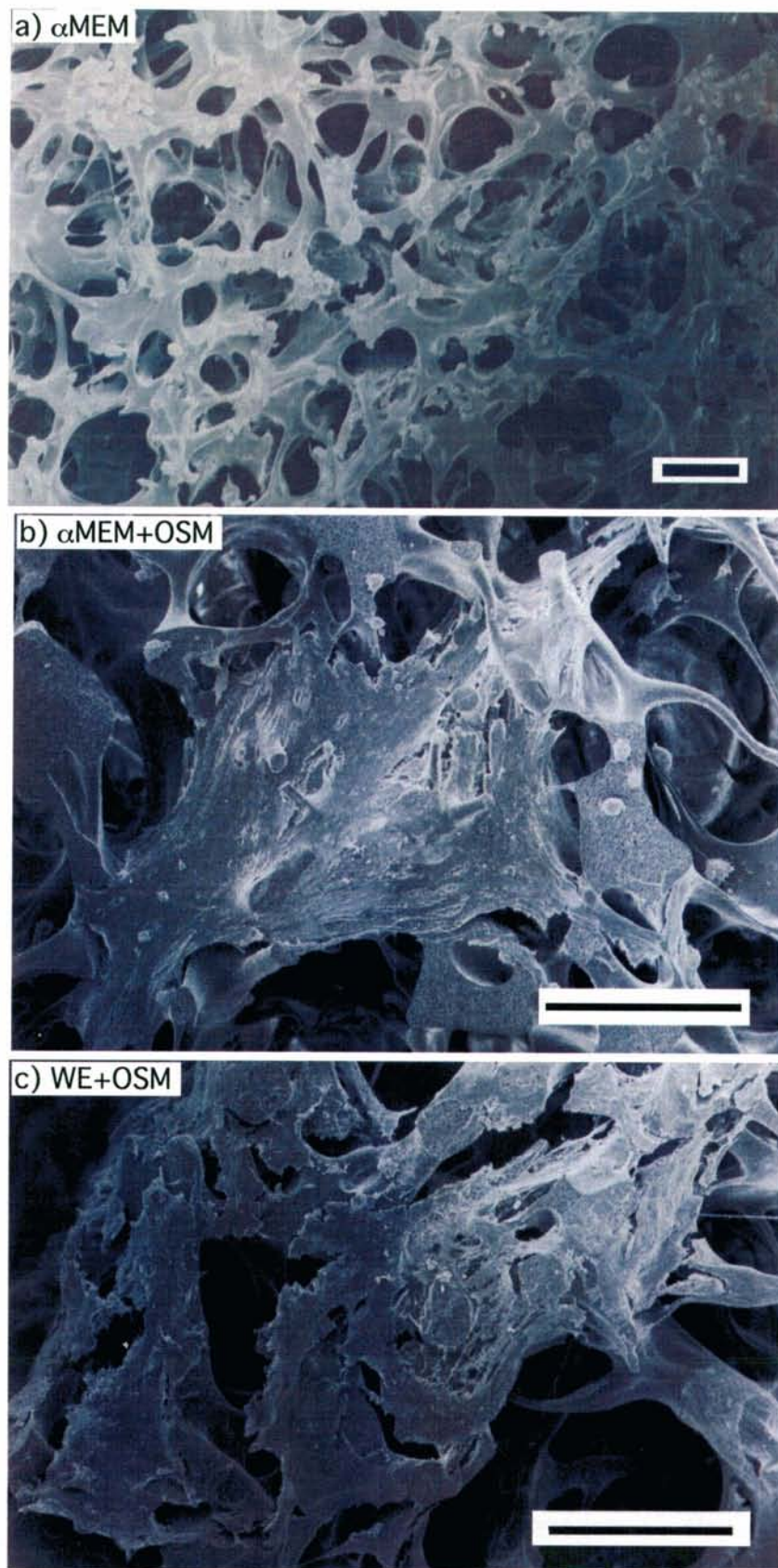


図 2-15. マウス胎仔肝臓細胞の三次元培養における細胞の電子顕微鏡写真
a) 培養 33 日目, b) 培養 39 日目, c) 培養 41 日目

培地に OSM を添加しなかった場合には細胞外マトリックスの分泌はあまり観察されなかったが、OSM を添加すると大量の細胞外マトリックスが分泌され、大きな細胞凝集塊を形成しているのが確認された。
Bars; 100 μm .

2-4. 考察

本章では、PVF 樹脂を用いる胎仔肝臓細胞の三次元培養を行い、異なる培地条件下において、基本培地や添加物が細胞の増殖や肝特異的機能へ及ぼす影響について調べた。培地への添加物として IL-6 family のサイトカインである OSM を用いた結果、胎仔肝臓細胞の増殖や肝特異的機能の亢進が認められた。

2-4-1. マウス胎仔肝臓細胞における OSM の効果

近年、ヒト肝ガン由来細胞や遊離肝細胞の機能に及ぼす OSM の影響に関する研究がいくつか報告された (Wang *et al.*, 2000; Kamiya *et al.*, 1999, 2001)。この OSM は IL-6 family に属しており、IL-6 は肝切除後におこる肝再生の際に重要なメディエーターとして働くことで、肝細胞の増殖を促す因子として知られている (Michalopoulos and DeFrances, 1997)。培養胎仔肝臓細胞における OSM の効果については、胎生 14.5 日目のマウス胎仔肝臓細胞をゼラチンコート・ディッシュを用いて培養した実験から、OSM を添加することにより造血機能が低下する一方で肝臓としての機能が亢進されることが報告されている (Kinoshita *et al.*, 1999)。また、胎仔肝臓細胞を OSM 存在下で 1 週間程度培養したところ、成熟肝細胞の指標である glucose-6-phosphatase (G-6-P) や tyrosine aminotransferase の発現が誘導されたことも報告されている (Kamiya *et al.*, 2001)。しかし、これらの研究はいずれも 1 週間程度の短期間の培養で得られた結果であり、肝特異的機能の発現についても mRNA レベルでの報告にとどまっている。

マウス胎仔肝臓細胞の長期培養については、ディッシュによる単層培養で、nicotinamide や dimethyl sulfoxide (DMSO) と共に OSM を添加することにより、5 週間で良好にアルブミンが分泌されることが確かめられている (Sakai *et al.*, 2002)。また、OSM を添加したヒト胎仔肝細胞の長期培養において、細胞のサイズが大きくなること、

細胞の分化や胆管の形成が促進されること、さらには継代した細胞でもアルブミンの分泌量が亢進されることが確認されている (Lázaro *et al.*, 2003)。しかし、これらの報告はあくまで単層培養によるものであり、本研究のように三次元培養した胎仔肝細胞の長期培養を行った研究は、われわれ以外には最近 1 例報告されたにすぎない。その報告は、多孔質である poly-L-lactic acid にヒト胎児肝細胞を播種して 5 週間の三次元培養を行ったものであり (Hanada *et al.*, 2003)、本研究と同様にアルブミン分泌量は単層培養よりも三次元培養の方が優れており、また OSM によって活性が亢進されたことを報告している。しかし、細胞種の違いはあるものの単位 DNA 量あたりのアルブミン分泌量は本研究の 1/1000 程度しかなく、バイオ人工肝臓に応用するにはなお改良の余地があると考えられる。このように、胎仔肝細胞の長期培養において OSM の効果をタンパクレベルで検討した研究は数少なく、培養胎仔肝臓細胞をバイオ人工肝臓に応用しようとする試みは行われていない。

本研究では、胎仔肝臓細胞の長期培養において OSM が細胞の増殖やタンパクレベルでの肝機能の維持に有効であり、とりわけ三次元培養においてその効果が顕著であることを明らかにした。したがって、本研究で用いた三次元培養系をバイオ人工肝臓の開発に応用できる可能性は十分にあると考えられた。

2-4-2. バイオ人工肝臓の細胞源

バイオ人工肝臓へ利用できる細胞として、ブタ成熟肝細胞やヒト肝ガン由来細胞に関しては、第 1 章の中で述べたように、増殖能、肝機能や安全性の面でそれぞれに問題点が残されている。ヒト肝ガン由来細胞の C3A 細胞は、アルブミンや AFP といった肝細胞特異的タンパク質の合成には優れている一方で、アンモニア代謝能などの機能は低いことが明らかにされており (Santoro *et al.*, 2004)、成熟肝細胞と比べれば細胞の

機能は不十分である。最近では、遺伝子操作技術を用いて可逆的にヒト正常細胞を不死化する方法が開発され、バイオ人工肝臓への応用が検討されている (Kobayashi *et al.*, 2000)。この肝細胞は NKNT-3 細胞と呼ばれ、Cre/LoxP システムを用いて不死化遺伝子の発現を調整することにより、細胞の増殖を制御できる。このシステムを用いて増殖させた細胞を 90% 肝切除したラットの脾臓に 5×10^7 個移植することにより、ラットの自己肝が回復するまでの期間、肝機能を補助できたことが報告されている。また、このシステムを肝臓の stellate 細胞にも応用して作製された細胞と NKNT-3 細胞とを coculture したところ、P450 関連酵素の発現量や尿素合成量が増加することがわかった (Watanabe *et al.*, 2003)。これらの細胞は、増殖したのちに不死化遺伝子を除去できることから、より安全性の高い細胞と考えられる。

近年の再生医療の進歩にともなって、将来的にバイオ人工肝臓への応用が期待されるいくつかの細胞がある。とりわけ、1) 臓器や組織の体性幹細胞、2) 胚性幹 (ES) 細胞、3) 脱分化させた細胞、の 3 種類の細胞が注目されている。このうち、ヒト ES 細胞については細胞株が確立されており (Thomson *et al.*, 1998)、免疫不全マウスに移植することにより、内胚葉系の腸管上皮細胞、中胚葉系の骨や平滑筋細胞、外胚葉系の神経上皮細胞など、全ての胚葉の細胞に分化できることが報告されている。ヒト ES 細胞の肝細胞への分化については、ES 細胞を酪酸ナトリウム存在下で培養することによりアルブミンや cytokeratin 8 などの肝細胞特異的タンパクを発現することも報告されており (Rambhatla *et al.*, 2003)、今後その活用が期待される。

胎児期の肝細胞は、生体外における増殖能が成熟肝細胞よりも高いものの、その機能は成熟肝細胞と比較すると不十分である。しかし、ガン細胞などと比較すると、胎児肝細胞の利用は安全面においてより信頼性が高い。本研究では PVF 樹脂を担体とした胎仔肝臓細胞の三次元培養を行い、細胞が良好に増殖することが確認された。細胞

の増殖速度はガン化細胞に比べれば遅いと考えられるが、OSM を添加した培養では一定の増殖能を示した。また、肝特異的機能に関しても培養期間を通してアルブミン分泌能が大幅に上昇することが確認された。培養胎仔肝細胞の分化機能の発現については、本研究と比較的培養方法が近い Hanada らの研究において、OSM 添加培地を用いてヒト胎児肝細胞の三次元培養を行ったところ、アルブミン分泌能や P450 の機能が肝ガン細胞である HepG2 よりも 1 桁劣っていたことが報告されている (Hanada *et al.*, 2003)。しかしながら、胎仔肝細胞の培養条件を改善することにより肝特異的機能の発現を大幅に増加できる可能性のあること、およびガン細胞が数百ともいわれる肝特異的機能のすべてを十分に維持しているということは考えにくいことから、胎仔肝臓細胞はバイオ人工肝臓の有望な細胞源の一つであると考えられた。今後は、胎仔肝細胞の代謝機能をさらに改善できる培養条件を検討するとともに、アルブミン分泌能や尿素合成能以外の機能の発現についても調べる必要がある。

2-4-3. 三次元培養した成熟肝細胞との比較

われわれの研究室では、これまでに PVF 樹脂を担体とする肝細胞の長期培養を行ってきた。本研究とほぼ同様の手法を用いたラット成熟肝細胞の培養では、細胞を 2.5×10^6 cells/ 0.8 cm^3 -PVF の密度で播種して長期培養を行ったところ、およそ $25 \mu\text{g/day/dish}$ のアルブミン分泌量が得られたことを報告している (Miyoshi *et al.*, 1998)。また、肝実質細胞と血管内皮細胞を PVF 樹脂に播種した coculture では、培養 5 日目からアルブミン分泌能は徐々に増加し、約 20 日間の培養終了時においても活性は増加していたことも確かめられている (三好ら, 1994; Ohshima *et al.*, 1999)。一方、胎仔肝臓細胞を培養した本研究においては、播種細胞密度は高かったにもかかわらず最高でも約 $3 \mu\text{g/day/dish}$ のアルブミン分泌能であり、これは成熟肝細胞の活性に比べれば約

1桁低い値であった。この原因として、胎仔肝臓細胞は遺伝子レベルでは培養期間中に徐々に分化・成熟してきているものの、成熟肝細胞と比較するとその機能発現はまだ十分ではないことが考えられた。しかしながら、本研究において培地に OSM を添加した場合には、三次元培養において細胞を低密度に播種した場合でも培養後期にアルブミン分泌活性は上昇しており、さらにアルブミン以外の成熟肝細胞の指標となるタンパク（G-6-P、AAT）についても長期培養後には発現量の増加が認められたことから、より長期間にわたる培養においては胎仔肝臓細胞の機能がさらに向上することが期待された。

胎仔肝臓細胞の培養では、PVF 樹脂を用いて三次元培養した細胞をコラーゲンゲルにより包埋した場合、培養 10 日目におよそ 8 $\mu\text{g/day}$ のアルブミン分泌量が確認されている（鈴木, 2002）。ゲルで包埋して培養する方法は細胞の脱落を予防する効果があることから、より効率的に細胞を維持できたために高いアルブミン分泌量が得られたと考えられる。今後、このような培養方法も組み合わせることにより、胎仔肝臓細胞の機能を十分に発現できるような培養方法の開発が期待される。

2-4-4. 三次元培養の効果

本研究では、ディッシュによる単層培養と PVF 樹脂を担体として用いた三次元培養を行った。ここで、両条件下での播種密度はそれぞれ異なるものの、三次元培養の低密度に播種したものは播種効率が約 60% であったことから、培養開始時の細胞数はディッシュあたり 1.2×10^6 個となり、単層培養の高密度に播種した場合とほぼ同等の細胞数であった。これらの培養条件において WE+OSM を用いた場合には、単層培養では細胞がわずかに増殖しただけであったのに対し、三次元培養では一定の割合で細胞数が増加した。またアルブミン分泌量に関しても、三次元培養の方が急激に上昇して、分

泌量も単層培養の 25 倍以上に達した。したがって、単層培養よりも三次元培養の方が細胞の増殖や機能の発現には有効であることが明らかになった。

三次元培養の方が細胞の機能発現に有効であるということは、Cukierman らによって報告されている (Cukierman *et al.*, 2001)。この研究では、三次元のマトリックス上で細胞を培養することにより、二次元の場合よりも細胞の接着や増殖が活性化されることが確かめられた。本研究では、PVF 樹脂に固定化された細胞の電子顕微鏡写真からもわかるように、三次元で培養された細胞は良好に ECM を分泌して大きな細胞凝集塊を形成していた。そのため、大量に分泌された ECM が胎仔肝臓細胞の増殖や機能に大きく影響していると考えられた。また、細胞同士のコミュニケーション手段として、サイトカインや増殖因子などの液性因子による相互作用に加えて、直接細胞同士が結合することによる相互作用が挙げられる。三次元的に細胞が密着している培養では、隣接する細胞同士の gap junction などとも発達していることから、細胞同士のコミュニケーションがより活発に行われている可能性が考えられた。今後、三次元培養における細胞同士のコミュニケーションについて、単層培養との違いも含めて解明していく必要があろう。

2-4-5. 基本培地の種類による影響

本研究では、マウス胎仔肝臓細胞の培養に α MEM と WE の二種類の基本培地を用いた。ここで、 α MEM は血球系の細胞の培養に広く使用される培地であり、WE は肝細胞の培養に汎用的に用いられる培地である。胎仔肝臓は造血機能と肝機能を併せ持っていることから、本章ではこれらの培地の影響について調べた。その結果、培地に α MEM を用いた場合には、DNA 量が増加したにもかかわらずアルブミン分泌量はわずかであった。また、WE を用いた場合には、DNA 量が減少したにもかかわらずアルブ

ミン分泌量が良好に維持されることが確かめられたことから、これらの培地が細胞の増殖や活性に及ぼす影響にはかなりの違いがあることがわかった。

これらの培地の組成を比較すると、一部のアミノ酸やグルコース含有量の違いに加えて、 α MEM には核酸が含まれているが WE には含まれないという違いがあった。しかし、二種類の培地のそれ以外の組成についてはあまり差がないことから、これらの培地が細胞の増殖能や肝特異的機能に大きく影響したのは培地の組成の違いが原因ではなく、むしろ血清やホルモンなどの培地への添加物の違いによる可能性が高いと考えられた。

肝細胞の培養において、肝細胞の機能を上昇させることを目的として、しばしば dexamethasone などの各種ホルモンが培地に添加される。これらのホルモンが肝細胞の機能に及ぼす影響について調べた報告がいくつかあるものの、ホルモンの有無によって細胞の増殖や活性に 1 桁近くも差が出ることは報告されていない (Dich *et al.*, 1988)。したがって、本研究における α MEM と WE の効果の差を、添加したホルモンの違いだけでは説明することができない。

血球系細胞の培養における血清の添加に関して、FBS と HS では効果は異なるためにそれぞれの血清を 10% ずつ添加することが理想的であるとの報告がある (Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1981)。本研究で各培地に添加した血清は、 α MEM には 10% FBS と 10% HS、WE には 10% FBS であることから、胎仔肝臓細胞の培養でも添加した血清の動物種の違いによる影響が考えられた。ここで、いずれの培地も FBS を含んでいることから、とりわけ HS の影響が大きいことが考えられた。すなわち、HS は胎仔肝臓細胞に含まれる細胞のうち血球系の細胞の増殖のみを促進した可能性があることから、 α MEM を用いた場合には細胞数が増加したにもかかわらずアルブミン分泌能はそれほど活性化されなかったものと考えられた。

2-5. 小括

マウス胎仔肝臓細胞の単層培養と三次元培養において、基本培地およびそれらに細胞刺激因子として OSM を添加した培地を用い、これらの条件が細胞の増殖能や肝特異的機能に及ぼす効果について検討した結果、以下のような結論が得られた。

- 1) いずれの培地においても、ディッシュによる単層培養よりも PVF 樹脂を用いた三次元培養の方がアルブミン分泌能などの肝細胞の機能が良好に保たれた。
- 2) 基本培地として用いた α MEM と WE について、 α MEM は細胞の増殖には有効であったのに対し、WE はアルブミン分泌能の発現に有効であることがわかった。
- 3) マウス胎仔肝臓細胞の培養において、培地に OSM を添加すると細胞の増殖やアルブミン分泌能が著しく亢進されることがわかった。この傾向は三次元培養において顕著であり、活性は 1 ヶ月以上安定に保たれた。
- 4) 長期間培養されたマウス胎仔肝臓細胞は、肝細胞が分化・成熟していることがわかった。特に OSM を添加した場合には肝細胞の成熟が促進されることがわかった。
- 5) 三次元培養における細胞の観察から、大量の ECM が細胞を覆って、生体内に近い構造を構築していることがわかった。
- 6) 培地に OSM を添加した培養において、培養途中に OSM の添加を停止しても細胞の活性はそれほど低下しないことがわかった。
- 7) 以上の結果から、OSM を添加した培地を用いて三次元培養した胎仔肝臓細胞を、バイオ人工肝臓の細胞源として利用できる可能性が示唆された。

