

## 微小重力環境を利用した幹細胞による組織再構築

### Tissue reconstitution from multi-lineage stem cells in microgravity

研究代表者 横浜市立大学大学院医学研究科・臓器再生医学 教授 谷口 英樹

Department of Regenerative Medicine, Yokohama City University, Professor,

Hideki Taniguchi, MD, PhD

一個の幹細胞から複数の異なる細胞群が分化・派生することは明らかにされているものの、それらの細胞群がどのように「組織化」され、高次機能を発揮するようになるのかについては解明が進んでいない。幹細胞から分化する細胞群の組織化過程を解析可能な実験系が存在しないことが大きな原因であり、生体外における幹細胞による組織再構築法を確立することが重要な解決課題であるといえる。本研究では、微小重力環境を利用した幹細胞の三次元培養系の確立を試みた。マウス新生児肝臓から分離した肝幹細胞を含む細胞集団を培養したところ、数日間で三次元的な細胞集積体が形成された。組織学的解析の結果、複数の管腔構造が形成されていることが観察されたが、アルシアンブルー染色により管腔内に粘液分泌が認められたことから、この管腔構造は胆管組織であると考えられた。この胆管構造には分岐形態も認められ、複雑な三次元構造を再構成していることが判明した。また、この細胞集積体の内部にはアルブミン陽性細胞が観察され、さらに辺縁部はグリコーゲン貯蔵が認められる成熟肝細胞が存在することが観察されたことから、肝小葉に類似した高次組織構造が再構成されたことが明らかとなった。本培養法により、未分化な幹細胞から高次組織を培養系において再構成することが可能となったが、今後、「組織化のメカニズム」を解明するための基盤技術となることが期待される。さらに、腓ランゲルハンス氏島などのような疾患治療に有用な高次微小組織エレメントを再構成するという革新的な医療技術へ発展していくことが望まれる。

A solid organ to exhibit its higher order functions, cells not only must undergo differentiation and maturation, but it is essential that a three-dimensional tissue is formed by the latter. That is, a new technique must be established, allowing the control of the "organization" through coordination and integration of several groups of cells differentiated from stem cells. The results from the microgravity culture using cell populations isolated from newborn mouse liver showed that several luminal structures. The cells that construct the formed luminal structures had dense cylindrical form, furthermore, from the fact that the production of mucous that was discharged into the lumen was observed by Alcian blue staining, this luminal structure was considered to be a bile duct tissue. In addition, branching morphogenesis was also observed, clearly showing the reconstitution of a complex three dimensional structure. In the central portion of these cell masses, albumin-positive cells were observed; furthermore, the presence of mature hepatocytes performing glycogen storage at the borders of the

cell mass. In this study, the objective is to develop over a long term a new innovative technique to reconstruct hepatic and pancreatic tissues with higher order functions, by establishing a three dimensional culture system in a microgravity environment, using organ stem cells which are pluripotent present slightly in isolated hepatic and pancreatic cell population.

#### 【研究目的】

臓器移植や細胞移植は、末期臓器不全などの致死疾患に対する現時点における唯一の根本的治療法である。ところが、移植用の臓器や細胞の供給には明らかに限界が存在し、極端に不足しているのが現状である。今後の超高齢化社会においては、臓器不全患者が莫大に増加することが予測されており、再生医学における革新的技術開発が待望されているといえる。すなわち、*in vitro* で実際の臓器や組織に近い三次元組織体を再構成することが可能な新規培養技術の開発が望まれている。

疾病治療に用いる微小組織エレメントの再構成を目的とした三次元培養に用いる細胞源としては、免疫学的拒絶反応の無い自己組織由来であり、かつ、十分量の細胞数が供給できるという条件から自己の組織幹細胞が有力な候補のひとつである。また、幹細胞は多能性と自己複製能を有していることから、再構成された微小組織エレメントにおける不断の細胞更新を期待することができ、長期間にわたる高次組織機能の維持において極めて有利な性質を持った細胞であるといえる。しかし、現在のところ、一個の組織幹細胞から複数の異なる細胞系列が分化・派生し得ることは明らかになっているものの、それらの幹細胞から分化した細胞群がどのよう

に協調・統合しつつ「組織化」され高次機能を発揮するようになるのかについては、全く解明が進んでいない。これは、幹細胞から分化する細胞群の「組織化」をクローナルに解析可能な *in vitro* 実験系が存在しないことが大きな原因である。

