【特集II】〈第27回日本外科系連合学会学術集会ワークショップ2〉
Tissue engineering

2. Tissue engineeringへのずり応力の応用
—肝細胞, 肝組織に対するずり応力の影響—

埼玉医科大学消化器一般外科(I)

鳥井孝宏 宮澤光男 小山 勇

Application of Shear Stress to Tissue Engineering
—Effect of Shear Stress on Hepatocyte and Liver Tissue—

Takahiro TORII, Mitsuo MIYAZAWA and Isamu KOYAMA

Department of Surgery, Saitama Medical School

Tissue engineeringによって肝組織を再構築するためには, 3次元構造物(scaffold)に対する肝細胞の遊走, 接着, 凝集を制御することが必要である。われわれは, 回転式ラジアルフロー型バイオリアクター(RRFB)でずり応力を負荷し, 肝細胞膜表面の操作およびscaffoldの作り出す間隙の環境変化を導き出し, 肝細胞のscaffoldへの接着性の制御を試みている。このような肝細胞動態を積極的に制御する研究は現在までのところあまりない。肝組織再構築のためには, このような観点からのさらなる検討が必要である。

索引用語: 組織工学(tissue engineering), 回転式ラジアルフロー型バイオリアクター(RRFB), ずり応力(shear stress), 細胞外基質(extracellular matrix)

はじめに

Tissue engineeringを応用し肝組織を再構築するためには, 3次元構造物(scaffold)に肝細胞を適度な形で接着させることが必要である。しかし, 通常, 単にscaffoldに肝細胞を播種してもscaffoldに肝細胞を接着させる物質(細胞外基質, 等)が付着していなければ, あるいは, 肝細胞が自己より接着する物質を産生, 分泌しなければ, 肝細胞は重力によってscaffoldの下方に沈降してしまう。scaffoldに肝細胞を接着させるためには, scaffold表面を工夫するか, scaffoldの作り出す間隙の環境を変化させるか, あるいは肝細胞自体を変化させなければならない。われわれは, ずり応力を肝細胞に負荷し肝細胞自体を変化させ, 肝細胞の

scaffoldに対する接着性制御を試みている。本稿においては, われわれがずり応力負荷装置として検討している回転式ラジアルフロー型バイオリアクター¹⁾についてと, この装置によって肝細胞自体を変化させた後, 肝細胞がscaffoldに接着するために, どのように遊走し, 凝集し, 組織を形成していくのか, 現在までの知見にわれわれの検討を加え概説する。

回転式ラジアルフロー型バイオリアクター(RRFB)

われわれはずり応力を利用し, 肝細胞膜表面の操作およびscaffoldの作り出す間隙の環境変化を導き, 肝細胞をscaffoldに接着させるため, ずり応力負荷装置として回転式ラジアルフロー型バイオリアクター(RRFB)を用いている。Fig. 1にその

2. Tissue engineeringへのずり応力の応用—肝細胞、肝組織に対するずり応力の影響—

Fig. 1 Model of the rotating radial-flow bioreactor (RRFR) with radial center-to-edge flow: The liver slices are attached on the gauze. The bioreactor itself is rotated on the stirrer.

$$\tau = \frac{3\mu Q}{\pi H^2 r} + \frac{\mu \omega r}{H}$$

Where (τ =shear stress, μ =Viscosity, Q =Flow rate(lm/min), H =height of the flow circuit (0.5 cm) and r =radius of the flow circuit(3.0cm))

Fig. 2 The formula for calculation of shear stress (SS): The SS was calculated by disregarding the effects of the matrix adhering to the co-culture medium and the interaction of the centrifugal and the flow conditions of the culture fluid. The centrifugal force of the rotation and the force of the culture fluid flowing on the circular plate under stationary conditions were applied. The shear stress obtained from this calculation was within the range of about 5 to 20 dyne/cm² when (ω =30rpm).

模式図(Able, Japan)を示した。この装置により、ステンレス板上でscaffoldに付着した肝細胞と灌流液に遠心力が加わり、ずり応力が負荷される。ずり応力の真の値は、培養中に生じる死細胞等によって変化してしまうため、ここではずり応力の計算値は簡略化して示した(Fig. 2)。つまり、この装置によって肝細胞に負荷されるずり応力は、肝細胞を付着させるscaffoldの影響、遠心力と培養液の流れ方の相互作用等は無視し、回転における遠心力と静止した状態における円形な土台上を流れる培養液の力を加えたものとした。