第3章 マウス胎仔肝臓細胞の培養における LIF と VEGF の影響

3-1. 本章の研究目的

本章では、胎仔肝臓細胞の培養において細胞の肝特異的機能の発現に効果のある新たな細胞刺激因子を探ることを目的とした。第2章の結果から、OSM はマウス胎仔肝臓細胞の増殖や活性の上昇に効果があることが明らかになった。そこで本章では、IL-6 family に属するサイトカインのうち構造が比較的 OSM に近い leukemia inhibitory factor (LIF) (Heinrich *et al.*, 1998) を添加した培養を行い、LIF が細胞の増殖や肝特異的機能に及ぼす影響について検討した。また、胎仔肝臓細胞中には肝実質細胞の他にも Kupffer 細胞や血管内皮細胞が含まれている。血管内皮細胞に働く代表的な増殖因子として vascular endothelial growth factor (VEGF) が挙げられ (Ferrara *et al.*, 2003)、胎仔肝臓細胞に含まれる血管内皮細胞にも何らかの効果を示す可能性があると考えられたことから、VEGF の影響についても検討した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 細胞の取得および培養方法

本章で培養した細胞は 2-2-1 項で述べた方法で取得し、PVF 樹脂を用いる三次元培養とディッシュによる単層培養は 2-2-4 項と同じ手法で行った。細胞の培養には、WE 培地を基本として、これに細胞の刺激因子としてマウス LIF (10 ng/mL, Sigma) (WE+LIF) またはマウス VEGF (10 ng/mL, Sigma) (WE+VEGF) を添加した培地を用いた。

3-2-2. 細胞の評価方法

培地に LIF または VEGF を添加した培養における胎仔肝臓細胞は、細胞数の指標として DNA 量、肝特異的機能の経時変化としてアルブミン分泌量と尿素窒素合成量を、それぞれ 2-2-5 項および 2-2-6 項の手法に基づいて計測した。

3-2-3. 統計処理

全ての実験結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で示した。培養 1 日目との比較は paired t-test により、また培地の違いによる比較は student's t-test により、危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意水準とした。

3-3. 実験結果

本章では、培地に LIF あるいは VEGF を添加したマウス胎仔肝臓細胞の三次元培養を行い、これらの因子が細胞の増殖能や肝特異的機能の発現に及ぼす影響について検討した。本章の培養実験における細胞の播種密度を表 3-1 に示す。

3-3-1. WE に LIF を添加した培養

培地に WE+LIF を用いた培養における DNA 量の経時変化を図 3-1 に、アルブミン分泌量の経時変化を図 3-2 に示す。まず、DNA 量の変化については、単層培養では（●、○）培養期間を通して DNA 量はわずかに低下した。三次元培養では、細胞を低密度に播種した場合（□）には DNA 量は培養期間を通して徐々に減少する傾向が見られた。高密度培養では（■）、培養開始時には DNA 量が高かったものの培養開始 1 週間で急激に減少し、その後は約 15 $\mu\text{g}/\text{dish}$ の DNA 量が維持された。

アルブミン分泌量については（図 3-2）、単層培養（●、○）および三次元培養の低密度に播種したもの（□）では、培養開始直後に分泌量が低下して、その後はほとんどアルブミンは分泌されなかったことから、LIF による効果は認められなかった。一方、三次元培養の高密度に細胞を播種したもの（■）では、培養期間を通して活性が徐々に上昇する傾向を示し、約 800 ng/day/dish の分泌量が安定して維持された。

以上の結果から、LIF は細胞の増殖を促す効果は低いものの、アルブミン分泌量を維持できることがわかった。

3-3-2. WE に VEGF を添加した培養

培地に LIF を添加した培養では、細胞数が徐々に低下したもののアルブミン分泌量は良好に維持された。しかし、これらの効果は OSM に比べれば弱かったことから、VEGF

表 3-1. LIF や VEGF を添加した培地を用いた培養における播種条件

培地	培養条件	播種密度	播種細胞数*
WE+LIF	単層培養	高密度 (H)	1.00 (n=3)
		低密度 (L)	0.20 (n=3)
	三次元培養	高密度 (H)	25.0 (n=3)
		低密度 (L)	2.50 (n=3)
WE+VEGF	単層培養	高密度 (H)	1.00 (n=3)
		低密度 (L)	0.20 (n=3)
	三次元培養	高密度 (H)	25.0 (n=3)
		低密度 (L)	2.50 (n=3)

* 単層培養 [10^6 cells/dish]

三次元培養 [10^6 cells/ 0.4 cm^3 -PVF]

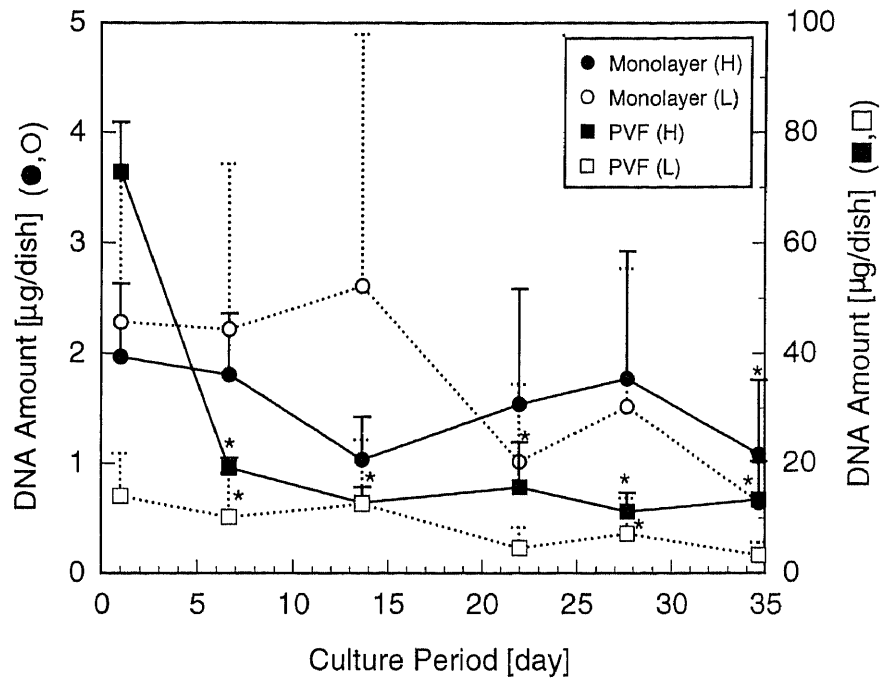


図 3-1. 培地に WE+LIF を用いた培養における DNA 量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+LIF を用いた培養では、全ての培養条件において DNA 量は徐々に減少した。
(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

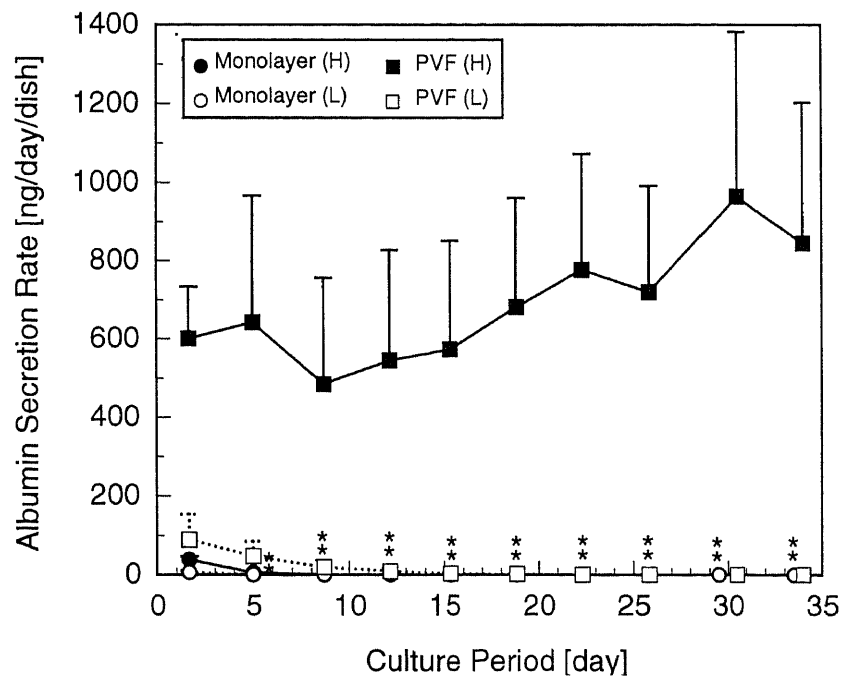


図 3-2. 培地に WE+LIF を用いた培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+LIF を用いた培養では、高密度に播種した三次元培養においてアルブミン分泌量が徐々に増加する傾向が見られ、培養後期にはおよそ 800 ng/day/dish の分泌量が得られた。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

を添加した培地 (WE+VEGF) による培養を行った。

このときの DNA 量の経時変化を図 3-3 に示す。単層培養ではいずれの播種密度においても培養期間を通して DNA 量はほぼ一定に保たれ、高密度に播種したもの (●) ではおよそ $6 \mu\text{g}/\text{dish}$ の DNA 量であった。三次元培養では、細胞を高密度に播種した場合 (■) のみ培養開始直後に著しく DNA 量が減少したものの、その後は低密度で播種したもの (□) とともに培養期間を通じて DNA 量はほぼ一定に維持された。このとき、高密度培養 (■) では $60 \mu\text{g}$ 以上の高い密度で細胞が維持された。

アルブミン分泌量については (図 3-4)、単層培養の場合 (●、○) と三次元培養の低密度に播種したもの (□) では培養初期に活性が低下して、培養 2 週間目以降はアルブミンが分泌されなかった。それに対して、三次元培養の高密度に播種したもの (■) では、DNA 量が減少した培養開始後約 1 週間はアルブミン分泌の活性が低下したものの、細胞数が一定になってからは徐々に活性が上昇する傾向があり、培養終了時には約 $1.7 \mu\text{g}/\text{day}/\text{dish}$ に達した。このことから、VEGF は胎仔肝臓細胞の培養において、細胞数の維持やアルブミン分泌能の増加に一定の効果が認められた。

基本培地や OSM 添加培地を用いたマウス胎仔肝臓細胞の培養 (第 2 章) と、本章で得られた LIF や VEGF を添加した培養を比較した結果を表 3-2 に示す。この表は、高密度に播種した三次元培養における培養 25 日目頃の DNA 量とアルブミン分泌量を示している。アルブミン分泌量は WE+OSM を用いた場合にはおよそ $2.5 \mu\text{g}/\text{day}/\text{dish}$ であった (2-3-3 項) のに対して、LIF や VEGF はそれぞれ $0.7 \mu\text{g}/\text{day}/\text{dish}$ と $1.7 \mu\text{g}/\text{day}/\text{dish}$ であったことから、OSM の効果には及ばなかった。しかし、WE を用いた培養と比べれば、LIF や VEGF を添加した培養では細胞数やアルブミン分泌量が増加する傾向を示した。特に、VEGF を添加した場合には、DNA 量とアルブミン分泌量は有意に増加した。

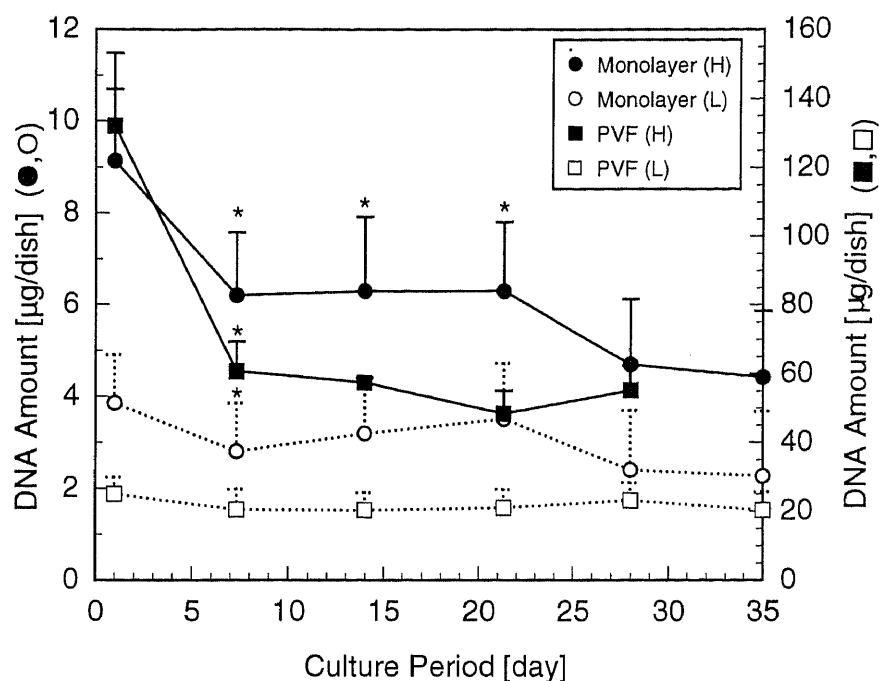


図 3-3. 培地に WE+VEGF を用いた培養における DNA 量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+VEGF を用いた培養では、細胞を高密度に播種した三次元培養のみ培養開始直後に DNA 量が急激に低下したものの、DNA 量は安定に維持された。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

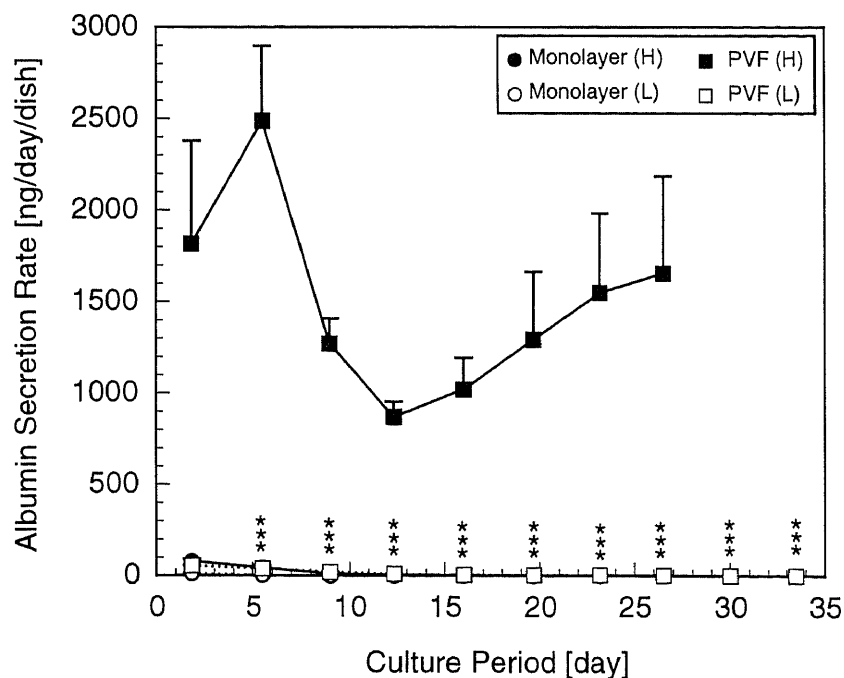


図 3-4. 培地に WE+VEGF を用いた培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+VEGF を用いた培養では、細胞を高密度に播種した三次元培養において、培養 2 週間以降にアルブミン分泌量が増加する傾向を示し、培養終了時に約 1.7 μg/day/dish の分泌量が得られた。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

表 3-2. 培地添加物が細胞の増殖や機能に及ぼす影響
(三次元培養 (高密度))

	DNA量 [$\mu\text{g}/\text{dish}$]	アルブミン分泌量 [$\text{ng}/\text{day}/\text{dish}$]
WE	6.83 ± 2.15	412.76 ± 134.40
WE+OSM	$50.86 \pm 10.55^*$	$2482.23 \pm 714.66^*$
WE+LIF	11.23 ± 3.43	719.88 ± 271.64
WE+VEGF	$55.14 \pm 7.13^*$	$1656.63 \pm 529.71^*$

* $p < 0.05$ vs. WE

細胞あたりのアルブミン分泌量に関しては、この表から WE: 60.4 ng/ μ g/day、WE+OSM: 48.8 ng/ μ g/day、WE+LIF: 64.1 ng/ μ g/day、WE+VEGF: 30.0 ng/ μ g/day と計算できる。したがって、WE、WE+OSM と WE+LIF の場合には細胞あたりの分泌量はほぼ同等であったのに対して、WE+VEGF の場合には抑制されていることがわかった。これは、WE+VEGF を用いた培養では胎仔肝臓細胞に含まれる非実質細胞が盛んに増殖したために、細胞あたりの分泌量が低下したものと考えられた。

3-3-3. 尿素合成能

培地に LIF や VEGF を添加した単層培養と三次元培養における尿素合成量を、積算値として図 3-5 と図 3-6 に示す。これらの結果は、いずれも細胞を高密度に播種したときのものである。

まず単層培養においては（図 3-5）、WE+LIF を用いた培養（■）では、DNA 量はほぼ一定であったにもかかわらず尿素合成量は培養 1 週間目からわずかに低下する傾向が見られた。また、WE+VEGF を用いた場合（●）にも DNA 量はほぼ一定であり、この傾向に一致して尿素合成量も一定に保たれた。三次元培養では（図 3-6）、WE+LIF を用いた培養（■）において細胞数が安定した培養後期に活性が次第に上昇する傾向が見られた。また、WE+VEGF（●）については培養期間を通して活性はほぼ一定であった。これらの尿素合成量を比較すると、いずれの培養においても WE+VEGF を用いた場合よりも WE+LIF を用いた場合の方が尿素合成量は 4 倍ほど多かった。したがって、VEGF はアルブミン分泌能の発現には有効であったにもかかわらず、尿素合成能にはそれほど効果がないことが示された。

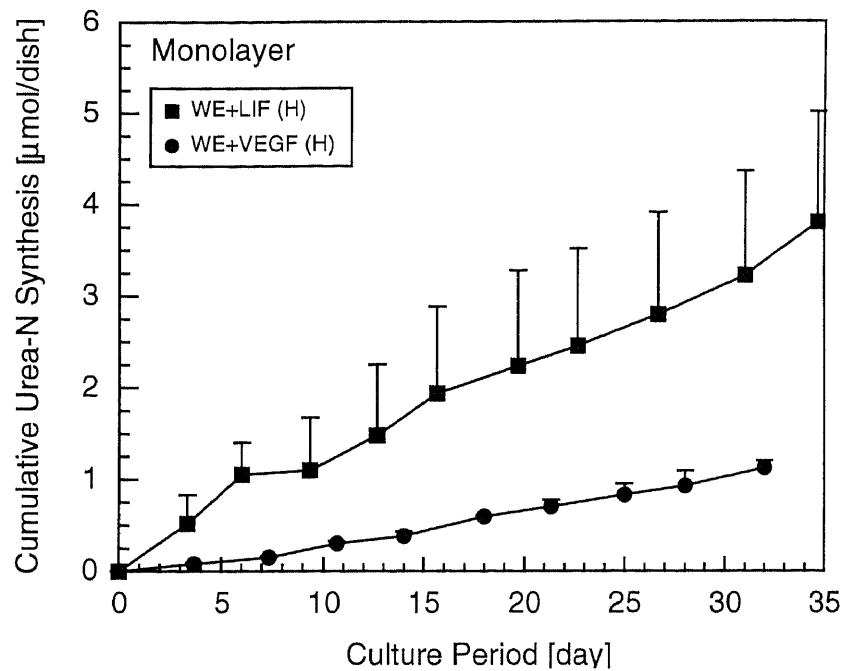


図 3-5. WE に LIF または VEGF を添加した単層培養における尿素合成量の積算値

■, WE+LIF (高密度), n=3; ●, WE+VEGF (高密度), n=3

WE に LIF または VEGF を添加した単層培養では、尿素合成量はほぼ一定であった。WE+VEGF を用いた培養では WE の尿素合成量の 1/2 以下であった。(Mean ± SEM)

