

乳酸-グリコール酸共重合体薄膜の分解に応じた小型肝細胞の積層化

Reconstruction of 3D stacked-up structures of rat small hepatocytes

by biodegradation of poly(dl-lactide-co-glycolide) microporous membrane

80716884 田母神龍 (Ryu Tamogami) Supervisor: 谷下一夫 (Kazuo Tanishita)

1 Introduction

生体外における肝組織再生において、3次元的な組織を構築することが課題である。しかし、バイオ人工肝臓にみられる細胞塊による3次元組織を形成すると、肝機能の上昇は見られるものの、生体内にみられる秩序だった構造を再構築するには至らない。Sudoらは、Polycarbonate membrane (PCMB)を用いた小型肝細胞の積層培養法を用いることで、生体肝にみられる肝細胞索状構造を模倣し、かつ肝特異的機能を維持することに成功した^[1]。しかし、PCMBは非分解性材料であり、組織中に残存するため、2層以上の積層が不可能である。本研究では、生体吸収性材料を用いて薄膜を作製し積層培養に用いることで、上記の課題の解決を試みた。重合比によって分解速度を制御できる乳酸-グリコール酸共重合体 poly(dl-lactide-co-glycolide);PLGAを使用し、相分離法を用いて多孔質薄膜化した。また、薄膜を小型肝細胞layer間に介在させる積層培養モデルを作製し、薄膜の分解による小型肝細胞コロニーの積層3次元化を目指した。本モデルにおける薄膜の分解、吸収および積層化の過程での上下の小型肝細胞の形態、極性、機能変化を明らかにした。

2 Materials & Methods

2-1 PLGA 薄膜の作製 重合比 50/50PLGA を 50mg/ml で Dioxane-IEW 溶液に調製した。Dioxane 内の含水率を 0~10% で変化させた。高密度 Polyethylene シート上において溶液 400 μ l を 2000rpm, 1Sec スピンコートし、48h 真空乾燥することで薄膜化した。PLGA membrane; PLGA 両面にあらかじめ rat tail collagen を塗布した。

2-2 細胞分離・培養 小型肝細胞は、SD ラット (8w, ♂) より 2 段階コラゲナーゼ肝灌流法と遠心分離法を用いて分離し、DMEM を基本とする培地で培養した。

2-3 積層 Dish 上で 6 日間培養した小型肝細胞 Monolayer 上に、PLGA 薄膜上で培養した小型肝細胞を積層した。Medium を抜き、1h Incubate した。

3 Results & Discussion

3-1 作製した PLGA のスペック Dioxane-IEW 相分離法を用いることで、PLGA に孔が形成された (図. 1)。また、Dioxane 内の含水率を変化することで、孔径、空隙率が制御された。含水率 8% の PLGA について DMEM のみ、IEW のみ、小型肝細胞の単層培養のそれぞれの条件において平均分子量は 20 日目まで約 30% にまで減少したが、条件による差はみられなかった。DMEM のみの場合、30 日を経過しても空隙率に変化は見られなかったのに対し、小型肝細胞を培養するとコロニー下部部分について培養 10 日目から空隙率の上昇が見られた。PLGA は加水分解により分子量が減少し、オリゴマー領域まで分解すると水溶性に変化し、10 日目周辺から重量の減少がはじまる^[2]。培養

10 日目からコロニー下部における空隙率の上昇がはじまったのは、PLGA の重量減少に伴う変化と考えられる。

3-2 PLGA の分解に伴う小型肝細胞の変化 膜上面の小型肝細胞核は、培養 10 日目から真球化が進んだ。また、薄膜の分解により積層化された小型肝細胞間に細胞接着蛋白である Cadherin が発現した (図. 2)。培養 14 日目には組織内に短い毛細胆管様構造が MRP-2 により同定され、20 日目には毛細胆管が枝分かれして形成されていた。また、PLGA の分解に伴い肝特異的機能である Albumin 産生能が培養 20 日目において単層培養の約 1.5 倍に向上した。PLGA に接着していた小型肝細胞は、PLGA の分解により上下の細胞と接着し、Cadherin を発現した。細胞同士の接着は足場に対する接着よりも弱いため、細胞核が真球化したといえる。また、Cadherin の発現に伴い肝細胞が極性を持つ過程で毛細胆管を形成し、分化した。これらの PLGA の分解に端を発する積層化の過程により形成された 3 次元構造が、生体内の肝小葉にみられる微小構造を模倣する形で再組織化されたため、Albumin 産生能が向上したと考えられる。

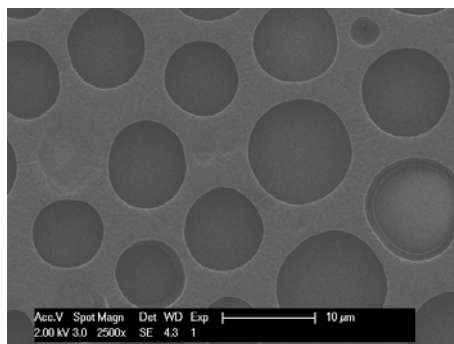


図. 1 作製された PLGA の SEM 画像 (含水率 8%)

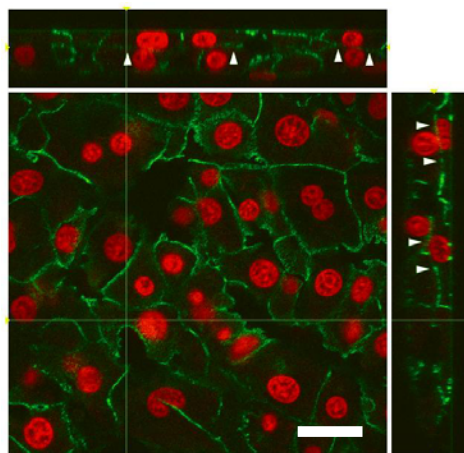


図. 2 積層された小型肝細胞間の Cadherin (Arrowhead) Day 12, Red: Nuclei, Green: Cadherin Scalebar=20 μ m

4 References

- [1] Sudo R et al., Faseb J., 2005 Oct;19(12):1695-7
- [2] 高分子学会 バイオマテリアル 2005