本研究は、細胞の高密度化・培養環境の安定化・非支持細胞と支持細胞の多彩な位置関係の設定などが可能な微小重力環境（最小対流、最小ズリ力）を利用して、多分化能と自己複製能を有する幹細胞の三次元培養系を確立することにより、幹細胞から分化する細胞群の「組織化」のメカニズムを解明し、長期間にわたり高次機能を発揮可能な「組織」を再構成する新規培養技術を開発することを試みるものである。

肝臓や膵臓などの組織幹細胞から、高次機能を有する肝組織や膵ランゲルハンス氏島（膵島）などが培養系において再構築できるようになれば、肝疾患や糖尿病の再生治療につながる革新的な新技術であるといえ、将来的には「組織・臓器の工業的生産」という人類の夢ともいえる極めて大きな社会的恩恵をもたらす可能性があると考えられる。また、宇宙環境の有効利用という未知の可能性を有した未踏領域の開拓に向けた萌芽的研究課題であるといえる。

#### 【研究の経過と成果】

まず、予備的実験として肝癌細胞株である HepG2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/ml の播種密度で微小重力培養を行ったところ、直径約 3 mm の細胞集積体が形成された。培地交換は培養 4 日目に行なった。細胞集積体は、培養期間中徐々に大きくなり、培養 10 日目には直径約 10mm になった。培養後の細胞集積体切片の HE 染色による組織観察の結果、内部の細胞は非常に良好な状態であった (図 1-a)。培養中の細胞の活性を調べるために培養液中のグルコース濃度変化を経時的に測定した結果、グルコース濃度は培養日数の経過につれて低下していくことが確認され、培養細胞はグルコースを代謝し、細胞活性を有していることが明らかとなった (図 1-b)。

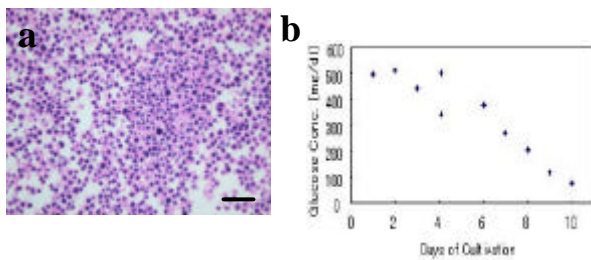


図 1 a) HepG2 を 10 日間微小重力培養して形成された細胞集積体の HE 染色像。b) 培養 10 日間のグルコース濃度の変化。

次に、マウス新生児肝臓から分離した細胞集団を、 $1 \times 10^6$  cells/ml の播種密度で微小重力培養を行った結果、細胞集積体は培養 2 日目に形成された (図 2-a)。培養 8 日目の細胞集積体の HE 染色による組織観察の結果、細胞集積体中に複数の管腔構造が観察された (図 2-b)。図 2-c は、コントロールとして分離直後の同様の細胞を遠心により細胞塊状にし、固定後 HE 染色を行ったものであるが、血球様の細胞が多数観察され、

微小重力培養によって形成された様な管腔構造は全く認められなかった。

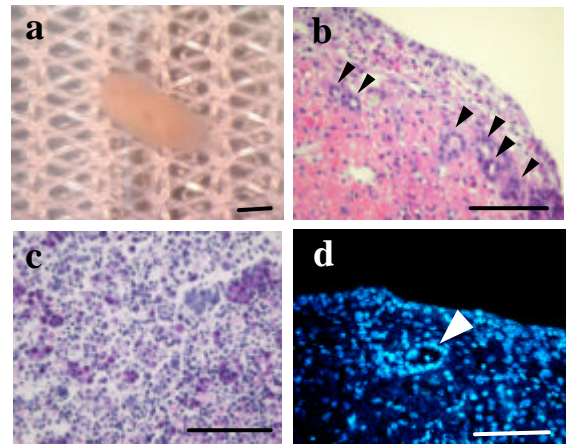


図 2 a) マウス新生児肝臓から分離した細胞集団を 8 日間微小重力培養して形成された細胞集積体。b) 形成された集積体の HE 染色像、c) 同じ細胞集団を遠心によって細胞塊状にし HE 染色した像。d) ヘキスト染色像。矢頭は管腔構造を示す。