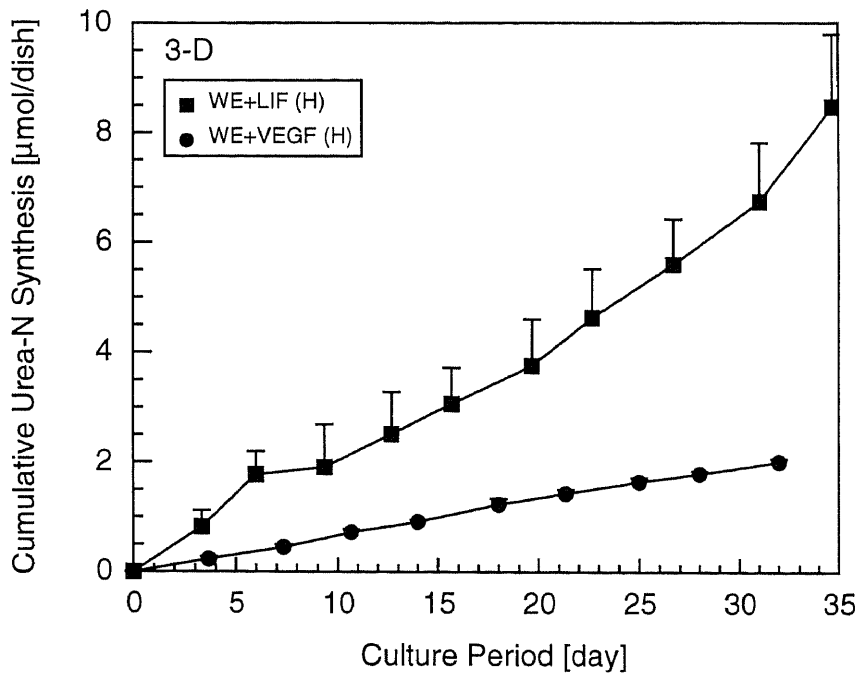


図 3-6. WE に LIF または VEGF を添加した三次元培養における尿素合成量の積算値

■, WE+LIF (高密度), n=3; ●, WE+VEGF (高密度), n=3

WE+LIF を用いた三次元培養では、尿素合成量は培養後期に増加する傾向が見られた。WE+VEGF を用いた培養では活性はほぼ一定であったが、積算量は WE の場合の 1/2 以下であった。(Mean ± SEM)

3-4. 考察

本章では、肝細胞の機能を活性化することを目的として、培地に LIF や VEGF を添加して細胞の増殖能や肝特異的機能への効果について調べた。その結果、これらの因子はアルブミン分泌能の維持に有効であることがわかった。

LIF は OSM と同じく IL-6 family に属するサイトカインで、これらのサイトカインは細胞のレセプタータンパクである glycoprotein 130 (gp130) を共有している。さらに、LIF は肝臓でも分泌されており、種々の細胞において acute phase protein の合成を促す働きを有している。培養肝細胞についても例外ではなく、肝ガン由来細胞である HepG2 細胞において、LIF は炎症作用を引き起こすのに重要な役目を果たす α_1 -proteinase inhibitor の分泌を促進することが報告されている (Koj *et al.*, 1993)。また、初代肝細胞の培養においても、LIF は acute phase protein の合成を促進することが確認されている (Kordula *et al.*, 1991)。本研究において、培地に LIF を添加した培養では、全ての培養条件において細胞が徐々に減少する傾向が見られた (図 3-1)。培地に WE を用いた培養 (図 2-4) と比較すると、細胞数は LIF を添加した培養の方が高かったものの、OSM を添加した培養 (図 2-8) と比較すると 1/4 程度の量であった。Kordula らの研究では、培養成熟肝細胞の DNA 合成量は、LIF を添加した場合には、添加しなかったものに比べて低下することが報告されており、この傾向は本研究の結果と一致する。また、肝ガン由来細胞である HepG2 において OSM レセプターと LIF レセプターの発現量を比較すると、OSM レセプターの方が 3 倍近く多く発現しているという報告があることから (Mosley *et al.*, 1996)、OSM と LIF の細胞数や機能への効果の違いはレセプターの発現量に依存する可能性も考えられた。

アルブミン分泌能に関しては、細胞を高密度に播種した三次元培養において、培地

に WE、WE+OSM、あるいは WE+LIF を用いた場合のアルブミン分泌量はそれぞれ異なっていたものの、細胞あたりの活性に換算するとどの培地を用いてもほぼ同等であった。この結果は、成熟肝細胞の培養において、LIF を添加した場合のアルブミン分泌量が添加しなかったものとほぼ同等であったという報告 (Kordula *et al.*, 1991) と一致した傾向であった。

培地に VEGF を添加した培養では、WE による培養と比較して細胞数が良好に保たれ、培養終了時には OSM 添加培地の場合と同等の細胞数が維持された。これまでに、VEGF が肝実質細胞の増殖や機能の向上に直接関与することは報告されていない。ただし、成熟肝細胞と非実質細胞との *coculture* に VEGF 添加培地を用いた場合や、VEGF 添加培地で非実質細胞を培養した培地上清を肝実質細胞の培養に添加した場合には、肝細胞の DNA 合成が活性化されたことが報告されている (LeCouter *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004)。また、VEGF は肝臓の類洞血管内皮細胞の DNA 合成を促進することも確かめられていることから (LeCouter *et al.*, 2003)、本研究においても、VEGF を添加することにより肝細胞や非実質細胞の DNA 合成が活性化されたために細胞数が比較的高密度に保たれたと考えられた。

本研究において、VEGF 添加培地を用いた三次元培養の細胞あたりのアルブミン分泌量は、WE を用いた培養と比較すると低下していることがわかった。アルブミン分泌能については、hepatocyte growth factor (HGF)、epidermal growth factor (EGF)、IL-6 および VEGF を添加した培地や、この培地で非実質細胞を培養した培地上清を用いて肝実質細胞を培養した場合には、通常の培地よりも肝細胞のアルブミン分泌能は低下することが報告されていることから (Kang *et al.*, 2004)、本研究の結果と一致していた。また尿素合成能に関して、Kang らはアルブミン分泌能を測定したときと同様の培地上清を用いた培養を行ったところ、肝細胞の尿素合成能には VEGF の添加による効果はあ

まりないことが報告している (Kang *et al.*, 2004)。これに対して、本研究での VEGF を添加した場合の尿素合成量は、基本培地による培養の 1/2 以下の分泌量であり、かなり異なる傾向が得られた。この原因として、本研究の胎仔肝臓細胞を用いた培養の場合には、VEGF を添加することにより類洞血管内皮細胞が選択的に増殖し、肝細胞はあまり増殖しなかった可能性が考えられる。今後は、VEGF を添加した培養において、どのような細胞が増殖しているかを調べる必要がある。

3-5. 小括

マウス胎仔肝臓細胞の単層培養および三次元培養において、細胞の刺激因子として LIF または VEGF を添加した培養を行い、細胞の増殖や肝特異的機能に対する効果について検討した。その結果、以下の結論が得られた。

- 1) 培地に LIF を添加した場合には、細胞数は減少したものの、細胞あたりのアルブミン分泌量は WE や WE+OSM での培養と比較してあまり変わらなかった。
- 2) 培地に VEGF を添加した培養では、細胞数は培養中期から安定に保たれた。そのためアルブミン分泌量は比較的多かったものの、細胞あたりのアルブミン分泌能は抑制されていた。
- 3) 以上の結果から、これらの因子が胎仔肝細胞に及ぼす利点は明確には認められなかった。今後は、他の因子と組み合わせるなどの方法を検討する必要があると考えられた。

第 4 章 ブタ胎仔肝臓細胞の三次元培養における刺激因子の影響

4-1. 本章の研究目的

第 2 章においてマウス胎仔肝臓細胞の培養を行った結果、PVF 樹脂を用いた三次元培養系においてアルブミン分泌能や尿素合成能などの肝特異的機能が長期間にわたって維持されることが確認されたことから、胎仔肝臓細胞をバイオ人工肝臓の細胞源として利用できる可能性が示唆された。そこで臨床応用を目標とした次の段階の検討として、一度に大量の細胞を入手することができ、臨床応用に使用される可能性もあるブタ胎仔の肝臓細胞を用いて、マウスの細胞の場合と同様に三次元培養および単層培養を行った。ブタの細胞を用いた実験では、培地に OSM、LIF、あるいは成熟肝細胞の機能の亢進に効果的なホルモンである cortisol をそれぞれ添加し、これらの添加物が細胞の増殖や機能に及ぼす影響について検討した。

4.2. 実験方法

4-2-1. ブタ胎仔肝臓細胞の取得

ブタ胎仔肝臓細胞は胎生 64~81 日目の Duroc 種ブタ（全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、茨城）から取得した。まず妊娠ブタを開腹して子宮を切開したのち胎仔を子宮外に摘出し、臍帯を結紮後に切断して胎仔を得た。ただちに 5% FBS を含んだ Hanks 液中に浸漬し、常温にて運搬したのち、コラゲナーゼ灌流法（Seglen, 1976）を一部改良した方法を用いて肝臓細胞を遊離した。すなわち、0.5 mM EGTA (ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid、同仁化学研究所) と 10 mM HEPES (*N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)、同仁化学研究所) を PBS (-) に溶解した前灌流液 150 mL を臍帯静脈から 5 分間かけて肝臓に送液することにより、肝臓内の血液を洗い流すとともにカルシウムイオンを除去した。その後、Hanks 液に 0.05% collagenase (和光純薬工業)、0.005% trypsin inhibitor (Sigma) と 10 mM HEPES を溶解した collagenase 溶液 200 mL を 10~15 分かけて灌流し、肝臓の結合組織を消化した。胎仔から取り出した肝臓を Hanks 液中にて穏やかにピペッティングすることによって細胞を分散したのち、細胞は 2 重に重ねて滅菌したガーゼを通すことにより結合組織などを取り除いた。取得細胞数および細胞生存率は trypan blue exclusion 法により測定した。

4-2-2. 培養実験

ブタ胎仔肝臓細胞の培養実験はマウス胎仔肝臓細胞の培養と同様に、PVF 樹脂を用いる三次元培養と、対照としてディッシュによる単層培養を行った。三次元培養に用いた担体も同様に 2 mm 角に細切した PVF 樹脂を滅菌したのちコラーゲンコートし、洗浄して用いた。ブタ胎仔肝臓細胞の培養には、マウス胎仔肝細胞のアルブミン分泌

の維持に有効であった WE 培地を基本として、これにヒト OSM (10 ng/mL, Sigma) (WE+OSM)、ヒト LIF (10 ng/mL, Pepro Tech, NJ) (WE+LIF)、あるいは cortisol (10 μ M, Sigma) (WE+COR) を添加した計 4 種類の培地を用いた。

細胞の播種は、単層培養ではコラーゲンコートした直径 35 mm のディッシュに 0.2 または 1.0×10^6 個の細胞を懸濁した血清添加培地 (2 mL) を滴下することにより行った。三次元培養においては、担体 100 個を入れた遠心ボトルに、0.5 または 2.0×10^7 個の細胞を懸濁した培地 (5 mL) を入れ、CCI 法により細胞を播種したのち、50 個ずつを直径 100 mm のディッシュ (Falcon 1001) あるいは直径 60 mm のディッシュ (Falcon 1007) に入れて血清添加培地をそれぞれ 16.0 mL、もしくは 8.0 mL ずつ添加して培養を行った。ブタ胎仔肝臓細胞の PVF 樹脂への細胞の播種効率率は $72.8 \pm 7.2\%$ ($n = 9$) であった。培地交換は週 2 回行い、その際に得た培地サンプルは肝特異的機能を計測するまでの期間、 -80°C にて保存した。

4-2-3. DNA 量および肝細胞特異的機能の計測

マウス胎仔肝臓細胞の培養と同様に、細胞数の指標として Hoechst 33342 を用いた DNA 量の測定を行った。また、肝細胞に分泌されたアルブミンの濃度はサンドイッチ ELISA を用いて測定した。ブタアルブミンを測定する際は、1 次抗体に goat anti-pig albumin antibody (Bethyl Laboratories, TX)、2 次抗体に horseradish peroxidase-conjugated goat anti-pig albumin antibody (Bethyl Laboratories)、アルブミン標準液にはブタアルブミン (ICN Pharmaceuticals) を用いた。さらに、肝細胞により培地中に分泌された尿素の濃度はマウスの場合と同様の手法で測定した。

4-2-4. 胎仔肝細胞の分化・成熟度

培養胎仔肝細胞の分化・成熟度は、未成熟肝細胞の指標である α -fetoprotein (AFP) の mRNA の発現量を Northern blot 法で測定することにより確認した。培養したブタ胎仔肝臓細胞から、マウスの場合と同様の手法で total RNA を抽出し、5.0 μ g ずつ 1.2% アガロースゲルで電気泳動した。泳動終了後、紫外線照射により etidium bromide (Sigma) で染色された ribosomal RNA (rRNA) の存在を確認した。ただちに 20 倍濃度の standard saline citrate (SSC) バッファーでメンブレン (NEN Life Science Products, MA) にトランスファーして、紫外線を照射することにより RNA を固定した。次に、メンブレンを 55°C のハイブリダイゼーションバッファーに振漬して、15 分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、alkaline phosphatase で直接標識した AFP の DNA プローブ (10 ng/mL) を含むハイブリダイゼーションバッファー中にて 55°C で一晩振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。DNA プローブは、胎仔肝臓から抽出した total RNA から、RT-PCR によって得た cDNA をもとに作製した。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを洗浄し、プロット面に CDP-Star detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を添加して室温にて 5 分間静置し、余分な水分を取り除いたのちにフィルム (Amersham International, Buckinghamshire, UK) におよそ 2 時間露光して、シグナルを検出した。

4-2-5. 電子顕微鏡による観察

培地交換の際に中性緩衝ホルマリンで固定保存した PVF 樹脂は、マウスの場合と同様の手法で試料を作成し、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

4-2-6. 統計処理

全ての実験結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で示した。標本数が 3 つ以上のものに関して、培養 1 日目との比較は paired t-test により、また培地の違いによる比較は student's t-test により、危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意水準とした。

4-3. 実験結果

本研究では、PVF 樹脂を担体とするブタ胎仔肝臓細胞の三次元培養と、対照としてのコラーゲン・コートディッシュによる単層培養を異なる培地条件下で並行して行った。培地には WE 培地と、WE に OSM、LIF、もしくは cortisol を添加した計 4 種類の培地を用い、培地に添加した刺激因子が細胞の増殖や肝特異的機能に及ぼす影響について検討した。なお、ブタ胎仔肝臓細胞の培養では、予備的検討から細胞が良好に増殖することが予想されたため、三次元培養の高密度に播種する場合に限りマウスの場合の約 40% の播種密度で細胞を播種した。細胞の播種条件を表 4-1 に示す。

4-3-1. DNA 量測定による細胞数計測のための検量線

ブタ胎仔肝臓細胞の培養においても、細胞数の経時変化の指標として Hoechst 33342 を用いて DNA 量を計測した。細胞数と DNA 量の相関を調べるために、遊離直後のブタ胎仔肝臓細胞を用いて検量線を作製した結果を図 4-1 に示す。検量線作成の結果、ブタ胎仔肝臓細胞の場合にも細胞数と DNA 量とは良好な直線関係があり、細胞 1×10^6 個あたりで $11.3 \mu\text{g}$ と、マウスと同量の DNA が含まれていることがわかった。この結果から、ブタ胎仔肝臓細胞の場合にも、培養細胞数を DNA 量で算出できることが確かめられた。

4-3-2. 培地に WE を用いた培養

ブタ胎仔肝臓細胞の培養に WE 培地を使用した場合の DNA 量の経時変化を図 4-2 に、アルブミン分泌量の経時変化を図 4-3 に示す。

細胞数に関しては、単層培養では高密度と低密度のいずれの培養（●、○）においてもわずかに DNA 量は増加する傾向が見られた。三次元培養においても（■、□）、DNA

表 4-1. ブタ胎仔肝臓細胞の培養における細胞の播種条件

培養条件	播種密度	播種細胞数*	培地量 [mL]
単層培養	高密度 (H)	1.0	2.0
	低密度 (L)	0.2	2.0
三次元培養	高密度 (H)	10.0	16.0
	低密度 (L)	2.5	8.0

* 単層培養 [10^6 cells/dish]

三次元培養 [10^6 cells/ 0.4 cm^3 -PVF]

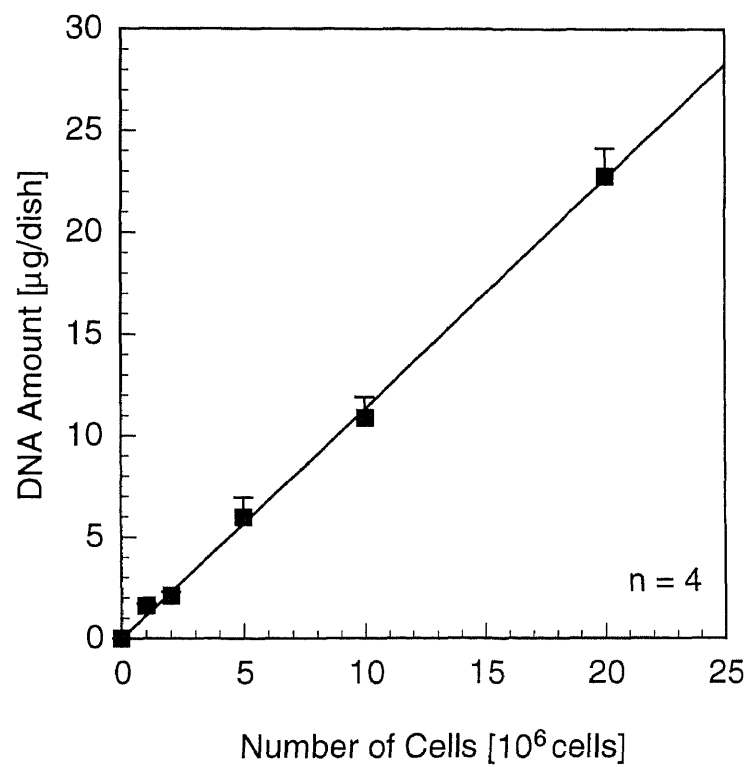


図 4-1. 遊離直後の胎仔肝臓細胞を用いた DNA 測定法の検量線

遊離直後のブタ胎仔肝臓細胞を用いて検量線を作成した結果、 1×10^6 個の細胞には $11.3 \mu\text{g}$ の DNA が含まれていることがわかった。(Mean \pm SEM)

