

朝長哲生 論文内容の要旨

主 論 文

Rat Hepatocyte Spheroids Formed on Temperature-Responsive PIPAAm Polymer-Grafted Surface Maintain Long-Term Differentiated Hepatocyte Function

『温度応答性ポリマー高グラフト化表面によるラット培養肝細胞の長期機能維持（スフェロイド形成）』

朝長 哲生、曾山 明彦、山之内 孝彰、高槻 光寿、
黒木 保、小路 武彦、江口 晋

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA 2014 in press.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学専攻
主任指導教員：江口 晋教授

緒 言：

肝細胞の培養系において、長期間機能維持を可能とする培養技術の開発は、人工肝臓の開発や薬剤代謝試験などの応用に極めて重要な要素技術である。一般に分離肝細胞の単層培養を行うと、急激に肝特異的機能が低下することが知られている。

温度応答性ポリマーである poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) を表面にグラフト化した細胞培養基材（温度応答性培養皿）は、32°C以上の温度でポリマー鎖が疎水性表面を形成し、細胞を接着させる。一方で、基材表面への PIPAAm グラフト量が増加すると、ポリマー鎖の易動性により細胞が付着し難くなる。

この温度応答性培養皿上で作成した細胞シートを用いたシート工学の技術が、再生医療分野における新たな技術として注目されている。この温度応答性培養皿を用いることにより、細胞は温度変化のみで容易に回収することが可能で、従来のようなトリプシン等による酵素処理が不要である為、細胞間の結合や接着因子を損傷することなく細胞に大きな傷害を与えることがない。この技術は既に眼科領域での自己細胞シートを用いた角膜移植や食道 ESD (Endoscopic submucosal dissection) 後の狭窄予防目的の自己口腔粘膜シート貼付等で臨床応用されており、新たな再生医療として確立されてきた。

本研究は、細胞接着性を規定する PIPAAm グラフト量を変えた種々の細胞培養基材を作製し、培養肝細胞の高機能化を探索することを目的として行った。

対象と方法：

ポリマー非グラフト化培養皿および4段階の異なる PIPAAm 固定量を有する培養皿を準備した。

- 群別：・ポリマー非固定化培養皿(Control)；(-)
・ポリマーグラフト化培養皿（市販の UpCell®）；1+
・ポリマー高グラフト化培養皿；2+ / 3+ / 4+ 以上5群に分類。

培養皿に一律にI型コラーゲンコート(600 μ g/ml/well 3hours)を行い、ラット分離肝細胞培養を行った。

実験動物：Sprague-Dawley(SD)rat ♂ 12~14W を用いた。2-step collagenase 法にて肝細胞分離。細胞密度は 1.1×10^6 cells/35mm dish で播種した。

培養液組成：DMEM + 10%FBS + Dexamethasone(10⁻⁷M)+ Insulin(0.5 μ g/ml)+ L-proline(30 μ g/ml)+ EGF(10 ng/ml)+ Asc-2P(0.2 mM)+ 1% DMSO

観察項目：・形態観察（光学顕微鏡・電子顕微鏡 TEM）・培養液中産生アルブミン濃度の測定（ELISA 法）

結 果：

形態観察では、培養皿上の PIPAAm 量が多くなるに従い、肝細胞は立体的な形態を呈し、長期培養（7日目・14日目）により一部はスフェロイド体を形成した。電子顕微鏡画像では、(-)群では stress fiber や oil drop が観察されたのに対し、4+群では bile canaliculi の形成や tight junction が観察された。

機能変化では、培養液中のアルブミン産生量はポリマー非グラフト化培養皿では急激な低下を観察した。一方、PIPAAm 高グラフト化培養皿においては、14日までほとんど低下を認めなかった。

考 察：

培養肝細胞の長期機能維持に関してはこれまで種々の報告がなされており、肝細胞スフェロイドの形成を促すことがその一助になることは知られている。しかしながらその培養方法には特殊な器材や培養環境が必要であることが多く、広く普及はできていない。

今回、PIPAAm 高グラフト化表面で培養することにより培養肝細胞のスフェロイド化が促進され長期機能維持が可能となった。本培養系の利点としては、・静置培養が可能であり簡便であること、・温度応答性培養皿上での培養であり、細胞間の接着を損傷することなく温度変化のみで肝細胞回収が可能であること、が挙げられる。スフェロイド化が促進された理由としては、Focal adhesion kinase(FAK)に代表される細胞外マトリックスを保ちやすい環境にあると想像される。今後の薬物代謝実験や肝再生医療への応用が期待される。

(備考) ※日本語に限る。2000字以内で記述。A4版。