

| | | | |
|---------|------------------------------------|---------|-------|
| 氏名(本籍) | えはし 江橋 | とも 具 | (茨城県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) | | |
| 学位記番号 | 博甲第3770号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成17年3月25日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | | |
| 審査研究科 | 人間総合科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | 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 | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 松井陽 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 石井哲郎 |
| 副査 | 筑波大学助教授 | 医学博士 | 筒井達夫 |
| 副査 | 筑波大学助教授 | 医学博士 | 松崎靖司 |

論文の内容の要旨

(目的)

重篤な肝不全患者の自己肝が再生するまでの長期間にわたり、患者の肝機能を補助できるようなバイオ人工肝臓を開発することを目的として、生体外でも増殖能を示す胎仔肝臓細胞の三次元培養を行った。三次元培養では、多孔質の polyvinyl formal (PVF) 樹脂を担体に用い、通常の単層培養の結果と比較した。これらの培養において、まず基本培地が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。さらに、細胞の増殖能や機能を改善することを目的として、サイトカインなどいくつかの刺激因子を培地に添加し、これらの影響についても検討した。

(対象と方法)

実験にはマウスまたはブタの胎仔肝臓細胞を用い、コラーゲンコート・ディッシュによる単層培養と PVF 樹脂を用いた三次元培養を行った。三次元培養では、2mm 角に細切した PVF 樹脂 (平均孔径 100 μ m) に遠心操作を用いて胎仔肝臓細胞を播種し、ディッシュに移して培養した。マウス胎仔肝臓細胞の培養には、基本培地として minimum essential medium alpha (α MEM) と Williams' medium E (WE) を用いた。また、基本培地に加える因子として、interleukin-6 family のサイトカインである oncostatin M (OSM)、OSM とホモロジーの高い leukemia inhibitory factor (LIF)、または成長因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) を用いた。マウス培養系をスケールアップすることを目的としたブタ胎仔肝臓細胞の培養には、WE を基本培地として、OSM、LIF あるいはグルココルチコイドであるコルチゾールを添加した培地を用いた。約1ヶ月の培養を行い、培養期間中の細胞数や肝特異的機能であるアルブミン分泌量の経時変化を測定した。培養中に肝細胞が成熟しているかどうかについては、未成熟肝細胞および成熟肝細胞の指標となるタンパクの mRNA の発現量を調べることで評価した。さらに、培養終了時に PVF 樹脂に固定化されていた細胞を電子顕微鏡により観察した。

(結果および考察)

1) マウス胎仔肝臓細胞の三次元培養

1. 基本培地に α MEM を用いた培養では細胞が良好に増殖したのに対し、WE の場合には細胞は徐々に

減少した。一方、アルブミン分泌量は α MEM よりも WE の方が 3 倍以上も高い値が培養期間を通して良好に維持された。以上から細胞あたりのアルブミン分泌量は WE を用いた場合の方が高いことがわかった。

2. OSM 添加培地を用いた場合には、細胞の増殖能およびアルブミン分泌量は著しく上昇した。特に、WE に OSM を添加した三次元培養では細胞は一定の割合で増殖し、アルブミン分泌量も基本培地より 5 倍以上高い値が得られた。なお、これらのアルブミン分泌量は、WE や WE+OSM を用いた培養において、単層培養に比べて有意に高かった。
3. 培地に LIF や VEGF を添加した三次元培養におけるアルブミン分泌量は、VEGF を添加した場合に基本培地を用いた場合よりも有意に増加しており、LIF を添加した場合にも増加する傾向が認められた。しかし、OSM のようにこの分泌量を大幅に増加する効果は示さなかった。

2) ブタ胎仔肝臓細胞の三次元培養

1. いずれの培養条件でも細胞は次第に増殖する傾向が認められた。培地に WE を用いた場合には、培養初期のアルブミン分泌量はマウスの細胞よりも高い傾向があったものの、その後は徐々に低下し、マウスの細胞ほどには安定に維持されなかった。OSM や LIF を添加したところ、これらの因子が細胞数やアルブミン分泌量に及ぼす効果は認められなかった。これは、ブタ細胞の培養にヒト OSM やヒト LIF を用いたことが原因であると考えた。
2. 培地にコルチゾールを添加した培養では、ブタ胎仔肝細胞のアルブミン分泌量は安定しなかったものの、長期間にわたって維持されることがわかった。なお、これらの実験において、単層培養ではアルブミンは培養初期を除いてほとんど分泌されなかった。
3. 培養肝細胞の分化・成熟度を調べた結果、いずれの培養条件でも培養期間を通して細胞は成熟している可能性が示唆された。また細胞の成熟は三次元培養を行うことや OSM 添加培地を用いることでより促進された。
4. 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ところ、細胞は PVF 樹脂の細孔を覆うような大きな凝集塊を形成して、大量の細胞外マトリックスが分泌されているのが確認された。三次元培養することにより生体内に近い構造を形成し、そのために単層培養よりも良好な代謝機能を発現したと考えた。

(結論)

PVF 樹脂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応用できる可能性が示された。

審査の結果の要旨

著者は polyvinyl formal 樹脂を担体に用いて、マウスおよびブタの胎仔肝細胞の三次元培養を行い、生化学的および電顕組織学的観察を行った。その結果、バイオ人工肝臓として臨床的に応用するにはさらに多くの改善を必要とするものの、胎仔肝細胞の三次元培養の持つ実現可能性を示唆した点で優れた新知見を提供した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。