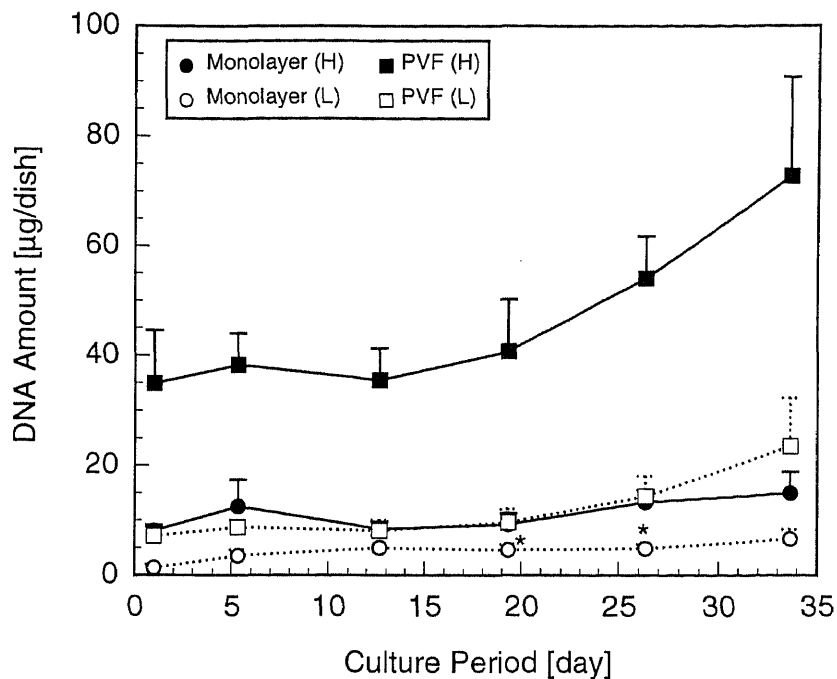


図 4-2. WE を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養における DNA 量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), $n=3$; ○, 単層培養 (低密度), $n=3$

■, 三次元培養 (高密度), $n=3$; □, 三次元培養 (低密度), $n=3$

培地に WE を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養では、三次元培養において DNA 量は良好に増加する傾向が見られた。(Mean \pm SEM, $p < 0.05$ vs. Day 1)

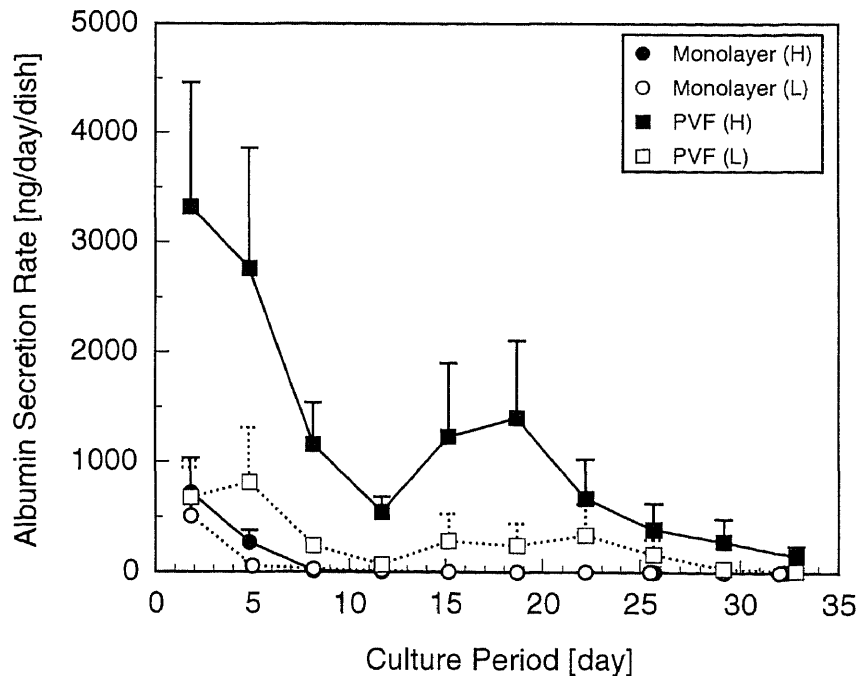


図 4-3. WE を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), $n=3$; ○, 単層培養 (低密度), $n=3$

■, 三次元培養 (高密度), $n=3$; □, 三次元培養 (低密度), $n=3$

培地に WE を用いたブタ胎仔肝臓細胞の単層培養では、10 日以降は活性は認められなかった。三次元培養の高密度に播種したものではアルブミン分泌量は安定しなかったものの、20 日頃まではマウス胎仔肝臓細胞よりも値は高い傾向であった。(Mean \pm SEM)

量は徐々に増加する傾向が認められたことから、ブタ胎仔肝臓細胞の培養ではマウスの細胞の場合とは異なり基本培地を用いても細胞は増殖することがわかった。

アルブミン分泌量は（図 4-3）、単層培養（●、○）では培養開始直後に急激に低下して、培養 10 日以降は活性が認められなかったのに対して、三次元培養（■、□）では単層培養よりも良好に維持された。三次元培養の高密度に播種したもの（■）では培養 12 日目までにアルブミン分泌量が急激に低下する傾向があったにもかかわらず、培養 18 日目までは活性は回復し、このときの値はおよそ $1.4 \mu\text{g/day/dish}$ であった。低密度に播種したもの（□）でも同じような傾向が認められたが、培養 20 日頃の分泌量はおおよそ 300 ng/day/dish であった。ブタ胎仔肝臓細胞のアルブミン分泌量は安定しなかったものの、マウス胎仔肝臓細胞の三次元培養の結果（図 2-5、約 400 ng/day/dish ）と比較すると、活性が回復した培養 18 日目の値は約 3 倍に達することがわかった。また、低密度に播種した場合でも、マウスの細胞を用いたときとは異なりアルブミンが分泌されていることがわかった。

4-3-3. WE に OSM を添加した培養

マウス胎仔肝臓細胞の培養結果から、OSM は細胞の増殖やアルブミン分泌能の発現を促進することが明らかになった。ブタ胎仔肝臓細胞の培養においても OSM は同様の効果を示すことが期待されたことから、OSM を用いた培養を行った。ここで、ブタ OSM は市販されていないため、培養にはブタ OSM と比較的ホモロジーが高いヒト OSM を用いた。

OSM 添加培地を用いた培養における DNA 量の経時変化を図 4-4 に示す。細胞数の傾向は、WE を用いた場合（図 4-2）とほとんど変わらなかったことから、ヒト OSM を添加することによる明確な効果は認められなかった。ただし、細胞を低密度に播種し

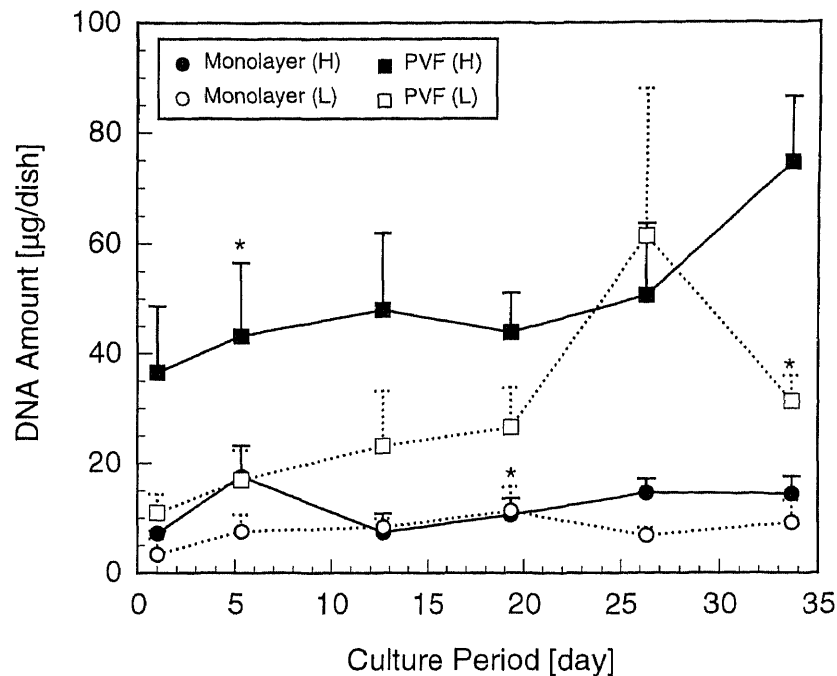


図 4-4. WE+OSM を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養における DNA 量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+OSM を用いた培養において、DNA 量の経時変化は WE を用いた場合とほとんど変わらない傾向を示した。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1)

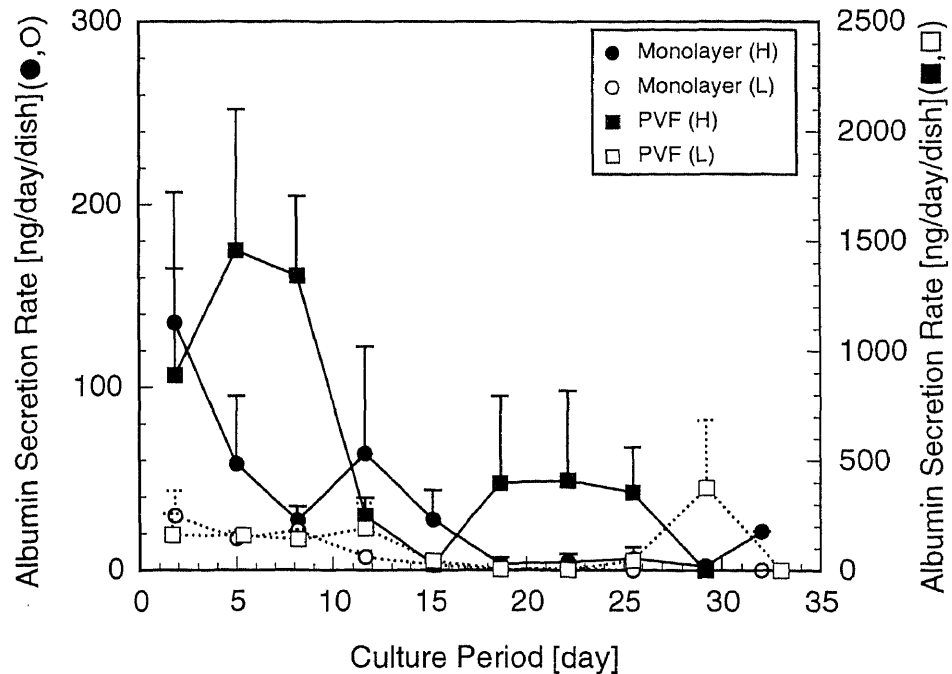


図 4-5. WE+OSM を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

●, 単層培養 (高密度), n=3; ○, 単層培養 (低密度), n=3

■, 三次元培養 (高密度), n=3; □, 三次元培養 (低密度), n=3

培地に WE+OSM を用いた培養では、いずれの培養においても WE を用いた培養よりもアルブミン分泌量は低下する傾向が見られた。(Mean ± SEM)

た三次元培養（□）においては、WE を用いたときに比べて培養終了時の DNA 量はやや多かった。マウス細胞の培養密度の結果（図 2-8）と比較すると、単層培養における DNA 量はマウス細胞よりも有意に高かったものの（ $p < 0.05$ vs. マウス単層培養（33 日目））、三次元培養では到達した細胞数に大きな差はなかった。

次に、アルブミン分泌能に関しては（図 4-5）、単層培養において高密度に播種したもの（●）では、アルブミン分泌量は少ないものの 2 週間以上にわたって分泌された。三次元培養では、高密度で播種したもの（■）は WE で培養した場合と同様の傾向を示したものの、その分泌量は WE の 1/2 以下であったことから、OSM を添加することによる効果は認められなかった。

4-3-4. WE に LIF を添加した培養

ブタ胎仔肝臓細胞の培養においても、マウス胎仔肝臓細胞の場合と同様に LIF を培地に添加した培養を行った。この実験では、ブタ細胞に OSM を添加した実験と同じ理由によりヒト LIF を用いた。

培養細胞の DNA 量の経時変化を図 4-6 に示す。単層培養（●、○）では、WE や WE+OSM を用いた培養と同様に培養期間を通じて徐々に DNA 量が増加する傾向が見られた。三次元培養（■、□）では値がかなりばらついたものの、高密度と低密度のいずれの条件においても全体として DNA 量は増加する傾向を示した。しかしながら、これらの DNA 量は WE や WE+OSM での培養と比較すると 1/2 程度であったことから、細胞の維持に関して LIF は有効ではないと考えられた。

アルブミン分泌能に関しても（図 4-7）、LIF は効果的な作用を示さなかった。単層培養（●、○）では、培養開始直後を除いてアルブミンは分泌されなかった。高密度に播種したもの（●）では、培養開始直後のアルブミン分泌量は約 800 ng/day/dish と高値で

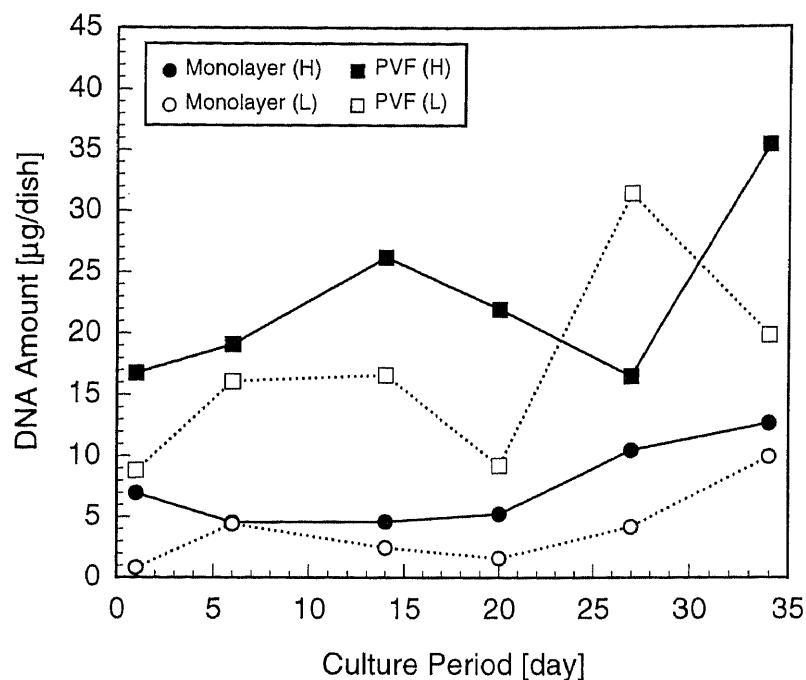


図 4-6. WE+LIF を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養における DNA 量の経時変化

- , 単層培養 (高密度), n=1; ○, 単層培養 (低密度), n=1
- , 三次元培養 (高密度), n=1; □, 三次元培養 (低密度), n=1

培地に WE+LIF を用いた培養では、DNA 量は全ての条件で増加する傾向が見られたものの WE や WE+OSM を用いた場合と比較すると低値であった。

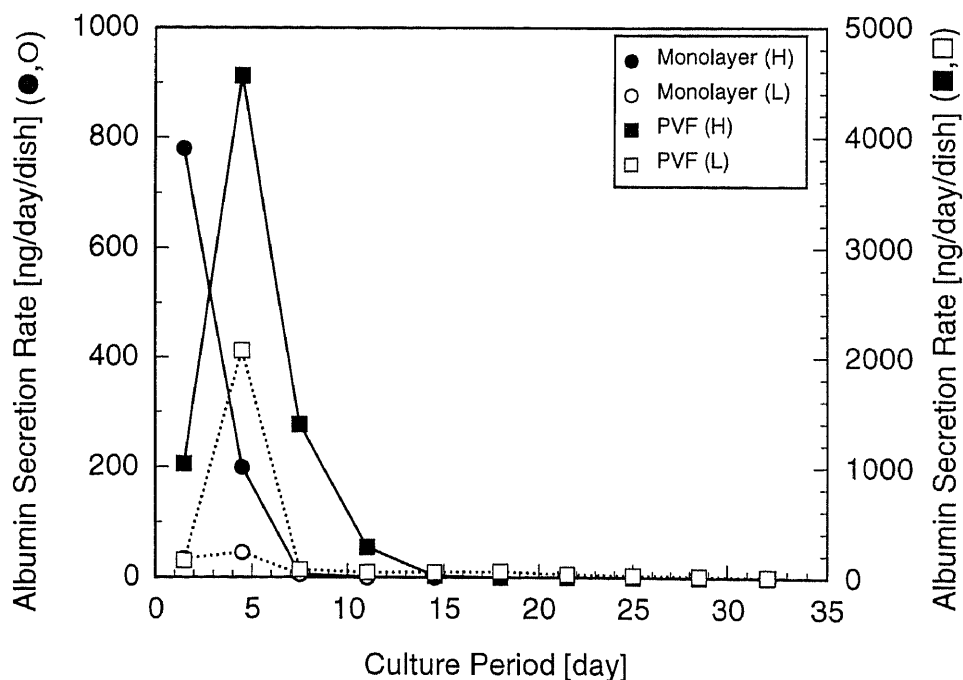


図 4-7. WE+LIF を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

- , 単層培養 (高密度), n=1; ○, 単層培養 (低密度), n=1
- , 三次元培養 (高密度), n=1; □, 三次元培養 (低密度), n=1

培地に WE+LIF を用いた培養では、特に三次元培養において培養開始直後にアルブミン分泌量が多かった。しかし、いずれの条件でも活性は長期的には維持されなかった。

あったにもかかわらず、その後急激に減少して、培養 7 日目以降は全く分泌されなかった。三次元培養（■、□）においては、培養開始直後の培養 5 日目に、高密度に播種したもの（■）で約 $4.5 \mu\text{g/day/dish}$ 、低密度（□）で約 $2.0 \mu\text{g/day/dish}$ とアルブミン分泌量は高い値を示したものの、その後は急激に低下して、培養 3 週間目からはアルブミンを分泌しなかった。以上の結果から、WE+LIF を用いた培養では、細胞のアルブミン分泌能は維持されず、LIF を添加することは長期間培養には適当でないことがわかった。

4-3-5. WE に cortisol を添加した培養

4-3-3 項と 4-3-4 項の培養の結果から、ヒト OSM やヒト LIF は、ブタ胎仔肝臓細胞の培養における細胞の増殖や機能の維持にあまり有効ではないことがわかった。そこで、成熟肝細胞の培養に効果があることが知られており、副腎皮質ホルモンの一種である cortisol を培地に添加した培養を行った。

このときの DNA 量の経時変化を図 4-8 に示す。単層培養（●、○）においてはいずれの培養条件においても DNA 量が増加する傾向が見られ、特に高密度に播種したもの（●）では、培養後期に急激に DNA 量が増加した。三次元培養（■、□）でも全体的に細胞は増加する傾向を示し、培養後半での DNA 量は WE で培養したもの（図 4-2）とほぼ同等であった。

アルブミン分泌量に関しては（図 4-9）、単層培養（●、○）では cortisol を添加することによる効果は認められず、培養初期に活性が低下して、その後は培養期間を通して分泌は認められなかった。一方、三次元培養では、培養開始直後からアルブミンの分泌量の変動がかなり大きいものの、高密度に播種したもの（■）では $1.0\sim 2.0 \mu\text{g/day/dish}$ の分泌量が長期間にわたって維持された。実験数は不十分なものの、この活性は WE を用いた場合よりも高い値であった。したがって、cortisol は細胞数の増加にはあまり

