

肝再生を目標とした小型肝細胞と血管内皮細胞による 3 次元共培養モデルの構築

3D Coculture System Composed of Small Hepatocytes and Endothelial Cells for Reconstructed Liver Tissue.

80715773 粕谷淳一(Junichi Kasuya) Supervisor 谷下一夫(Kazuo Tanishita)

1 結論

組織工学では、血管を有する培養肝組織の再生に向けて、肝細胞と血管内皮細胞による共培養系を構築する必要がある。

肝臓では、肝細胞は星細胞を介して類洞内皮細胞と秩序立った 3 次元構造を形成し、活発な相互作用のもと高次の肝機能を維持している (Figure.1A)。

これまで肝臓の秩序立った 3 次元構造を考慮し、肝細胞と血管内皮細胞が安定した構造を維持する共培養系は報告されておらず、実現することが不可欠である。

そこで本研究では、多孔性薄膜を用いることで、肝臓の 3 次元細胞配置を模擬した小型肝細胞と血管内皮細胞による共培養システム (Figure.1A) を提案する。さらに本共培養システムにおける異種細胞間相互作用について検討した。

2 方法

ラットより分離した小型肝細胞および星細胞を多孔性 (1 μ m-pore) 薄膜上に接着させ、膜を反転して 2 週間培養した。次いで薄膜上面にウシ肺微小血管内皮細胞を接着させ、3 次元共培養システムを構築した。

免疫蛍光染色および透過型電子顕微鏡による鉛直断面の観察により、3 次元構造や基底膜成分の分布を検討した。

さらに、3 次元構造の形成に伴う異種細胞間相互作用が内皮細胞の形態に及ぼす影響を免疫蛍光染色により検討した。

3 結果

3.1 共培養システムの構築とその構造の検討

多孔性薄膜下面に接着した小型肝細胞と星細胞は増殖し、培養 2 週間で毛細胆管を伴う類肝組織を形成した。同時に星細胞から伸びた細胞突起は薄膜の微孔を貫通して膜上面を覆った。次いで薄膜上面に播種した内皮細胞は、星細胞と接触を保ちながら均一な単層構造を形成した。星細胞により肝細胞層と内皮細胞層が仲介された 3 次元構造 (Figure.1B) が構築され、この構造は少なくとも 40 日以上安定して維持された。

肝臓では肝細胞層と内皮細胞層の間に基底膜成分が分布している。本共培養系においても肝細胞層と内皮細胞層の間に基底膜成分が分布していた。

3.2 異種細胞間相互作用の検討

異種細胞間相互作用が内皮細胞の形態に及ぼす影響を検討した (Figure.2)。共培養系の内皮細胞は長細い形態を示した (co-culture(SH+HSC+EC))。一方で、単独培養; monoculture、内皮細胞と星細胞との接触を阻害した共培養; CM-culture、肝細胞を除いた共培養; co-culture(HSC+EC)では、内皮細胞はより円形に近い形態を示した。

4 考察

多孔性薄膜を利用して星細胞を仲介させることで、肝臓での秩序立った細胞配置を反映した小型肝細胞と内皮細胞による 3 次元共培養システムを構築した。この構造は長期にわたり

維持され、さらに肝細胞層と内皮細胞層の間には肝臓と同様の基底膜成分が分布していたことから、これらの成分が構造形成に寄与していることが示唆される。

さらに、内皮細胞は、小型肝細胞・星細胞とともに肝臓に類似した 3 次元構造を形成した本共培養システムでのみ長細い形態をとった。これは、肝臓の秩序立った 3 次元構造を形成することにより異種細胞間相互作用が促進されたことを示唆する。

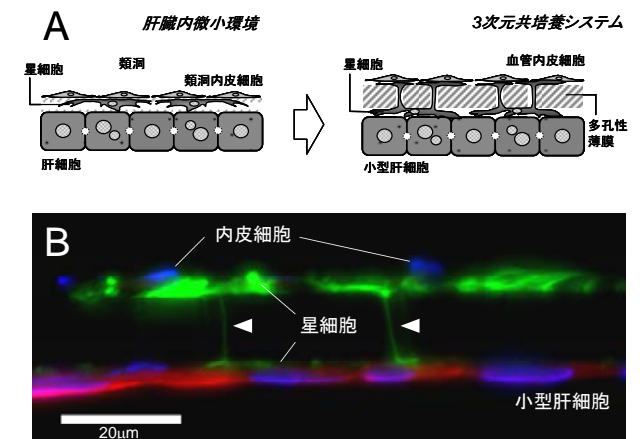


Figure 1. A) Schematic diagram of liver microenvironment and 3D co-culture system. B) Vertical section of the 3D co-culture system. Arrowhead; hepatic stellate cells' process.

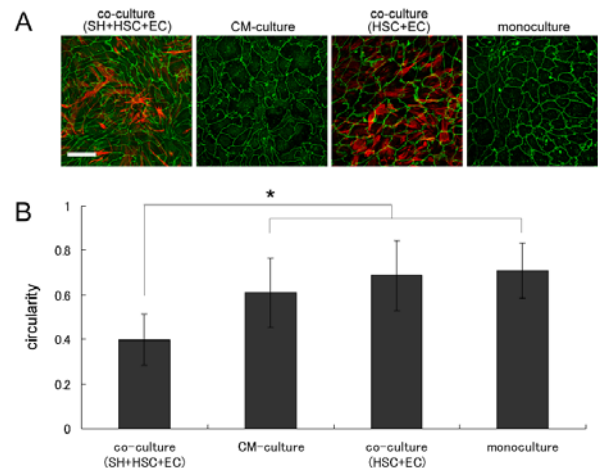


Figure 2. Effect of heterotypic cell interactions on BPMECs' morphology. A) The distribution of the BPMECs (green) and the HSCs (red) on the top surface of membrane at 6th days in co-culture. B) Quantitative analysis of BPMECs' circularity. * indicates $p < 0.001$ as compared to co-culture (SH + HSC + EC).

5 結論

多孔性薄膜を用いて星細胞を仲介させることで、安定した 3 次元構造を長期にわたり維持する肝細胞と内皮細胞による共培養システムを構築した。