

| | |
|---------|--------------------|
| 氏名 | 大崎 達哉 |
| 学位の種類 | 博士(工学) |
| 学位記番号 | 博甲第 7656 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 28 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 | 数理物質科学研究科 |
| 学位論文題目 | 血管構造を備えた立体的な肝組織の構築 |

| | | | |
|----|-----------|--------|-------|
| 主査 | 筑波大学教授 | 博士(工学) | 鈴木 博章 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 工学博士 | 長崎 幸夫 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士(工学) | 陳 国平 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士(理学) | 山本 洋平 |
| 副査 | 横浜国立大学准教授 | 博士(工学) | 福田 淳二 |

論 文 の 要 旨

第1章では、従来の臓器移植や人工臓器に代わる新しい治療法として再生医療が重要であることが述べられている。そして、当該分野における既存の組織工学的なアプローチが示されている。ここでは特に、生体足場材料を利用し皮膚や骨などの比較的単純な組織が臨床応用されつつあるものの、より複雑な三次元構造を有する心筋や肝組織など他の多くの重要組織・臓器が現状では作製する技術がないことが述べられている。このような 3 次元の複雑な組織を生体外で作製するには、血管構造を構築する技術が必要であり、これが再生医療分野の大きな障壁になっていることが示されている。このようにして、再生医療分野の重要課題を明確にすることで、本研究の目的を明確にし、本論文で示す結果の重要性を強調している。

第 2 章では、電気化学を用いた血管構造の作製法が示されている。まず、これに利用するオリゴペプチドの設計について述べ、さらに他の手法と比較した利点を説明している。また、血管構造の作製に必要なもう一つの技術である光架橋性ゼラチンゲルの作製法とその特性が述べられている。そして最後に、これらを組み合わせ、電気化学を用いて血管様構造を作製する方法が示されている。そしてさらに、この手法で作製した血管構造の評価として、細胞の配向性、ギャップジャンクション、タイトジャンクション、細胞極性の 4 つが評価されている。これらから、三次元組織を作製するのに必要不可欠な血管構造を短時間で作製可能であることが示されている。

第 3 章では、電気化学を用いて作製した血管構造から、さらに微細な毛細血管を伸長させ、血管ネットワークを構築する手法が述べられている。具体的には、光架橋性ゼラチンゲル内にどのような条件で血管ネットワークが誘導できるか、さまざまな方向から検討した結果が述べられている。結論として、継代数

が 4 もしくは 5 以内の血管内皮細胞を 2.0×10^6 cells/ml の細胞密度で、間葉系幹細胞は 1.0×10^5 cells/ml の密度で、濃度 5% の GelMa に包埋するという条件が、血管ネットワークの形成に最適であることを示した。また、ゲルの表面に 1 層の細胞層を形成させることで、内部に形成させた血管ネットワークが外部へと接続され、培養液が血管ネットワーク内に送液できることも発見している。そして、これらの知見を活かし、第 2 章で確立した血管構造作製法を組み合わせることで、送液可能な血管構造と、組織の隅々まで酸素を運ぶ微小な血管ネットワークを備えた構造を作製できることを示している。この微小な血管ネットワークに、血管ネットワーク内を横切るような液流れが発生することも示している。

第 4 章では、肝組織作製に利用する肝細胞スフェロイドの調製法について検討した結果が示されている。さらに、iPS 細胞から分化誘導した肝細胞を用いてスフェロイドを作製することで、肝細胞の成熟マーカーであるアルブミン分泌が誘導されることを示している。さらに、この iPS 細胞由来スフェロイドを用い、第 3 章で確立した血管ネットワーク作製法を組み合わせることで、立体的な肝組織を作製した。そしてこの作製した組織から、培養の経過とともに高いアルブミン分泌とアンモニア代謝が得られることを示した。

第 5 章では、以上により作製した肝組織をマウスに移植し、肝不全治療への有用性を評価している。まず、移植動物を生存させたまま観察が可能なクラニアルウィンドウ法を確立し、ここに肝組織を移植した。そして、組織内に血管構造が自発的に侵入し接続される様子を可視化している。次に、自発的な血管吻合では血液が流れ込むまでに長時間を要するため、マウスの門脈とデバイスを直接接続する吻合移植術を実施している。その結果、作製した肝組織に素早く酸素や栄養素が供給できることを確認した。そして、肝組織を含むデバイスを皮下に埋め込むことによって、少なくとも数時間はマウス体内に留置可能であることを証明した。さらに、ヒト肝細胞をデバイスに充填して移植することで、マウス血液からヒトアルブミンが検出されることを示した。以上により、本論文において作製した血管構造を備えた肝組織が、マウス体内において機能することを示した。

第 6 章は以上の総括である。

審 査 の 要 旨

[批評]

本論文は、血管構造を備えた立体的な組織・臓器を作製する研究に関するものである。本論文では、金電極の表面形成した自己組織化単分子膜を利用して細胞を接着・脱離させる方法を利用してハイドロゲル内に比較的大きな血管様構造を作製する方法を示している。さらに、あらかじめゲル内に複数種類の細胞を特定の条件で包埋しておくことで、血管様構造の周囲に微小な血管ネットワーク構造を自発的に形成させることができることが示された。このようにすることで、比較的大きな血管構造から微小な血管ネットワークが接続され、培養液や血液をポンプで送液できることが示されている。従来、この分野では、微小な血管ネットワークか、比較的大きな血管構造しか作製することができておらず、これらを連結する手法を確立した本論文の技術は有用かつ新しい可能性を秘めているといえる。

さらに、この手法の特長は、短時間で血管様構造を作製できることである。本論文に記載されているように、肝臓などの細胞密度が高い臓器を作製する場合、血管構造を作製する緻密な技術が必要であるものの、血管構造の作製自体に長時間を要するようでは細胞が酸素枯渇で深刻なダメージを受けるのが問

題であった。本論文で示された方法は、10分以内という従来にない短時間で血管構造を作製できており、そのために iPS 細胞由来の肝細胞を高密度に充填した場合も、良好に生存し、送液培養中に血管ネットワーク構造が形成され、さらに肝臓としての機能が送液培養中に増加していくことが示された。また、まだ予備実験のレベルではあるが、作製した組織を小動物に移植して、肝不全の治療デバイスとしての有用性を検証している。ここで示されているように直接外科的に血管に接続して移植する細胞デバイスはこれまでに報告されておらず、斬新かつ有用なアプローチと評価することができる。

以上のように、血管構造を備えた肝組織の作製法を実現できたことは、この分野に於いても画期的であり、本手法は膵臓などの他の多くの重要な臓器に利用できることから、今後の研究に一つの方向性・可能性を示すことができたのではないかと思われる。

〔最終試験結果〕

平成28年2月15日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。