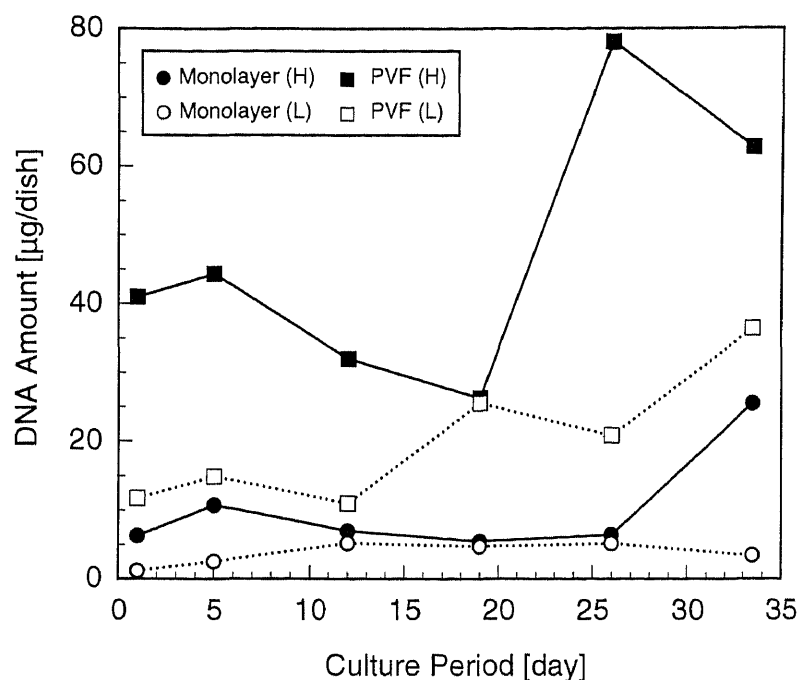


図 4-8. WE+COR を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養における DNA 量の経時変化

- , 単層培養 (高密度), n=2; ○, 単層培養 (低密度), n=2
- , 三次元培養 (高密度), n=2; □, 三次元培養 (低密度), n=2

培地に WE+COR を用いた培養では、全ての条件で培養終了時の DNA 量は培地に WE を用いた場合と同等であった。

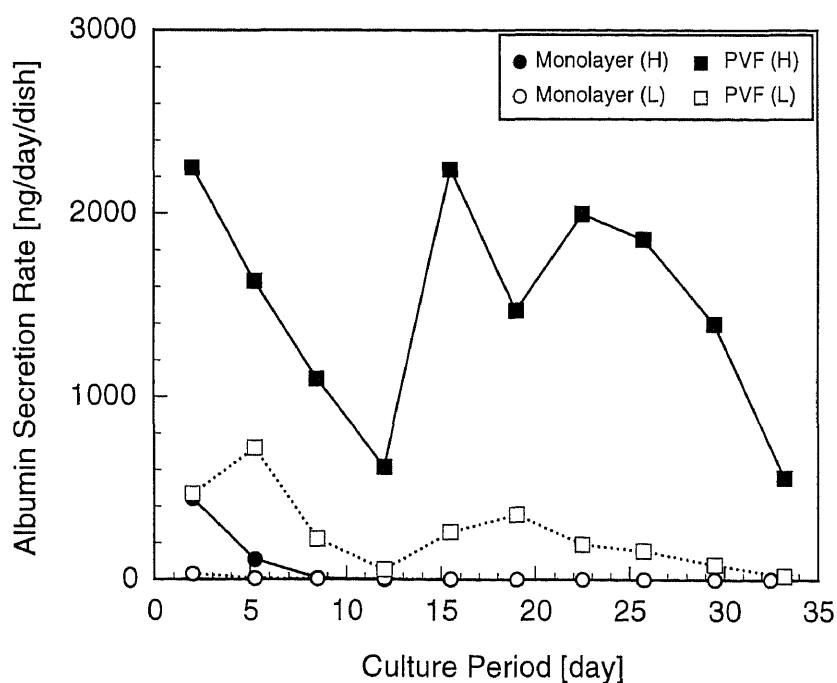


図 4-9. WE+COR を用いたブタ胎仔肝臓細胞の培養におけるアルブミン分泌量の経時変化

- , 単層培養 (高密度), n=2; ○, 単層培養 (低密度), n=2
- , 三次元培養 (高密度), n=2; □, 三次元培養 (低密度), n=2

培地に WE+COR を用いた培養では、三次元培養において長期間にわたってアルブミン分泌が維持された。高密度に播種した培養では WE よりも高い活性を示す傾向が認められた。

影響しないものの、細胞あたりのアルブミン分泌活性の向上には効果がある可能性があると考えられた。

ブタ胎仔肝臓細胞の培養では、いずれの培養条件下においても細胞は比較的安定に維持された。また、長期間にわたって細胞のアルブミン分泌能を維持できる可能性があったのは cortisol のみであり、OSM や LIF を添加した場合にはアルブミン分泌能はむしろ低下する傾向が見られた。

4-3-6. 尿素合成能

マウス胎仔肝臓細胞を用いた培養と同様に、アルブミン分泌能以外の肝細胞の機能の指標として、ブタ胎仔肝細胞の尿素窒素合成量を計測した。単層培養と三次元培養の高密度培養における尿素窒素の積算値を図 4-10 と図 4-11 に示す。

単層培養において（図 4-10）培養 10 日頃までの初期には、培地に WE を用いた場合（●）よりも添加物を加えたもの（▲、■、◆）の方が多くの尿素を合成していた。WE+LIF を用いた培養（■）では、培養 1 週間以降に活性は低下して、全ての培地条件の中でも活性が低かった。これは、用いた培地条件の中では WE+LIF での DNA 量が最も低かった事によると考えられた。WE（●）や WE+OSM（▲）を用いた培養では、培養 10 日目付近を境に活性はわずかに低下したものの、その後は培養期間を通して安定した合成量を示した。一方、WE+COR（◆）では培養期間を通して活性が徐々に低下する傾向が認められた。

三次元培養において（図 4-11）、培地に WE（●）、WE+OSM（▲）と WE+COR（◆）を用いた培養では、アルブミン分泌量の結果と同様に活性がかなり変化していた。したがって、肝細胞の活性が周期的に変動している可能性が考えられた。三次元培養に

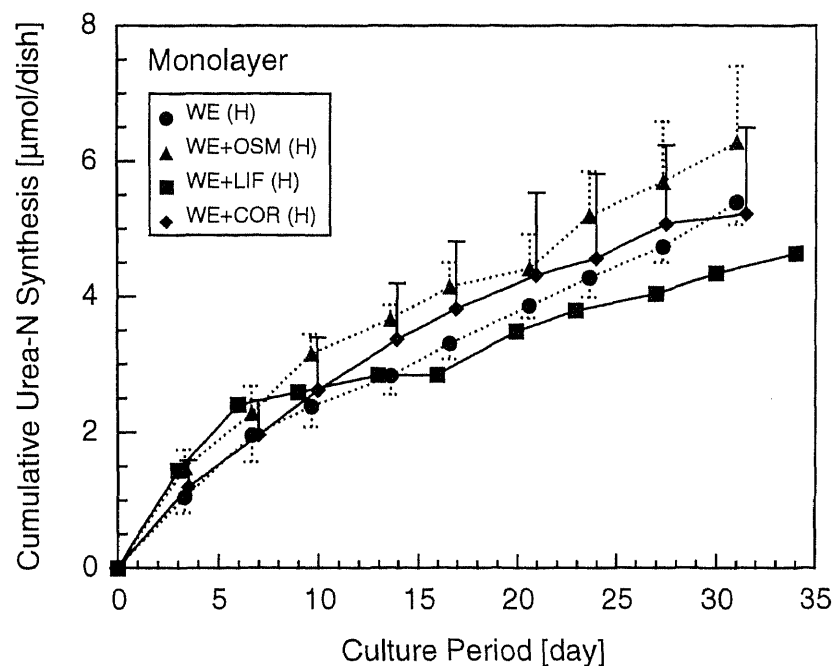


図 4-10. ブタ胎仔肝臓細胞の単層培養における尿素合成量の積算値

●, WE (高密度), n=3; ▲, WE+OSM (高密度), n=3

■, WE+LIF (高密度), n=1; ◆, WE+COR (高密度), n=2

尿素合成量は培養期間を通して徐々に低下する傾向が見られたものの、WE や WE+OSM では比較的安定な活性が得られた。(Mean ± SEM)

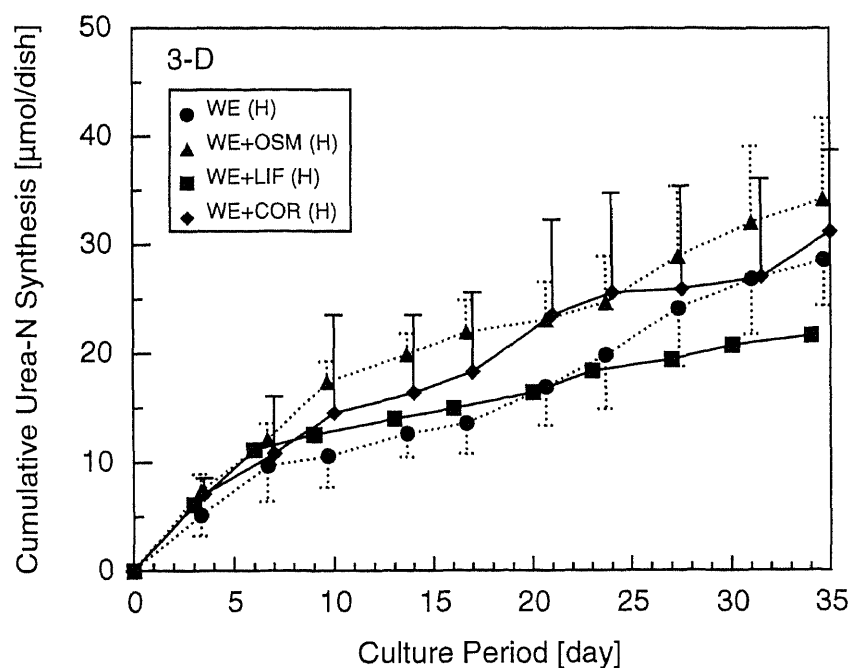


図 4-11. ブタ胎仔肝臓細胞の三次元培養における尿素合成量の積算値

●, WE (高密度), n=3; ▲, WE+OSM (高密度), n=3

■, WE+LIF (高密度), n=1; ◆, WE+COR (高密度), n=2

尿素合成量は、アルブミン分泌能の結果と同様に周期的に変化していた。活性の傾向は単層培養の結果と同様であった。(Mean ± SEM)

における尿素合成量は、単層培養と同様の傾向を示した。つまり、WE+LIF を用いた培養（■）での尿素合成量は最も低く、他の培地条件では培養 10 日目頃から活性は少し低下したものの、その後は比較的安定に維持された。また、マウス胎仔肝臓細胞を用いた場合には（図 2-13、図 3-6）、活性が一定か上昇する傾向が見られたのに対し、ブタの細胞は徐々に低下する傾向が見られた。

4-3-7. 培養ブタ胎仔肝細胞の分化・成熟度の評価

ブタ胎仔肝臓細胞の三次元培養において、肝細胞の分化の指標となるアルブミン分泌能は低下する傾向が見られたものの、長期間にわたって維持されていた。そこで、マウス胎仔肝臓細胞の場合と同様に、培養細胞が分化・成熟しているのかどうかを確認するために、AFP の mRNA 量の変化を測定した。この実験では、PVF 樹脂上で培養した胎仔肝臓細胞から mRNA を抽出し、AFP の発現量の経時変化を Northern blot 法で調べた。

培地に WE を用いた場合の AFP の mRNA 発現量を図 4-12 に示す。この図から明らかのように、培養 4 日目には AFP の mRNA が大量に発現していたが、その後は徐々に発現量が減少して、培養 25 日目以降には全く認められなかった。アルブミン分泌量の結果（図 4-3）とあわせて考えれば、アルブミンがまだ十分に分泌されている培養 25 日目において、AFP の発現が認められなくなったことから、胎仔肝細胞が培養期間の経過に伴って徐々に分化・成熟している可能性が示唆された。

4-3-8. 電子顕微鏡による観察

三次元培養されて担体に固定化されたブタ胎仔肝臓細胞の電子顕微鏡写真を図 4-13 に示す。ここで、図 4-13-a、b は培地に WE を用いた場合のもの、図 4-13-c、d は培地

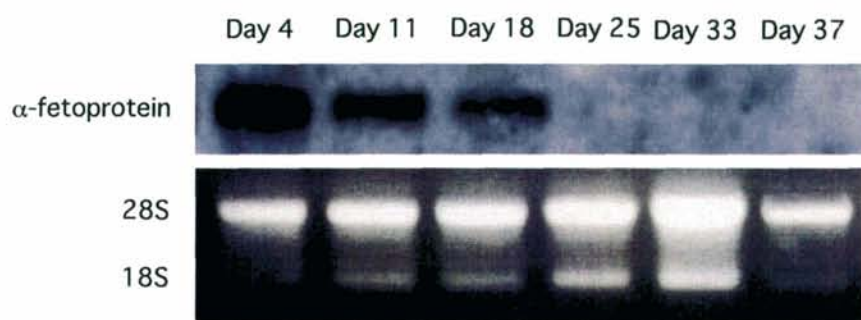


図 4-12. WE を用いた三次元培養における胎仔肝細胞の分化・成熟度の評価

培養期間が経過するにつれて、胎仔肝臓細胞の α -fetoprotein の発現量が減少した。発現が認められなくなった培養 25 日目にはアルブミンは分泌されていたことから、細胞が分化・成熟している可能性が示唆された。

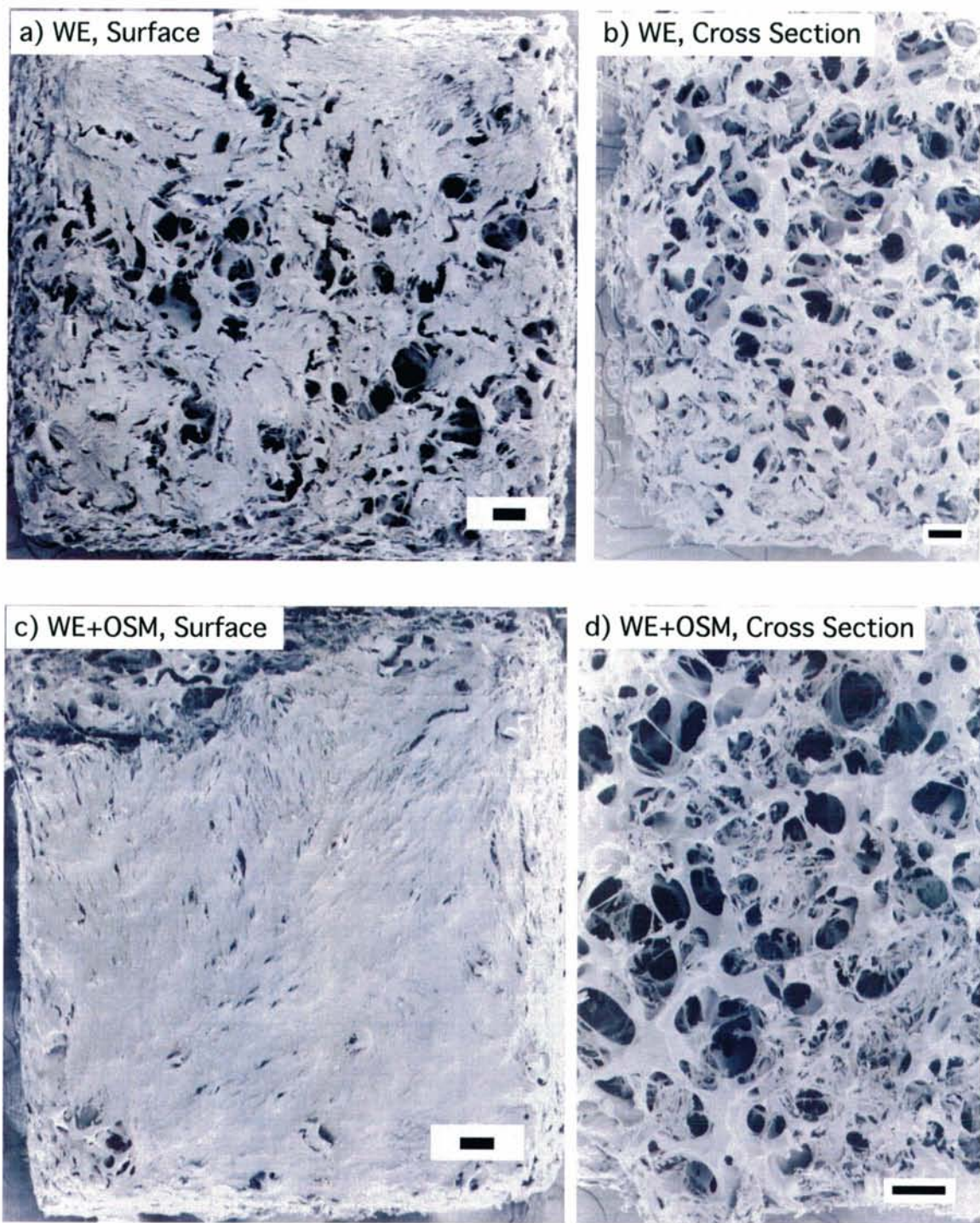


図 4-13. ブタ胎仔肝臓細胞の三次元培養における細胞の電子顕微鏡写真（培養 41 日目）
 a) WE を用いた培養、担体表面 b) WE を用いた培養、割断面
 c) WE+OSM を用いた培養、担体表面 d) WE+OSM を用いた培養、割断面

担体表面は細胞や大量の細胞外マトリックスで覆われていた。また、割断面の写真から担体の中心付近にまで細胞が侵入していることがわかった。Bars; 100 μ m.

