

平成19年 2月 28日

氏名 花田 三四郎



21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科
応用化学専攻、化学システム工学専攻、
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成18年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	はなだ さんしろう	生 年 月 日
	花田 三四郎	
所属機関名	東京大学大学院 工学系研究科 化学システム工学専攻 東京大学大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター 酒井研究室	
所在地	東京都文京区本郷7-3-1	
申請時点での 学 年	博士課程3年	
研究題目	新規移植型肝組織の in vitro 再構築	
指導教員の所属・氏名	東京大学大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター 酒井 康行	

I 研究の成果 (1000字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

緒言および方法

胎児肝は、その高い増殖能および分化能により、肝組織工学の細胞源としての有力な候補である。移植デバイスへの適用を目指し、ラットの胎児肝細胞を用い、適切な液性因子群と三次元培養により肝機能レベルでの成熟化を試みた。具体的には、1)胎生日数による増殖と分化能の比較、2)液性因子による分化誘導の2点である。

1)に関しては、十分な細胞回収を前提とし、その増殖能を評価するため、胎生後期(胎生15,17,19日)に関する検討を行った。2)に関しては、肝発生に寄与することが知られている、三因子のカクテル(肝細胞成長因子(HGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF-1, FGF-4); 3GFs)、オンコスタチンM(OSM)、および分化誘導ケミカルとして知られている酪酸ナトリウム(B)についてその効果を検討した。

また、三次元培養については、既存のポリL乳酸の多孔質担体を用い、物質交換性を高めるため、旋回培養を行った。肝機能は、ラット血清アルブミンの分泌量およびチトクロムP450(CYP)1A1/2酵素活性を測定し、増殖能の指標として、DNA量およびグルコース消費量を測定した。

結果

(1) 最適な胎生日数の選択

通常の単層培養系では、胎生日数15日では増殖が高いが、機能は低く、胎生日数19日では肝機能が高いものの増殖がほとんど得られないことが示された。胎生17日はその中間であった。しかしながら、三次元培養へ適用したところ、胎生15日では、胎生17日と比べ、十分な増殖能が得られなかった。これは、胎生15日では、細胞骨格が十分に形成されず、旋回培養系によって機械的なダメージを受けるためである。本研究では、以降増殖と肝機能のバランスから胎生17日を用いて肝細胞の成熟化を試みた。

(2) 液性因子群による成熟化の効果

各種添加因子は、各々異なった効果を示した。3GFsの添加により、初期のアルブミン分泌の上昇をとくに確認した。一方その効果は一時的であり、肝機能は急激に低下した。Bはより高次の機能であるCYP1A1/2活性において著しく高いレベルを示した。OSMは、比較的機能を維持する効果を示し、また、DNA量およびグルコース消費量の上昇から、細胞の増殖に効果があると考えられる。これらの効果は、とくに三次元培養で顕著であり、2週間の培

養期間においてその機能、増殖能ともに維持された。

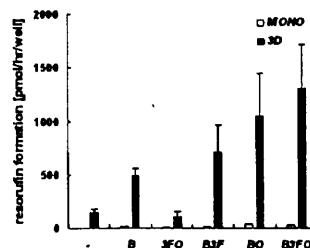


Fig. A: Soluble factors dependence of Liver specific function (CYP1A1/2 capacity)

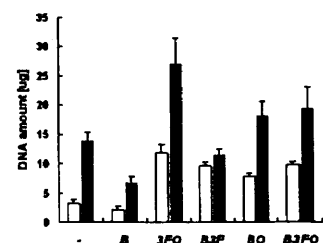


Fig. B: Soluble factors dependence cellular proliferation (DNA amount)

氏 名

花田 三四郎

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

1) Enhanced in vitro maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three-dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M: S. Hanada, H. Kayano, J. Jiang, N. Kojima, A. Miyajima, A. Sakoda and Y. Sakai, International Journal of Artificial Organs. 26(10), 943-951 (2003).

2) A novel poly-L-lactic acid scaffold that possesses a macroporous structure and a branching/joining three-dimensional flow channel network: Its fabrication and application to perfusion culture of human hepatoma Hep G2 cells: Y. Sakai, M. Otsuka, S. Hanada, Y. Nishiyama, Y. Konishi, A. Yamashita, Material Science and Engineering C. 24(3), 379-386 (2004). (灌流実験を一部担当)

3) 化学工学シンポジウムシリーズ 79 「診断・治療システムにおける化学工学」
ラット胎児肝細胞の三次元培養系による肝分化誘導における各種液性因子の効果
花田三四郎・小島伸彦・酒井康行 84-85 (2005)

氏 名

花田 三四郎

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者 (全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

(1) 花田三四郎 (大学院生)、菅野寛美 (研究実習生)、小島伸彦 (神奈川科学技術アカデミー 研究員)、宮島篤 (東京大学 分子細胞生物学研究所 教授)、迫田章義 (東京大学 生産技術研究所 教授)、酒井康行 (東京大学生産技術研究所 助教授)

「ポリ乳酸多孔質担体を用いた継代ヒト胎児肝細胞の三次元培養」

第2回日本再生医療学会総会 神戸ポートピアホテル/神戸国際会議場 2003年3月

(2) 花田三四郎 (大学院生)、菅野寛美 (研究実習生)、小島伸彦 (神奈川科学技術アカデミー 研究員)、宮島篤 (東京大学 分子細胞生物学研究所 教授)、迫田章義 (東京大学 生産技術研究所 教授)、酒井康行 (東京大学生産技術研究所 助教授)

「生体吸収性多孔質担体を用いた三次元灌流培養によるヒト胎児肝細胞の分化誘導」

化学工学会 群馬大会 水上温泉ホテル聚楽 2003年7月

(3) 花田三四郎 (大学院生)、迫田章義 (東京大学 生産技術研究所 教授)、酒井康行 (東京大学 疾患生命工学センター/生産技術研究所 助教授)

「ポリ乳酸三次元多孔質体を用いたヒト胎児肝細胞の灌流培養」

第41回日本人工臓器学会 仙台市民会館 2003年10月

(4) 花田三四郎 (大学院生)、小島伸彦 (東京大学 生産技術研究所 助手)、迫田章義 (東京大学 生産技術研究所 教授)、酒井康行 (東京大学 疾患生命工学センター/生産技術研究所 助教授)

「ラジアルフロー型リアクター灌流培養による高密度肝組織の *in vitro* 形成」

第3回日本再生医療学会総会 幕張メッセ 2004年3月

(5) 花田三四郎 (大学院生)、小島伸彦 (東京大学 生産技術研究所 助手)、迫田章義 (東京大学 生産技術研究所 教授)、酒井康行 (東京大学 疾患生命工学センター/生産技術研究所 助教授)

「ポリ乳酸マイクロキャリア充填リアクター灌流培養によるヒト胎児肝細胞の分化誘導」

化学工学会第69年会 大阪府立大学 2004年4月

(6) S. Hanada, N. Kojima, Y. Sakai

“Enhanced *in vitro* maturation of fetal rat liver cells in the late pregnancy with oncostatin M, dimethylsulfoxide and nicotinamide”

APBioChEC'05 : Jeju Island, Korea : 2005年5月

(7) 花田 三四郎 (大学院生)、岡田 直也 (大学院生)、小島 伸彦 (東京大学 生産技術研究所 助手)、落谷 孝広 (国立がんセンター研究所)、酒井康行 (東京大学 疾患生命工学センター/生産技術研究所 助教授)

「三次元培養による胎生後期ラット胎児肝細胞の成熟化」

第13回 肝細胞研究会 旭川グランドホテル 2006年6月