形成された管腔構造を構成する細胞は密に接した立方円柱状の形態であり、さらにアルシアンブルー染色により管腔内に粘液が分泌されていることが認められた (図 2-b, 図 3-d) ことから、この管腔構造は胆管組織であると考えられた。また、この胆管構造を連続切片で観察したところ分岐形態 (branching) も認められ、複雑な三次元構造を再構成していることが判明した (図 3 a-c)。この細胞集積体切片をヘキストによる核染色で観察したところ、細胞集積体中の細胞核の大部分が染色され、内部の細胞は間違いなく生存していたことが確認された (図 2-d)。

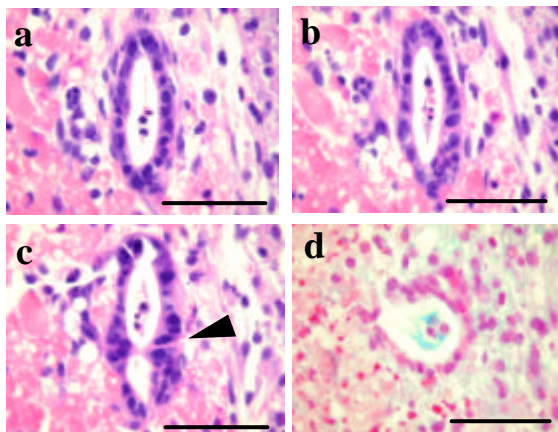


図 3 a-c) 形成された管腔構造の連続切片の HE 染色像。矢頭は分岐形態を示す。d) アルシアンブルー染色像。管腔内部に粘液の分泌が認められる。

集積体中の細胞が肝細胞としての機能を有しているかを調べるため、肝細胞マーカーであるアルブミンに対する免疫染色を行ったところ、アルブミン陽性細胞が多数観察された (図 4-a)。また、PAS 染色を行った結果、細胞集積体の辺縁部にグリコーゲン貯蔵を行っている成熟肝細胞が存在することが確認された (図 4-b)。

本研究により、マウス新生児肝臓から分離した幹/前駆細胞を含む細胞集団を用いた微小重力回転培養により、形成された細胞集積体の中心部にアルブミン陽性の肝細胞集団が存在し、

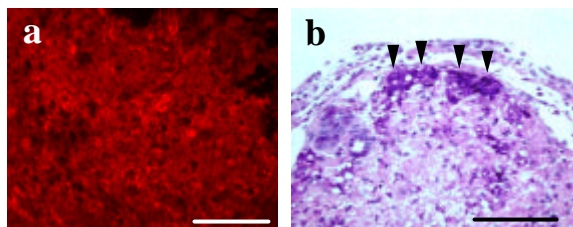


図 4 a) 形成された細胞集積体のアルブミン免疫染色像、b) PAS 染色像。集積体辺縁部にグリコーゲンを貯蔵している細胞が認められる (矢頭)。

その辺縁部に胆管構造が配置される、肝小葉に類似した組織構造が再構成されることが明らかとなった。

#### 【今後の課題と展望】

本研究では、幹細胞の三次元培養系が確立され、幹細胞による高次組織の再構成が可能となった。しかし、今回の培養系では組織化の過程における幹細胞の詳細な役割は明らかになっていない。また、肝実質細胞による肝細胞索様の構築が十分には行われなかったが、その原因として類洞等の血管系再構築が伴わなかったことが考えられる。今後、EGFP (enhanced green fluorescent protein) で標識された少数の純化された幹細胞を本培養系に少数挿入することにより、組織形成過程における幹細胞の役割を可視化することが望まれる。また、血管内皮前駆細胞との共培養などにより、血管系構築を平行して誘導することが必要と考える。これらの課題が解決されれば、「細胞分化にともなう組織化」の制御メカニズムが解明され、三次元的な組織構築を対象とした幹細胞生物学における新たな研究領域が展開すると期待される。

#### 【発表論文リスト】

1. Okamura, A. et al.: manuscript in preparation
2. 岡村愛、谷口英樹: バイオマテリアル-生体材料-, 21-3, 220-221 (2003)
3. 谷口英樹: 肝臓の再生 幹細胞を利用した微小組織エレメントの再構成 . 再生医療工学, 立石哲也・田中順三編著、工業調査会、p183-187(2004) .