に WE+OSM を用いた場合のもので、いずれも培養 41 日目のものである。さらに図 4-13-a、c は PVF 樹脂の表面、図 4-13-b、d は PVF 樹脂の断面の表面付近の写真である。担体の表面は（図 4-13-a、c）、ほぼ全面が細胞と ECM で覆われており、マウス胎仔肝臓細胞の培養に比べて細胞が担体上で均一に分布していることがわかった。担体の断面の写真（図 4-13-b、d）からは、細胞が担体の内部にまで入り込んで培養されていることが確認された。また、OSM を添加した場合には、添加しなかった場合よりも多くの細胞が存在していた。

4.4. 考察

本章では、ブタ胎仔肝臓細胞を用いた三次元培養を行った結果、細胞が比較的良好に増殖することがわかった。細胞刺激因子として添加した OSM や LIF は肝細胞の機能の発現には効果が認められなかったのに対し、cortisol を添加することでアルブミン分泌能を長期間にわたって維持できることがわかった。

4.4-1. ヒト OSM とヒト LIF、および cortisol の影響

第 2 章および第 3 章でのマウス胎仔肝臓細胞の培養では、OSM や LIF を添加することによってアルブミン分泌能の改善が認められたのに対し、ブタ胎仔肝臓細胞の培養では、これらを添加することによる効果は認められなかった。この原因の一つとして、ブタ胎仔肝臓細胞の培養にヒトのサイトカインを使用したことが考えられる。ブタ OSM のアミノ酸配列はまだ報告されていないものの、ブタ LIF のアミノ酸配列はヒトの配列とおおよそ 75%しか一致しない。マウス OSM とヒト OSM のアミノ酸配列は約 50%しか一致しないことから、ブタとヒトの場合にも一致する確率は低いと思われる。したがって、ブタ胎仔肝臓細胞にこれらの細胞刺激因子が認識されにくかった、あるいはうまく結合されなかったために、その効果が現れなかったのではないかと考えられる。

グルココルチコイドの一種である cortisol は、dexamethasone と同様に副腎皮質ホルモンである。Dexamethasone は肝特異的機能の亢進に効果があることが既に報告されていることから (Isom *et al.*, 1985)、通常の成熟肝細胞の培養には dexamethasone を添加した培地が広く用いられている。一方、成熟肝細胞における cortisol の効果についての報告は数少ないものの、cortisol はラット成熟肝細胞の培養において糖タンパクなどの分泌物を増加させる効果を持つことや (Wira and Colby, 1985)、胎仔または新生児ラット肝細胞と上皮細胞との coculture においてアルブミン分泌能を高いレベルで維持できるこ

とが確認されている (Lescoat *et al.*, 1985)。本研究では、基本培地に dexamethasone が含まれており、その上さらに cortisol を添加したことによってアルブミン分泌能は上昇した。Dexamethasone は濃度依存的に肝細胞分泌物の合成や、P450 の mRNA の発現を促進することが報告されていることから (Wira and Colby, 1985; Kocarek *et al.*, 1994)、胎仔肝細胞のアルブミン分泌におけるグルココルチコイドの至適濃度は本研究の基本培地中の dexamethasone 濃度 ($0.1 \mu\text{M}$) よりもかなり高いために、cortisol の添加により活性がさらに上昇したものと考えられた。

ブタ胎仔肝臓細胞の培養において cortisol は肝特異的機能の発現に有効ではあったものの、マウス胎仔肝臓細胞の培養における OSM の効果ほど顕著ではなかった。今後は、ブタ胎仔肝臓細胞の機能を改善することのできる因子を模索するとともに、サイトカインや増殖因子の効果を確認するためにはヒト由来の何らかの細胞を使用する必要があると思われた。

4-4-2. マウスの細胞とブタの細胞との比較

本研究では、マウスおよびブタ胎仔肝臓細胞の培養を行った。その結果、三次元培養において高密度に細胞を播種して WE で培養した場合には、播種細胞数はブタの細胞の方が少なかったにもかかわらず、培養初期のアルブミン分泌能 (図 2-5、図 4-3) や尿素合成能 (図 2-13、図 4-11) はブタ胎仔肝臓細胞の方が優れていた。また、細胞の増殖能もブタの方が高く (図 4-2)、WE 中でも細胞が増殖する傾向が見られた。このように、ほぼ同じ条件で培養を行った場合にも、細胞の増殖や肝機能の発現は、細胞種によってかなり異なることが示された。

ブタ胎仔肝細胞の肝機能に関してほとんど報告されていないため、マウスの胎仔肝細胞との機能を直接比較した報告はない。ただし、ラット、ブタやヒトなどの成熟肝

細胞の肝特異的機能を比較した報告はいくつかある (Donato *et al.*, 1999; Vilei *et al.*, 2001)。Vilei らは、培養 2 日目のブタ、ラットおよびヒトの成熟肝細胞を比較して、bilirubin 抱合活性や diazepam 代謝能は、ヒトやラットの肝細胞よりもブタ肝細胞の方が優れているということを明らかにした。さらに、尿素合成能に関しても、ブタやヒトの肝細胞の方がラットよりも活性が高いことが報告されている。この結果は、本研究において培養初期のブタとマウスの細胞の尿素合成能を比較した場合に、ブタの肝細胞の方が活性が高かったことと一致する。

多孔質の PVF 樹脂を用いて三次元培養したマウスおよびブタの胎仔肝臓細胞を電子顕微鏡により観察したところ (図 2-15、図 4-13)、マウスの細胞よりもブタの細胞の方が担体の表面は大量の ECM に覆われていることが確認された。培養系において、いかに生体内に近い環境を構築するかということは、培養肝細胞の増殖や機能に大きく影響する。ここで、ECM は細胞の接着・移動や形態に大きく関与することから、微小環境の形成、さらには細胞の増殖や機能に極めて重要な因子である。肝臓では主に非実質細胞が ECM を産生していることから、肝細胞と非実質細胞との coculture も行われている (Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983; Morin and Normand, 1986; 三好ら, 1994)。これらの培養では、肝細胞が 2 週間以上も良好にアルブミン分泌量を維持できることが報告されている。本研究で行った胎仔肝臓細胞の培養も coculture 系であり、マウスの細胞の培養では長期間にわたって安定したアルブミン分泌能が維持されたものの、ブタの細胞では ECM は大量に分泌されていたにもかかわらず活性は長期間は維持されなかった。ブタ胎仔肝臓細胞の培養では、細胞数は培養期間を通して増加する傾向にあったことから、ブタ細胞の場合には非実質細胞が過剰に増殖したためにアルブミン分泌能が下降したのではないかと考えられた。今後、どのような種類の細胞が増殖しているのかを解析する必要がある。

4-5. 小括

胎仔肝臓細胞を用いる培養系をスケールアップすることを目的として、ブタ胎仔肝臓細胞の培養を行った。培地に細胞刺激因子として OSM、LIF、あるいは cortisol を添加し、これらの因子が細胞の増殖や肝特異的機能に及ぼす効果について検討した結果、以下のような結論が得られた。

- 1) ブタ胎仔肝臓細胞の培養では、いずれの培養条件においても細胞は良好に増殖する傾向を示した。
- 2) ブタ胎仔肝臓細胞のアルブミン分泌能や尿素合成能に及ぼすヒト OSM、およびヒト LIF の効果は認められなかった。それに対して、cortisol はアルブミン分泌能を亢進する効果が認められた。
- 3) マウスとブタの胎仔肝臓細胞の代謝機能と比較すると、培養初期にはブタ胎仔肝臓細胞の方が活性が高かったものの、活性の維持についてはマウスの細胞の方が良好であった。
- 4) 以上の結果から、ブタ胎仔肝細胞を用いる三次元培養系については、今後、肝特異的機能をより安定に維持できるような細胞刺激因子を模索することにより、バイオ人工肝臓に応用できると考えられた。

第 5 章 マウス胎仔肝臓細胞の培養における VEGF の分泌

5-1. 緒言

さまざまな臓器や組織の再生において、これらに栄養や酸素を供給するための血管系の新生・再生は欠かせない。血管新生とは新しい血管ネットワークが形成される現象で、血管新生を抑制する因子と促進する因子とのバランスによって制御されており、促進因子が抑制因子を上回ったときに血管新生が開始されると考えられている。促進因子のうち、各種成長因子としては vascular endothelial growth factor (VEGF) をはじめ basic fibroblast growth factor (bFGF)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、epidermal growth factor (EGF) などが挙げられ (Klagsbrun and D'Amore, 1991; Folkman and Shing, 1992; Ferrara and Davis-Smyth, 1997)、これらの因子の中でも VEGF は中心的な役割を果たす促進因子である。われわれの研究室においても、腫瘍を播種したラットでは血清中への VEGF の分泌が亢進しており、血管新生が誘導されていることを報告している (Miyoshi and Ohshima, 2001)。

一方、VEGF は胎生初期から発現し、胎児の発生を調節するうえでも重要な因子である。VEGF 遺伝子をノックアウトしたマウス (VEGF (+/-)) では、VEGF の産生量が減少するだけでも血管形成が強く障害され、致死の変異をきたすことが報告されている (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996)。それに対して、VEGF を過剰発現させたマウスでは、血管形成異常を生じることも報告された (Miquerol *et al.*, 2000)。

VEGF の肝臓における作用については、肝臓は血液の流れる多数の小管、すなわち類洞血管が張り巡らされた臓器であり、肝臓の発生段階や肝再生の際には肝臓でも VEGF が発現していることが明らかとなっている (Mochida *et al.*, 1996; Lagercrantz *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2001; Gouysse *et al.*, 2002)。本研究では培養に胎児期の肝臓細胞を用いており、第 2 章の結果において、これらの細胞は培養期間中に生体内の組織の

おり、第 2 章の結果において、これらの細胞は培養期間中に生体内の組織のような三次元構造を形成していたことから、VEGF が発現されている可能性が高いと考えられた。そこで、本章では培養マウス胎仔肝臓細胞の培養液中への VEGF の分泌について調べた。

5-2. 実験方法

5-2-1. 胎仔肝臓細胞の取得および培養条件

実験に用いたマウス胎仔肝臓細胞は、第 2 章と同様の方法で取得した。培養実験は、コラーゲンコート・ディッシュによる単層培養と PVF 樹脂を用いる三次元培養を行い、高密度に播種した条件で培養を行った。このとき、三次元培養における播種細胞数が異なっている以外は第 2 章と同じ条件にて培養を行った。培養に用いた培地は、基本培地である α MEM と WE に、それぞれ OSM を添加した計 4 種類の培地を用いた。培地交換は週に 2 回行い、培地交換の際には培養上清をサンプリングし、VEGF 分泌量を測定するまで -80°C で保存した。

5-2-2. 培地中の VEGF の計測

培養中に分泌された VEGF はサンドイッチ ELISA により計測した。測定にはマウス VEGF 測定用のキット (Quantikine™ M; R&D systems、MN) を用い、商品添付のプロトコールに従って測定した。

5-2-3. 培養細胞の観察

胎仔肝臓細胞の長期培養における形態を観察するために、細胞を培養フラスコに播種して培養を行った。細胞は胎生 12 日目のものを用い、 1.0×10^7 個の細胞を 75 cm^2 のフラスコ (Falcon) に播種し、WE 培地を 15 mL 添加して培養を行った。培養細胞は位相差顕微鏡 (TE300; Nikon、東京) を用いて観察した。

5-2-4. 統計処理

全ての実験結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で示した。培養 1 日目との比較

は paired t-test により、また培地の違いによる比較は student's t-test により、危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) を有意水準とした。

5-3. 実験結果

5-3-1. 培養胎仔肝臓細胞の VEGF 分泌能の経時変化

本章での培地条件と播種細胞数を表 5-1 に、また培養胎仔肝臓細胞の単層培養における VEGF の分泌量の経時変化を図 5-1 に示す。培地に基本培地 (α MEM、WE) を用いた培養 (□、○) では、培養 2 週間目以降は培養期間の経過に伴い徐々に分泌量が低下する傾向が見られた。また、培地に α MEM を用いた培養 (□) の方が WE (○) よりも VEGF の分泌活性がわずかに高かった。一方、OSM を添加した培養 (■、●) では VEGF の分泌活性は徐々に上昇する傾向が認められ、培養期間を通じて良好に維持された。培地に WE+OSM を用いた場合には、WE と比較して VEGF 分泌能が有意に上昇した。OSM 添加培地ではいずれの培地でも培養終了時には約 200 pg/day/dish 以上の分泌量が得られており、OSM 添加培地では基本培地の違いによる分泌量への影響はほとんど認められなかった。

次に、三次元培養における VEGF 分泌量の経時変化を図 5-2 に示す。三次元培養では、培地に OSM を添加しなかった場合 (□、○) には培養 9 日目までは分泌量がわずかに増加したものの、その後は徐々に減少する傾向が見られた。培養 9 日目の時点で、培地に WE を使用したもの (○) は、 α MEM (□) よりも高い活性を示したものの、培養終了時点では同程度の分泌量にまで低下した。培地に OSM 添加培地を用いた場合 (■、●) には、基本培地の結果と同様に培養 9 日目までは活性は増加する傾向が見られた。特に α MEM+OSM では培養 1 日目から急激に活性が増加した。その後は、測定値のばらつきがかなりあったものの分泌量はわずかに減少する傾向を示し、培養終了時点ではいずれの培地でもおよそ 300 pg/day/dish の分泌量を示した。なお、 α MEM+OSM (■) と WE+OSM (●) を比較すると、 α MEM+OSM の方が多くの VEGF を分泌する傾向にあった。

表 5-1. 培地の種類と播種条件

培養条件	培地	播種細胞数*
単層培養	αMEM	1.00 (n=3)
	αMEM+OSM	1.00 (n=3)
	WE	1.00 (n=3)
	WE+OSM	1.00 (n=3)
三次元培養	αMEM	23.4 (n=3)
	αMEM+OSM	20.9 (n=3)
	WE	23.6 (n=3)
	WE+OSM	22.5 (n=3)

* 単層培養 [10^6 cells/dish]

三次元培養 [10^6 cells/ 0.4 cm^3 -PVF]

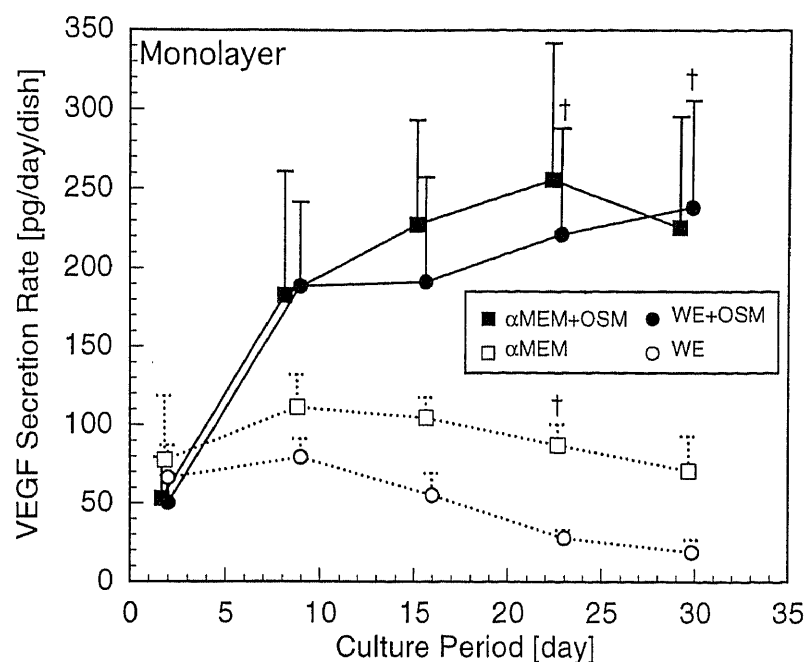


図 5-1. マウス胎仔肝臓細胞の単層培養における VEGF 分泌量の経時変化

■, αMEM+OSM, n=3; □, αMEM, n=3
●, WE+OSM, n=3; ○, WE, n=3

単層培養における VEGF 分泌量は、基本培地では徐々に低下する傾向が見られた。OSM を添加すると活性は上昇し、安定した分泌量が保たれた。(Mean ± SEM, † $p < 0.05$ vs. WE)

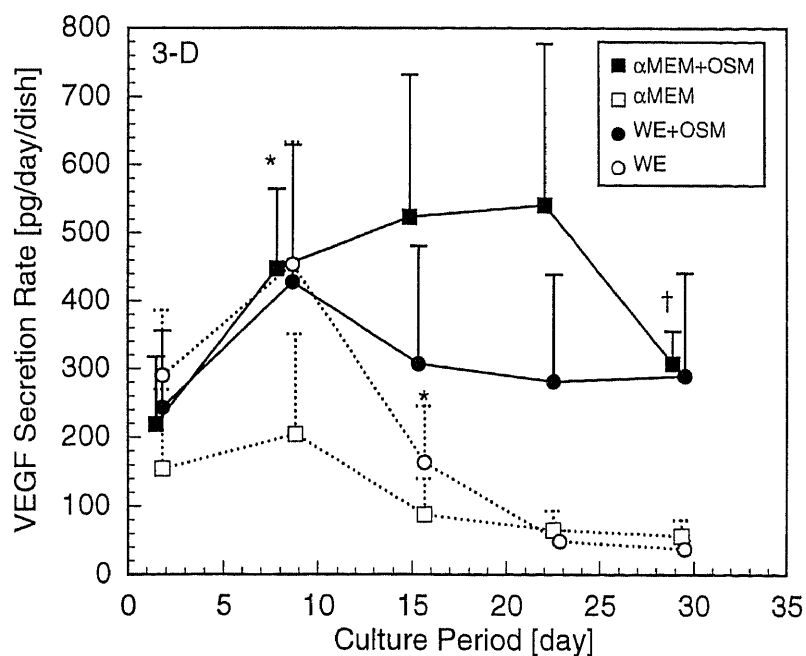


図 5-2. マウス胎仔肝臓細胞の三次元培養における VEGF 分泌能の経時変化

■, αMEM+OSM, n=3; □, αMEM, n=3
●, WE+OSM, n=3; ○, WE, n=3

三次元培養における VEGF 分泌量は、培養初期に増加したものの、その後は次第に低下した。培地に OSM を添加した場合の方が添加しなかった培養よりも高い活性を示す傾向があった。(Mean ± SEM, * $p < 0.05$ vs. Day 1; † $p < 0.05$ vs. αMEM)

以上の結果から、マウス胎仔肝臓細胞の培養において VEGF が分泌されていることが確認された。培地への VEGF の分泌量は、ディッシュによる単層培養よりも PVF 樹脂による三次元培養の方がわずかに高かったものの、播種細胞数あたりの活性は単層培養の方が高いことが示された。さらに、培地に OSM を添加した培養では単層培養、三次元培養ともに VEGF の分泌が亢進され、OSM を添加しなかった場合の 3 倍以上の分泌活性が認められた。

5-3-2. 単層培養された細胞の位相差顕微鏡による観察

フラスコにて長期間培養した胎仔肝臓細胞の位相差顕微鏡写真を図 5-3 に示す。写真は胎仔肝臓細胞を WE 培地でおおよそ 7 ヶ月培養したフラスコの底に接着していた細胞と（図 5-3-a）、とその拡大像（図 5-3-b）である。長期間培養を行うと、細胞は徐々に図 5-3-a のような大きなコロニーを形成した。コロニーには、明るく光る小さくて丸い形状をした細胞や、暗い色調の細胞など種々の細胞が存在しており、また微小血管状の構造が細胞の間をぬって放射状にのびているのが確認された。また、一部の細胞はスフェロイド状の凝集塊を形成しているのが観察された。拡大像から（図 5-3-b）、微小血管様の構造に接するように核の大きな肝細胞様の細胞が存在していることがわかった。したがって、長期間培養することにより、単層培養においても類洞血管内皮細胞が管状構造を構築して生体の肝臓のような微小環境を形成するものと考えられた。

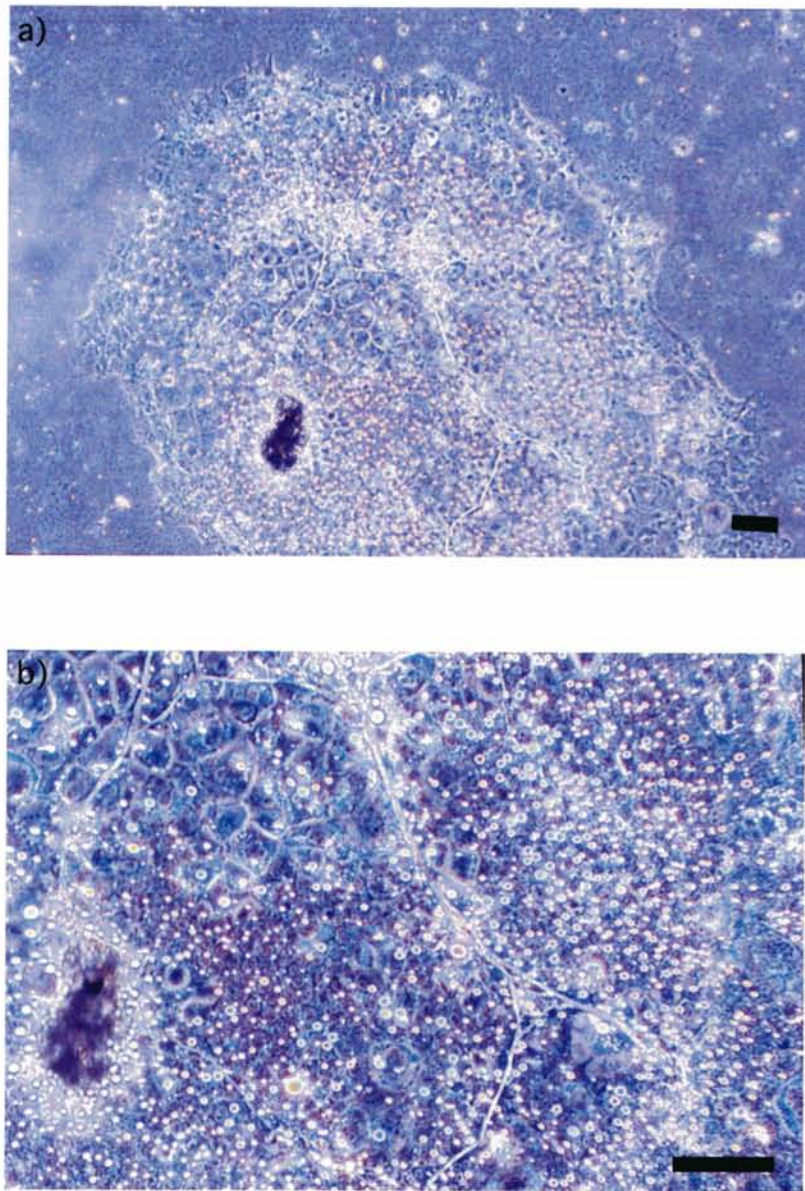


図 5-3. 単層培養におけるマウス胎仔肝臓細胞の位相差顕微鏡による観察
約7ヶ月間にわたって培養された細胞はコロニーを形成し、類洞血管様の構造が肝細胞様の細胞の間に張り巡らされているのが観察された。Bars; 100 μ m.

