

培養細胞の機能再生のバイオプロセス工学

Bio-process Engineering of Functional Regeneration of Cultured Cells

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96I00202)

プロジェクトリーダー

大島 宣雄 筑波大学基礎医学系・教授

コアメンバー

柳 健一 筑波大学基礎医学系・講師

三好 浩稔 筑波大学基礎医学系・講師

大川 敬子 筑波大学基礎医学系・講師



1. 研究目的

本プロジェクトでは、再生医工学 (tissue engineering) 的アプローチを用いてバイオ人工臓器を開発するための基盤となる技術の開発を目的とした。ここで、バイオ人工臓器は一種の“化学装置”とみなすことができることから、その開発には基礎医学・生物学的アプローチに加えて、化学工学・装置工学(プロセス工学)などの工学的アプローチが不可欠である。そこで本プロジェクトでは、装置工学的な視点から、バイオ人工臓器の研究・開発を行った。

2. 研究成果概要

2.1 肝細胞の機能再生

1) 充填層型バイオ人工肝臓の開発

肝臓は栄養物の代謝や毒物の解毒などの重要な機能を営む人体の生化学工場とも言うべき臓器で、ひとたび機能不全に陥ると昏睡から死に至る悲惨な経過をたどる。重症の肝不全を治療するための人工臓器として、充填層型バイオ人工肝臓を開発した。図1の装置(バイオリアクタ)には100g分(成人の肝臓は1.5kg)のブタの肝細胞が固定されており、生体内の肝臓に匹敵する機能を少なくとも1週間維持することができる。この装置を用いて、同じく本プロジェクトの成果である、重症肝不全のモデル動物の肝機能を補助する実験が現在進行中である。



図1 充填層型バイオ人工肝臓システムの概観

2) 胎児肝臓細胞の三次元培養法の検討

バイオ人工肝臓の開発において、肝細胞は生体外では増殖しないため、細胞を高密度に装置内で培養したり装置の性能を長期間維持することは非常に困難であった。そこで、生体外でも増殖する胎児の肝細胞を三次元培養したところ、肝細胞の機能は次第に増加して長期間維持されることがわかった。図2は多孔質樹脂に固定化された培養胎児肝臓細胞である。細胞は大きな凝集塊を形成し、多孔質体の細孔をまたがるように固定化されていた。また、凝集塊表面や周囲には多量の細胞外マトリックスが分泌されており、生体に近い構造を構築していた。したがって、これらの細胞の形態変化が機能の増加に深く関与していることがわかった。

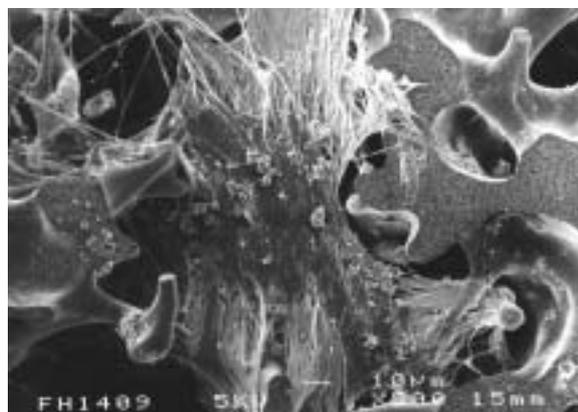


図2 多孔質樹脂に固定化された胎児肝臓細胞

2.2 軟骨誘導による軟骨・骨機能の再生

骨髄再生機構の解析

幹細胞は生体内で自己複製が可能で、様々な細胞への分化能を有する細胞であり、胚性幹細胞 (ES 細胞)、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞などが知られている。これらの幹細胞は、様々な再生医療への応用が期待されており、そのためには幹細胞の増殖と分化を制御する分子機構を明らかにする必要がある。本研究では、遺伝子発現の調節機構である転写因子の働きを調べることにより、幹細胞の分化や血管新生のメカニズムの解明を試みた。図3は転写因子の1つである GATA-2 のマウス胎児における発現を緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いて可視化したものである。

GATA-2 は大動脈周囲（赤矢印）、肝原基（白矢印）、卵黄嚢の血管（矢頭）などに局在していたことから、この転写因子はこれらの組織の形成に深く関与していることがわかった。

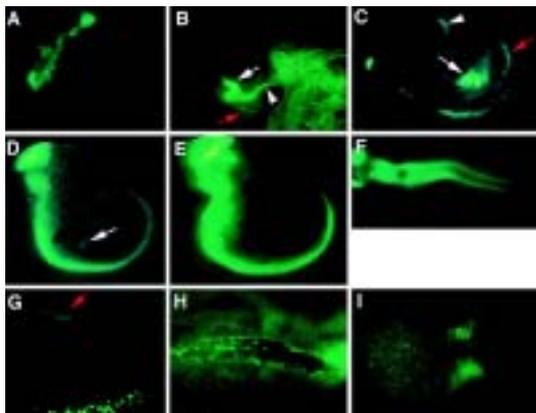


図3 マウス胎児における GATA-2 の発現 (ref. 5)

2.3 新生血管の機能再生

動脈硬化研究のためのトランスジェニックウサギ・モデルの開発

動脈硬化の研究においては、現状では実験研究のための適当な動物モデルがないという問題がある。汎用されているトランスジェニックマウスなどが動脈硬化実験動物として用いられているものの、脂質代謝がヒトとは異なるために動脈硬化が起こりにくい。そこで、動脈硬化の発生及び進展の独立した危険因子である Lp(a) のトランスジェニックウサギを作製した。このウサギにコレステロール食を投与したところ、正常ウサギと比較して高度に病変の広がった動脈硬化を発症した。図4は正常なウサギ（左）とトランスジェニックウサギ（右）の大動脈の内面を示している。赤く染色された部分が動脈硬化の病変部である。現在、このモデルを用いて動脈硬化が発生するメカニズムを解析しつつある。



図4 トランスジェニックウサギにおける大動脈の動脈硬化病変 (ref. 7)

3. 結論

プロセス工学的な視点を中心として、臨床応用可能なレベルのバイオ人工肝臓を開発した。また、動物モデルの作製や転写因子の機能の解析などの基礎的な研究を行うことにより、今後の治療に有用な知見を与えることが期待される成果が得られた。

主な発表論文

1. N. Ohshima, K. Yanagi, H. Miyoshi: Packed-bed type reactor to attain high density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver, *Artif. Organs* 21 (1997) 1169-1176.
2. T. H. Yang, H. Miyoshi, N. Ohshima, Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocyte culture in porous scaffold, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 379-386.
3. A. Suzuki, Y. W. Zheng, R. Kondo, et al.: Flowcytometric separation and enrichment of multipotent hepatic progenitor cells in mouse developing liver, *Hepatology*, 32 (2000) 1230-1239.
4. S. Takahashi, T. Komeno, N. Suwabe, et al.: Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vivo, *Blood* 92 (1998) 434-442.
5. N. Minegishi, J. Ohta, H. Yamagiwa et al.: The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* 93 (1999) 4196-4207.
6. J. Fan, M. Challah, H. Shimoyamada, T. Watanabe: Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein(a) as a useful model for the study of lipoprotein(a), *Ann. NY. Acad. Sci* 902 (2000) 347-351.
7. J. Fan, H. Shimoyamada, H. Sun et al.: Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein(a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 88-94.