5-4. 考察

5-4-1. 肝細胞による VEGF の分泌

胎仔の肝臓では VEGF の mRNA が発現していることが報告されているものの (Lagercrantz *et al.*, 1998, Gouysse *et al.*, 2002)、培養胎仔肝細胞による VEGF の分泌に関してはまだ報告されていない。一方、肝再生時には HGF などの成長因子とともに VEGF の mRNA 発現量も増加することはよく知られており、これらの因子の分泌量に関するいくつかの報告がある。動物を用いた実験では、70% 肝切除ラットにおいて、切除後 72 時間目に血清中の VEGF 量が最大になり、このときの分泌量はおよそ 7.5 pg/mL であることが報告されている (Shimizu *et al.*, 2001)。この実験では、遊離した肝細胞の培養実験も並行して行われており、 5×10^5 cells/well (12-well plate) の密度で単層培養した肝細胞は、やはり 72 時間後に VEGF 分泌量が 90 pg/mL で最大値となることがわかった。一方、株化肝細胞である Chang Liver 細胞の培養では、3 日間でおおよそ 235 pg/ 10^6 cells の VEGF が分泌されていたことが報告されている (Beierle *et al.*, 2001)。これらの培養条件は本研究での条件とは異なるために、両者の結果を直接比較することはできないものの、本研究では胎仔肝臓細胞の単層培養に OSM を添加した場合には、1 日あたりおよそ 250 pg/dish の分泌量が得られた (図 5-1、■、●: 播種細胞数 1×10^6 cells/dish)。したがって、本研究での胎仔肝臓細胞の VEGF 分泌量は、既往の研究で報告されている成熟肝細胞や株化肝細胞の分泌量に比べてよりはるかに高かった。胎仔肝臓細胞はまだ発生段階にある細胞であるために肝細胞の増殖が旺盛で、栄養や酸素を細胞に供給する血管を誘導してくる必要があるために、VEGF を大量に分泌していると考えられた。また、胎仔肝臓中に含まれている肝細胞以外の細胞が VEGF を分泌している可能性もあることから、どの細胞が VEGF を分泌しているのかを今後確認する必要がある。

本研究の単層培養と三次元培養の結果を比較すると、三次元培養の方が播種細胞数

に対する VEGF の分泌活性が低かった。この原因として、単離された細胞は組織を再構築するために VEGF を分泌しており、三次元培養の方がより生体内に近い構造で培養されていたために、単層培養よりも分泌量が少なかった可能性が考えられた。

5-4-2. 肝再生における VEGF の役割

肝再生は HGF、transforming growth factor- α (TGF- α)、EGF などの成長因子やサイトカインが複雑に関与して、肝細胞や非実質細胞の増殖を引き起こす現象である (Mead and Fausto, 1989; Masuhara *et al.*, 1992; Fausto *et al.*, 1995; Diehl and Rai, 1996)。肝再生時には、肝細胞の複製にともなって、より多くの細胞に血液を効率的に供給する必要が生じることから類洞血管の再構築は重要であり、類洞血管内皮細胞の増殖や機能には VEGF が大きく関与している。肝再生時に実質細胞によって分泌される VEGF は、類洞血管内皮細胞の増殖を促進したり、移動を誘導する効果を持つ。一方、類洞血管内皮細胞は HGF、IL-6 や heparin-binding EGFなどを分泌することにより、肝実質細胞の増殖を誘導したり解毒作用を亢進させる作用がある (Yamane *et al.*, 1994; Ferrara *et al.*, 2003; LeCouter *et al.*, 2003)。したがって、肝実質細胞と類洞血管内皮細胞は VEGF を含むいくつかの因子を介して相互作用していることが知られている。

本研究では、単層培養された胎仔肝臓細胞において、類洞血管内皮細胞と考えられる細胞と肝細胞様の細胞の両方が観察された (図 5-3)。このことから、培養胎仔肝臓細胞の培養においては、非実質細胞が分泌する ECM によって肝細胞の増殖や機能が活性化されることに加えて、肝細胞が VEGF を分泌することにより類洞血管内皮細胞が増殖して、HGF などの因子が分泌され、肝細胞の増殖や機能の維持に影響を及ぼしていたことが考えられた。これらのことを確認するためには、類洞血管内皮細胞による培地中への HGF の分泌についても検討する必要があると考えられた。

5-4-3. OSM を添加することによる効果

本章の培養結果から、OSM 添加培地を用いた場合の方が基本培地よりも VEGF の分泌量が多いことがわかった。OSM と VEGF の関連について、OSM は VEGF の発現を誘導する作用を持つことがいくつか報告されている。例えば、心筋細胞の培養においては添加した OSM の量に依存して VEGF の分泌量が増加することや、神経膠星状細胞腫 (astroglioma) の培養では OSM を添加することにより VEGF 分泌能が 3 倍以上に促進されることが報告されている (Repovic *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2003)。したがって、培養胎仔肝臓細胞の場合にも、肝細胞、あるいは非実質細胞の VEGF 分泌能が OSM の添加によって亢進された可能性が考えられた。

血管内皮細胞には、2 倍体線維芽細胞や肺ガン細胞などの細胞と比較して、10~20 倍もの OSM レセプターが存在していることが報告されていることから (Brown *et al.* 1991)、微小血管系の血管内皮細胞に及ぼす OSM の効果について調べた報告がある (Vasse *et al.*, 1999)。この研究では、ヒト皮膚由来の血管内皮細胞をマイクロビーズに播種してフィブリンゲル内で培養し、ゲルに OSM や LIF を添加することで、これらの因子が血管新生に及ぼす影響について検討された。その結果、いずれの培地条件下においてもマイクロビーズから遠方に向かって血管新生は亢進され、特に OSM を添加した場合にはより多くの長い毛細血管が形成されることがわかった。第 2 章および第 3 章では培地に OSM や LIF を添加した培養を行った結果、アルブミン分泌能などの肝特異的機能が亢進されることがわかった。この原因として、OSM や LIF が肝細胞に特異的な作用を及ぼした可能性に加えて、培養胎仔肝臓細胞に含まれる血管内皮細胞にも作用して、血管形成など生体内に近い構造を構築することによって二次的に肝細胞の機能を改善した可能性も考えられた。OSM を添加した場合の方が LIF よりも肝細胞の活性が高かったのも、先に述べた血管内皮細胞を用いた実験のように、OSM の方が生

体に近い構造を形成することによる二次的な効果が高かったためではないかと考えられた。

5-5. 小括

マウス胎仔肝臓細胞の単層培養および三次元培養を行い、培地への VEGF の分泌量を計測するとともに、培養細胞の形態を観察した。その結果、いずれの培養においても VEGF が良好に分泌されていることがわかった。特に、培地に OSM を添加した培養では分泌量が増加する傾向があり、約 1 ヶ月間にわたって維持されることがわかった。長期間にわたり単層培養された細胞を観察すると、肝細胞様の細胞の間をぬうようにして、類洞血管内皮細胞と考えられる細胞が微小血管状の構造を形成していることが確認された。

第6章 総括

6-1. 胎仔肝臓細胞の三次元培養

本研究では、PVF 樹脂を担体とする胎仔肝臓細胞の三次元培養を行い、基本培地の種類や細胞刺激因子が細胞の増殖や肝特異的機能に及ぼす影響について検討した。

マウス胎仔肝臓細胞の培養では、基本培地として α MEM と WE を用いたところ、WE を用いた方がアルブミン分泌能が高いことがわかった。WE に OSM を添加した培地を用いた場合には、細胞を高密度に播種した三次元培養におけるアルブミン分泌量が培養後期には $2.5 \mu\text{g/day/dish}$ を超え、マウス胎仔肝細胞としてはかなり高い値が得られた。また、マウス胎仔肝臓細胞の培養において WE に LIF や VEGF を添加した培養も行ったところ、これらの細胞刺激因子もアルブミン分泌量を増加させる効果があった。これまでに、LIF や VEGF が培養胎仔肝臓細胞の肝特異的機能を活性化することは報告されていないことから、新たな刺激因子として注目される。

マウスの細胞培養のスケールアップを目的としたブタ胎仔肝臓細胞の培養では、培地に刺激因子を添加しなくても細胞が良好に増殖することがわかった。培地に OSM や LIF を添加したことによる肝細胞の機能への影響は認められなかったものの、cortisol の添加によりアルブミン分泌能が長期間にわたって維持された。さらに、マウスおよびブタ胎仔肝臓細胞の培養においてアルブミン分泌量が増加したことは、単に細胞数の増加だけが原因ではなく、培養期間中に胎仔肝細胞が分化・成熟したことも一因であることが RT-PCR や Northern blot を用いた実験により示唆された。

一方、胎仔肝臓細胞は培養中に VEGF を高濃度で分泌しており、培地に OSM を添加すると分泌量が上昇することがわかった。肝臓細胞には、肝実質細胞の他に Kupffer 細胞や類洞血管内皮細胞など数種類の非実質細胞が含まれていることから、培養細胞が

細胞間の相互作用を促進するために VEGF が分泌されることが示唆された。実際に位相差顕微鏡で観察してみると、肝細胞と思われる細胞の間をぬって類洞血管様の構造が認められ、生体の肝臓に近い構造を構築していることが確かめられた。

以上の結果から、PVF 樹脂を用いた胎仔肝臓細胞の三次元培養において、培地や刺激因子の検討を行うことにより細胞は増殖能、肝特異的機能とも良好に維持されたことから、胎仔肝臓細胞をバイオ人工肝臓の細胞源として利用することは十分可能であると考えられた。

胎仔肝臓細胞を三次元培養してバイオ人工肝臓に応用する試みは、本研究が世界で初めてである。胎仔肝臓細胞は培養期間中に増殖することから細胞の機能も長期間にわたって維持できるため、この細胞を用いたバイオ人工肝臓は患者の肝機能が回復するまでの期間、bridge-to-recovery として利用できる可能性が高い。また、ガン細胞などと比較しても安全面や機能面において優れていることから、本研究によってバイオ人工肝臓の新たな細胞源が示された。

6-2. 今後の研究課題

本研究では、PVF 樹脂を用いたマウス胎仔肝臓細胞の三次元培養において、細胞の刺激因子として OSM を培地に添加した場合に細胞数の増加や肝特異的機能の亢進が認められた。しかし、この培養系をそのまま臨床応用することは不可能であることから、臨床応用に向けて改善・検討すべき点を以下に記す。

これまでに胎児期の肝臓の細胞をバイオ人工肝臓に応用しようとする試みは行われていないため、直接他の研究グループと比較することはできない。そこで、三次元培養されたマウス胎仔肝臓細胞の培養 3 週間目のアルブミン分泌量を同培養条件下でのラット成熟肝細胞の活性と比較すると、ラット成熟肝細胞の方が 1 桁高い値であった

(Miyoshi et al., 1998)。したがって、胎仔肝臓細胞を実際に臨床応用させるためには細胞の機能面を約 1 オーダー向上させる必要があると考えられる。胎仔肝臓細胞の機能を向上させる因子として、OSM 以外にも各種の成長因子が挙げられる。そこで、われわれの研究室では培地に dimethyl sulfoxide (DMSO)、EGF や HGF を添加した三次元培養を既に行った。これらの研究では、発生の段階でそれぞれの成長因子が分泌される時期を模倣して、培養期間中に成長因子を段階的に胎仔肝臓細胞に投与した。その結果、胎仔肝臓細胞のアルブミン分泌量を三次元培養されたラット成熟肝細胞と同じオーダーにまで上昇させることに成功した (小山, 2004)。今後は、さらに機能を亢進できる因子やそれらの添加時期を最適化することによって、胎仔肝臓細胞の機能を成熟肝細胞と同レベルまでに引き上げる必要がある。

マウス胎仔肝臓細胞の培養で効果のあった OSM は、ブタ由来のものは現在のところ入手できない。ヒト OSM は入手できるものの、ヒトの胎児肝は極めて入手が困難であり、その使用には倫理的な問題も避けられない。したがって、バイオ人工肝臓にどの種の胎児肝臓細胞を用いるのが適しているかについては、更なる議論が必要であろう。

小山がマウス胎仔肝臓細胞の細胞刺激因子として用いた DMSO は化学物質であるため、動物種に関係なく効果があると考えられることから、ブタの細胞でも検討してみる価値があろう。また、DMSO や cortisol 以外にも、ブタ胎仔肝臓細胞の肝特異的機能に効果があるホルモンや、ヒト由来の成長因子などを模索する必要がある。一方、当研究室で開発された充填層型バイオリアクターを用いて、マウスやブタ胎仔肝臓細胞の灌流培養における、適切な培養条件（培地の灌流速度など）を検討した報告もある (鈴木, 2002)。バイオ人工肝臓の実用化に向けて、より大量の胎仔肝臓細胞を培養するためには灌流培養を行う必要がある。ただし、これらの実験では OSM など培地への添加物を用いた培養は行われていないことから、灌流培養した胎仔肝臓細胞に及ぼす

添加物の影響についても検討すべきである。

本研究で用いた細胞は、マウスの細胞は胎生 14 日目前後、ブタの細胞は胎生 70 日目前後のものであり、この時期の肝臓は未分化で増殖能の高い肝細胞が豊富に存在している。そのため、培養系においてこれらの細胞を維持しておくことは十分可能であると考えられる。ただし、バイオ人工肝臓の細胞源として胎仔肝臓細胞を用いるためには、必要性が生じた場合に安定して細胞が供給される必要があることから、培養細胞だけでなく何らかの方法で細胞を保存しておくことも考慮しなければならない。われわれの研究室では、PVF 樹脂に固定化した線維芽細胞を凍結保存する方法を既に確立している（蛇川, 2002）。そこで、この技術を胎仔肝臓細胞の凍結保存に応用できるかどうかについても検討する必要がある。

近年では、ES 細胞から肝細胞へと分化させる培養条件が明らかになりつつあり、細胞移植などへの利用も検討され始めている（Yamamoto *et al.*, 2003）。ES 細胞は増殖能も高いため、その増殖や肝細胞への分化を制御できるようになれば、バイオ人工肝臓への応用も可能となるだろう。ヒト ES 細胞の臨床応用については倫理面、安全面やコスト面でのハードルは高いものの、全ての細胞へと分化できる能力を持つことから、その利用が大いに期待される。

引用文献

- Beierle E. A., Strande L. F., Berger A. C., Chen M. K. (2001) VEGF is upregulated in a neuroblastoma and hepatocyte coculture model. *J Surg Res* **97**; 34-40
- Ben-Ze'ev A., Robinson G. S., Bucher N. L. R., Farmer S. R. (1988) Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**; 2161-2165
- Bissell D. M., Arenson D. M., Maher J. J., Roll F. J. (1987) Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel: evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest* **79**; 801-812
- Brown T. J., Rowe J. M., Liu J., Shoyab M. (1991) Regulation of IL-6 expression by oncostatin M. *J Immunol* **147**; 2175-2180
- Cai Z. H., Shi Z. Q., O'Shea G. M., Sun A. M. (1988) Microencapsulated hepatocytes for bioartificial liver support. *Artif Organs* **12**; 388-393
- Cai Z. H., Shi Z. Q., Sherman M., Sun A. M. (1989) Development and evaluation of a system of microencapsulation of primary rat hepatocytes. *Hepatology* **10**; 855-860
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kiechens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**; 435-439
- Chinzei R., Tanaka Y., Shimizu-Saito K., Hara Y., Kakinuma S., Watanabe M., Teramoto K., Arai S., Takase K., Sato C., Terada N., Teraoka H. (2002) Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* **36**; 22-29
- Cukierman E., Pankov R., Stevens D. R., Yamada K. M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**; 1708-1712

de Groot G. H., Schalm S. W., Fick T., Reuvers C. B., Boks A. L., Terpstra O. T. (1989) Strategies for hepatic support in acute liver failure: role of extracorporeal devices versus liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* **4**; 283-293

DeLeve L. D., Wang X., Hu L., McCuskey M. K., McCuskey R. S. (2004) Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Gastrointest Liver Physiol* **287**; G757-G763

Demetriou A. A., Brown R. S., Jr., Busuttil R. W., Fair J., McGuire B. M., Rosenthal P., Am Esch J. S. 2nd., Lerut J., Nyberg S. L., Salizzoni M., Fagan E. A., deHemptinne B., Broelsch C. E., Muraca M., Salmeron J. M., Rabkin J. M., Metselaar H. J., Pratt D., De La Mata M., McChesney L. P., Everson G. T., Lavin P. T., Stevens A. C., Pitkin Z., Solomon B. A. (2004) Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* **239**; 660-670

Dich J., Vind C., Grunnet N. (1988) Long-term culture of hepatocytes: effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity. *Hepatology* **8**; 39-45

Diehl A. M., Rai R. M. (1996) Regulation of signal transduction during liver regeneration. *Fed Am Soc Exp Biol J* **10**; 215-227

Donato M. T., Castell J. V., Gómez-Lechón M. (1999) Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* **31**; 542-549

Ellis A. J., Hughes R. D., Wendon J. A., Dunne J., Langley P. G., Kelly J. H., Gislason G. T., Sussman N. L., Williams R. (1996) Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* **24**; 1446-1451

Enat R., Jefferson D. M., Ruiz-Opazo N., Gatmaitan Z., Leinwand L. A., Reid L. M. (1984) Hepatocyte proliferation *in vitro*: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**; 1411-1415

Fausto N., Laird A. D., Webber E. M. (1995) Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *Fed Am Soc Exp Biol J* **10**; 215-227

Fausto N. (2000) Liver regeneration. *J Hepatol* **32** (suppl. 1); 19-31

Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K. S., Powell-Braxton L., Hilllan K. J., Moore M. W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**; 439-442

Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**; 4-25

Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**; 669-676

Folkman J., Shing Y. (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**; 10931-10934

Gerlach J. C. (1996) Development of a hybrid liver support system: a review. *Int J Artif Organs* **19**; 645-654

Gouysse G., Couvelard A., Frachon S., Bouvier R., Nejari M., Dauge M. C., Feldmann G., Hénin D., Scoazec J. Y. (2002) Relationship between vascular development and vascular differentiation during liver organogenesis in humans. *J Hepatol* **37**; 730-740

Guguen-Guillouzo C., Clément B., Baffet G., Beaumont C., Morel-Chany E., Glaise D., Guillouzo A. (1983) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* **143**; 47-54

Hanada S., Kayano H., Jiang J., Kojima N., Miyajima A., Sakoda A., Sakai Y. (2003) Enhanced *in vitro* maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M. *Biomaterials* **26**; 943-951

Heinrich P. C., Behrmann I., Müller-Newen G., Schaper F., Graeve L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334**; 297-314

Hori M. (1982) Artificial liver: the concept and working hypothesis of hybrid organs: from a 25 year old anecdote to the 21st century model. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* **28**; 639-641

Hori M. (1988) Will artificial liver therapy ever become a reality?: historical aspects and future prospects of artificial liver. *Artif Organs* **12**; 293-295

Isom H. C., Secotto T., Georgoff I., Woodworth C., Mummaw J. (1985) Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**; 3252-3256

蛇川亜香里 (2002) 多孔質樹脂を用いた動物細胞の凍結保存. 卒業論文, 筑波大学

Jauregui H. O., McMillan P. N., Driscoll J., Naik S. (1986) Attachment and long term survival of adult rat hepatocytes in primary monolayer cultures: comparison of different substrata and tissue culture media formulations. *In Vitro Cell Dev Biol* **22**; 13-22

Jefferson D. M., Clayton D. F., Darnell J. E., Jr., Reid L. M. (1984) Posttranscriptional modulation of gene expression in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biol* **4**; 1929-1934

Kamiya A., Kinoshita T., Ito Y., Matsui T., Morikawa Y., Senba E., Nakashima K., Taga T., Yoshida K., Kishimoto T., Miyajima A. (1999) Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* **18**; 2127-2136

Kamiya A., Kinoshita T., Miyajima A. (2001) Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* **492**; 90-94

Kang Y. H., Berthiaume F., Nath B. D., Yarmush M. L. (2004) Growth factors and nonparenchymal cell conditioned media induce mitogenic responses in stable long-term adult rat hepatocyte cultures. *Exp Cell Res* **293**; 239-247

葛西眞一, 澤 雅之 (1999) 人工肝の現状と展望. *医学のあゆみ* **188**; 348-354

Kinoshita T., Sekiguchi T., Xu M., Ito Y., Kamiya A., Tsuji K., Nakahata T., Miyajima A. (1999) Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**; 7265-7270

Klagsbrun M., D'Amore P. A. (1991) Regulations of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* **53**; 217-239

Kobayashi N., Fujiwara T., Westerman K. A., Inoue Y., Sakaguchi M., Noguchi H., Miyazaki M., Cai J., Tanaka N., Fox I. J., Leboulch P. (2000) Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* **287**; 1258-1262

Kocarek T. A., Schuetz E. G., Guzelian P. S. (1994) Biphasic regulation of cytochrome P450 2B1/2 mRNA expression by dexamethasone in primary cultures of adult rat hepatocytes maintained on Matrigel. *Biochem Pharmacol* **48**; 1815-1822

Koj A., Korzus E., Baumann H., Nakamura T., Travis J. (1993) Regulation of synthesis of some proteinase inhibitors in human hepatoma cells HepG2 by cytokines, hepatocyte growth factor and retinoic acid. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**; 193-201

Kordula T., Rokita H., Koj A., Fiers W., Gauldie J., Baumann H. (1991) Effects of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor on the acute phase response and DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *Lymphokine Cytokine Res* **10**; 23-26

小山寿恵 (2004) 多孔質樹脂を用いたマウス胎仔肝細胞の三次元培養条件の最適化. 修士論文, 筑波大学

Lagercrantz J., Farnebo F., Larsson C., Tvrdik T., Weber G., Piehl F. (1998) A comparative study of the expression patterns for *vegf*, *vegf-b/vrf* and *vegf-c* in the developing and adult mouse. *Biochim Biophys Acta* **1398**; 157-163

Langer R., Vacanti J. P. (1993) Tissue engineering. *Science* **260**; 920-926

Lázaro C. A., Croager E. J., Mitchell C., Campbell J. S., Yu C., Foraker J., Rhim J. A., Yeoh G. C. T., Fausto N. (2003) Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* **38**; 1095-1106

LeCouter J., Moritz D. R., Li B., Phillips G. L., Liang X. H., Gerber H. -P., Hillan K. J., Ferrara N. (2003) Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* **299**; 890-893

Lee C. H., Bradley G., Zhang J. -T., Ling V. (1993) Differential expression of P-glycoprotein

genes in primary rat hepatocyte culture. *J Cell Physiol* **157**; 392-402

Lescoat G., Theze N., Clement B., Guillouzo A., Guguen-Guillouzo C. (1985) Modulation of fetal and neonatal rat hepatocyte functional activity by glucocorticoids in co-culture. *Cell Differ* **16**; 259-268

Lydon M. J., Keeler K. D., Thomas D. B. (1980) Vital DNA staining and cell sorting by flow microfluorometry. *J Cell Physiol* **102**: 175-181

Masuhara M., Katyal S. L., Nakamura T., Shinozuka H. (1992) Differential expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor- α and transforming growth factor- β 1 messenger RNAs in two experimental models of liver cell proliferation. *Hepatology* **16**; 1241-1249

Mead J. E., Fausto N. (1989) Transforming factor α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**; 1558-1562

Michalopoulos G. K., DeFrances M. V. (1997) Liver regeneration. *Science* **276**; 61-66

Miquerol L., Langille B. L., Nagy A. (2000) Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* **127**; 3941-3946

Miyajima A., Kinoshita T., Tanaka M., Kamiya A., Mukouyama Y., Hara T. (2000) Role of oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**; 177-183

Miyoshi C., Ohshima N. (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression regulates angiogenesis accompanying tumor growth in a peritoneal disseminated tumor model. *In Vivo* **15**; 233-238

Miyoshi H., Yanagi K., Fukuda H., Ohshima N. (1994) Long-term continuous culture of hepatocytes in a packed-bed reactor utilizing porous resin. *Biotechnol Bioeng* **43**; 635-644

三好浩稔, 柳 健一, 大川敬子, 大島宣雄 (1994) 多孔質樹脂を担体とする肝実質・非実質細胞の coculture. *人工臓器* **23**; 479-484

Miyoshi H., Yanagi K., Fukuda H., Ohshima N. (1996) Long-term performance of albumin secretion of hepatocytes cultured in a packed-bed reactor utilizing porous resin. *Artif Organs* **20**; 803-807

Miyoshi H., Ookawa K., Ohshima N. (1998) Hepatocyte culture utilizing porous polyvinyl formal resin maintains long-term stable albumin secretion ability. *J Biomater Sci Polymer Edn* **9**; 227-237

三好浩稔, 大島宣雄 (1998) 組織工学的手法によるバイオ人工肝臓の開発. *人工臓器* **27**; 724-732

Mochida S., Ishikawa K., Shibuya M., Fujiwara K. (1996) Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, *flt-1* and *KDR/flk-1*, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **226**; 176-179

Morin O., Normand C. (1986) Long-term maintenance of hepatocyte functional activity in co-culture: requirement for sinusoidal endothelial cells and dexamethasone. *J Cell Physiol* **129**; 103-110

Mosley B., De Imus C., Friend D., Boiani N., Thoma B., Park L. S., Cosman D. (1996) Dual oncostatin M (OSM) receptors: cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* **271**; 32635-32643

Mundt A., Puhl G., Müller A., Sauer I., Müller C., Richard R., Fotopoulou C., Doll R., Gäbelein G., Höhn W., Hofbauer R., Neuhaus P., Gerlach J. (2002) A method to assess biochemical activity of liver cells during clinical application of extracorporeal hybrid liver support. *Int J Artif Organs* **25**; 542-548

Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sugimura A., Tashiro K., Shimizu S. (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**; 440-443

Nyberg S. L., Shatford R. A., Hu W. -S., Payne W. D., Cerra F. B. (1992) Hepatocyte culture systems for artificial liver support: implications for clinical care medicine (Bioartificial liver support). *Crit Care Med* **20**; 1157-1168

Nyberg S. L., Shatford R. A., Peshwa M. V., White J. G., Cerra F. B., Hu W. -S. (1993) Evaluation of a hepatocyte-entrapped hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver. *Biotechnol Bioeng* **41**; 194-203

Ohshima N. (1997) Tissue engineering aspects of the development of bioartificial livers. *J Chin Inst Chem Engrs* **28**; 441-453

Ohshima N., Yanagi K., Miyoshi H. (1997) Packed-bed type reactor to attain high density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver. *Artif Organs* **21**; 1169-1176

Ohshima N., Yanagi K., Miyoshi H., Kan P. (1999) Improvement of the performance of a packed-bed bioartificial liver. In; Ikada Y and Okano T (Eds.) *Tissue Engineering for Therapeutic Use 3*. Amsterdam: Elsevier Science BV: p. 53-63

大島宣雄 (2000) 組織工学的アプローチによるバイオ人工肝臓の開発. *Clinical Engineering* **11**; 338-344

Rambhatla L., Chiu C. P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M. K. (2003) Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* **12**; 1-11

Repovic P., Fears C. Y., Gladson C. L., Benveniste E. N. (2003) Oncostatin-M induction of vascular endothelial growth factor expression in astrogloma cells. *Oncogene* **22**; 8117-8124

Rojkind M., Gatmaitan Z., Mackensen S., Giambrone M. A., Ponce P., Reid L. M. (1980) Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol* **87**; 255-263

Rozga J., Holzman M. D., Ro M. S., Griffin D. W., Neuzil D. F., Giorgio T., Moscioni A. D., Demetriou A. A. (1993) Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg* **217**; 502-511

Sakai Y., Jiang J., Kojima N., Kinoshita T., Miyajima A. (2002) Enhanced in vitro maturation of fetal liver cells with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Cell Transplant* **11**; 435-441

- Santoro A., Mancini E., Buttiglieri S., Krause A., Yakubovich M., Tetta C. (2004) Extracorporeal support of liver function (II Part). *Int J Artif Organs* **27**; 176-185
- Sauer I. M., Zeilinger K., Obermayer N., Pless G., Grünwald A., Pascher A., Mieder T., Roth S., Goetz M., Kardassis D., Mas A., Neuhaus P., Gerlach J. C. (2002) Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support: a preliminary report. *Int J Artif Organs* **25**; 1001-1005
- Sauer I. M., Zeilinger K., Pless G., Kardassis D., Theruvath T., Pascher A., Goetz M., Neuhaus P., Gerlach J. C. (2003) Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis: treatment of a patient with primary graft non-function. *J Hepatol* **39**; 649-653
- Seglen P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. In; Prescott DM (Ed.) *Methods in Cell Biology* **13** New York: Academic Press: p. 29-83
- Shimizu H., Miyazaki M., Wakabayashi Y., Mitsuhashi N., Kato A., Ito H., Nakagawa K., Yoshidome H., Kataoka M., Nakajima N. (2001) Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* **34**; 638-689
- Shnyra A., Bocharov A., Bochkova N., Spirov V. (1990) Large-scale production and cultivation of hepatocytes of Biosilon microcarriers. *Artif Organs* **14**; 421-428
- Shnyra A., Bocharov A., Bochkova N., Spirov V. (1991) Bioartificial liver using hepatocytes of Biosilon microcarriers: treatment of chemically induced acute hepatic failure in rats. *Artif Organs* **15**; 189-197
- Siddiqui M. U., Benatmane S. B., Zacharyus J. -L., Plas C. (1999) Gap junctional communication an regulation of the glycogenic response to insulin by cell density and glucocorticoids in cultured fetal rat hepatocytes. *Hepatology* **29**; 1147-1155
- Sriram M., van der Marel G. A., Roelen H. L. P. F., van Boom J. H., Wang A. H. -J. (1992) Structural consequences of a carcinogenic alkylation lesion on DNA: effect of *O*⁶-ethylguanine on the molecular structure of the d(CGC[e⁶G]AATTCGCG)-netropsin complex. *Biochemistry* **31**; 11823-11834

Sussman N. L., Kelly J. H. (1993) Improved liver function following treatment with an extracorporeal liver assist device. *Artif Organs* **17**; 27-30

Sussman N. L., Gislason G. T., Conlin C. A., Kelly J. H. (1994) The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif Organs* **18**; 390-396

鈴木 聡 (2002) バイオ人工肝臓の開発を目的とした多孔質樹脂を用いる胎仔肝細胞培養システムの開発. 修士論文, 筑波大学

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**; 1145-1147

Uchino J., Tsuburaya T., Kumagai F., Hase T., Hamada T., Komai T., Funatsu A., Hashimura E., Nakamura K., Kon T. (1988) A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers. *ASAIO Trans* **34**; 972-977

van de Kerkhove M. -P., di Florio E., Scuderi V., Mancini A., Belli A., Bracco A., Dauri M., Tisone G., di Nicuolo G., Amoroso P., Spadari A., Lombardi G., Hoekstra R., Calise F. (2002) Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs* **25**; 950-959

van de Kerkhove M. -P., Hoekstra R., van Gulik T. M., Chamuleau R. A. F. M. (2004) Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials* **25**; 1613-1625

Vasse M., Pourtau J., Trochon V., Muraine M., Vannier J. -P., Lu H., Soria J., Soria C. (1999) Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**; 1835-1842

Vilei M. T., Granato A., Ferraresso C., Neri D., Carraro P., Gerunda G., Muraca M. (2001) Comparison of pig, human and rat hepatocytes as a source of liver specific metabolic functions in culture systems: implications for use in bioartificial liver devices. *Int J Artif Organs* **24**; 392-396

Wang Y., Robledo O., Kinzie E., Blanchard F., Richards C., Miyajima A., Baumann H. (2000) Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* **275**; 25273-25285

Watanabe T., Shibata N., Westerman K. A., Okitsu T., Allain J. E., Sakaguchi M., Totsugawa T., Maruyama M., Matsumura T., Noguchi H., Yamamoto S., Hikida M., Ohmori A., Reth M., Weber A., Tanaka N., Leboulch P., Kobayashi N. (2003) Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation* **75**; 1873-1880

Waxman D. J., Morrissey J. J., Naik S., Jauregui H. O. (1990) Phenobarbital induction of cytochromes P-450: high-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J* **271**; 113-119

Weiss T. W., Speidl W. S., Kaun C., Rega G., Springer C., Macfelda K., Losert U. M., Grant S. L., Marro M. L., Rhodes A. D., Fuernkranz A., Bialy J., Ullrich R., Holzmann P., Pacher R., Maurer G., Huber K., Wojta J. (2003) Glycoprotein 130 ligand oncostatin-M induces expression of vascular endothelial growth factor in human adult cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **59**; 628-638

Wiktor-Jedrzejczak W., Ahmed A., Szczylik C. (1981) Conditions of adherent cell growth from murine bone marrow in liquid cultures, and partial characterization of function. *Exp Hematol* **9**; 835-848

Wira C. R., Colby E. M. (1985) Regulation of secretory component by glucocorticoids in primary cultures of rat hepatocytes. *J Immunol* **134**; 1744-1748

Yamaji H., Fukuda H. (1992) Growth and death behavior of anchorage-independent animal cells immobilized within porous support matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**; 244-251

Yamamoto H., Quinn G., Asari A., Yamanokuchi H., Teratani T., Terada M., Ochiya T. (2003) Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* **37**; 983-993

Yamane A., Seetharam L., Yamaguchi S., Gotoh N., Takahashi T., Neufeld G., Shibuya M.

(1994) A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* **9**; 2683-2690

Yanagi K., Miyoshi H., Fukuda H., Ohshima N. (1992) A packed-bed reactor utilizing porous resin enables high density culture of hepatocytes. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**; 316-320

Yang T. H., Miyoshi H., Ohshima N. (2001) Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocyte culture in porous scaffold. *J Biomed Mater Res* **55**; 379-386

Yarmush M. L., Dunn J. C. Y., Tompkins R. G. (1992) Assessment of artificial liver support technology. *Cell Transplant* **1**; 323-341

謝 辞

本研究を行うにあたって常に親身になり、ご多忙の折にもご指導、ご助言を賜りました、筑波大学 大島宣雄 名誉教授に心から感謝いたします。生物学がバックグラウンドの筆者に対して工学的な観点からのご助言は非常に貴重なものとなりました。大島宣雄元教授のご退官の後、快く指導教官となっていただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻 大河内信弘 教授にも感謝いたします。終始懇切丁寧なご指導、ご助言を賜りました筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻 三好浩稔 講師に心から深謝いたします。卒業研究生として医工学研究室で研究を初めて以来、7 年間の長きにわたって、辛抱強く見守り、常に真剣に接していただいたことには感謝の念が絶えません。さらに、研究に関して多くの貴重なご助言をいただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科 先端応用医学専攻 大川敬子 講師に深く感謝申し上げます。また、折にふれて研究に関するご助言をいただきました、元筑波大学基礎医学系 柳 健一 講師に感謝いたします。そして苦楽を共有して参りました医工学研究室内の皆様には、研究を行うにあたって多くのサポート、ご助言をいただきましたことに対し、謝意を表します。

本論文の審査にあたり貴重なご助言を賜りました、筑波大学大学院人間総合科学研究科 病態制御医学専攻 松井 陽 教授、同研究科 分子情報・生体統御医学専攻 石井哲郎 教授、同研究科先端応用医学専攻 筒井達夫 助教授、同研究科 病態制御医学専攻 松崎靖司 助教授にも深く感謝いたします。

マウス胎仔肝臓細胞の取得方法は、元筑波大学基礎医学系 中内啓光 教授の研究室にてご教授賜りました。またブタ胎仔肝臓細胞の取得の際には全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所の皆様にご協力いただきました。電子顕微鏡での観察を行う

際にご協力いただきました、大野良樹 技官ならびに菅江則子 技官に御礼申し上げます。さらに研究室内の細々とした諸事において、いつもご協力くださいました、伊藤百世 技官にも感謝申し上げます。

実験手法の教授や精神的に常に支えてくださった友人にも感謝申し上げます。

最後に、わがままを許し、くじけそうになったときにも常に励まし続けてくれた家族に深く感謝いたします。

2004年1月21日

江橋 具

付 記

本研究の内容の一部は以下の論文にて発表した。

- 1) Miyoshi H., Ehashi T., Ema H., Hsu H. C., Nakauchi H., Ohshima N. (2000) Long-term culture of fetal liver cells using a three-dimensional porous polymer substrate. *ASAIO Journal* **46**; 397-402
- 2) Miyoshi H., Ehashi T., Ohshima N. (2002) Long-term three-dimensional culture of fetal liver cells to achieve prolonged metabolic functions. *Tissue Engineering for Therapeutic Use* **6**. Amsterdam: Elsevier Science BV; p. 75-81
- 3) Ehashi T., Miyoshi H., Ohshima N. Oncostatin M stimulates proliferation and functions of mouse fetal liver cells in three-dimensional cultures. *Journal of Cellular Physiology* **202**; 698-706