肝細胞の遊走

Tissue engineeringによって肝組織を作製する

ためには、肝細胞がscaffoldの方向あるいは他の肝細胞の方向に遊走し、scaffoldに接着し、さらに肝細胞同士も接着しなければならない。どのように細胞が遊走し、形態を形成していくかは1963年にSteinberg²⁾によって展開された理論に基づくと考えられる。この理論の基本となるのは、細胞自体および細胞同士は自由エネルギーを最小限にする方向に移動するということである。具体的には、細胞-scaffold間および細胞-細胞間で考えると、細胞-scaffold間の接着性が低ければ細胞-細胞間接着が増大するように細胞は遊走し、細胞-scaffold間の表面の自由エネルギーが小さくなるように変化する。逆に、細胞-scaffold間の接着性が高ければ、自由エネルギーの減少は細胞-scaffold間の接着性をさらに増加させるように働く。つまり、細胞-細胞間接着の強度が細胞-scaffold間接着よりも強い場合、細胞同士は凝集するように、他の細胞と接着するように遊走していく。また逆に、細胞-細胞間接着の強度が細胞-scaffold間接着よりも弱い場合、細胞はモノレイヤー様の構造をとることとなる。この理論をPowersら³⁾は、肝細胞を用いて、2次元培養ではあるが、生物物理的に解析している。

われわれは、ずり応力を用い、3次元scaffold内においてこの理論の検証を試みており、現在までの検討においては、3次元においても同様の現象が起こることを確認している⁴⁾。

肝細胞の凝集

肝組織再構築のためには、遊走してきた肝細胞が接着し凝集しなければならない。この凝集という細胞同士が収縮する現象、つまり、わずかに接着した2つの細胞が強く接着し、さらに他の細胞を接着させていく現象も上記と同じで、細胞自体あるいは細胞とscaffoldとがもつ自由エネルギーを最小限にする方向に形態変化がおけると考えても良い。細胞-細胞が接触すると、細胞間の収縮のシグナルが開始され、このシグナルは積極的に凝集しようとしている辺縁の細胞の収縮を促進する⁵⁾。2次元の培養液中でこれらの形態現象は、培養液が含有している物質、濃度、培養皿上における肝細胞膜のレセプターに対するリガンドの量によって単層の凝集になるのか、スフエロイド様の

凝集になるのかが決定される。このことは、いろいろな種類のリガンドを変化させても、肝細胞の凝集形態としてはあまり変化しないことを示している。つまり生化学的なシグナルは凝集形態にはあまり影響を及ぼさず、リガンドの生物物理学的シグナルが結果としての凝集形態にとっては基本的な要素といえる⁶⁾。これらの細胞凝集の開始は生物物理学的シグナル、いかえれば細胞における細胞骨格変化のシグナルに依存していると考えられる。

われわれは、3次元scaffold内に肝細胞を播種し、ずり応力を負荷することにより、この細胞骨格を活性化させることを試みている。また、scaffold上に細胞外基質を付着させ、細胞骨格が活性化された肝細胞がどのような形態変化を示すかを検討している。われわれの利用しているRRFBは、ずり応力を段階的に変化させることが可能である。現在、肝細胞骨格の活性化の程度と細胞形態との関係、さらに細胞外基質との関係を詳細に解析し、肝組織の再構築のためにどのようにずり応力を応用すべきか検討中である。

肝細胞凝集の結果として実際の肝組織の再構築を目的とした場合、肝細胞の極性を考慮しなければならない⁷⁾。肝の索状構造内には厳密な3つの領域がある。その領域としては、微小胆管を形成する部位、肝細胞を接着させる上皮性の結合組織よりなる部位、さらには類洞内皮細胞と他の肝非実質細胞とを調節する部位からなる。この索状構造を呈する細胞形式は少なくともある程度は肝特異的機能発現には必須であると報告されている。しかし、肝細胞とこの索状構造において重要と考えられる血管内皮細胞との混合培養や、他の肝非実質細胞との混合培養の相互作用についてはあまり多くの研究がなされておらず⁸⁾、その混合培養が作り出す形態に関してはほとんどわかっていないのが現状である。今後、tissue engineeringという観点からこのような混合培養における形態変化に関する検討が望まれる。

おわりに

Scaffoldの方向に肝細胞が遊走し凝集した後、scaffoldと肝細胞が形成する集塊は肝組織類似の

ものとなる。この肝組織類似の集塊、つまり再構築された肝組織の肝特異的機能発現を維持させるためには、実際の肝組織がどのようにしたら長期培養可能であるかを検討することが簡単な方法である。われわれは、肝組織に対してもこのRRFBでずり応力を負荷する実験を始めており、適度なずり応力は肝組織の肝特異的機能発現維持に対して優位に働くことを確認している。しかし、現在までのところずり応力負荷した肝組織培養が維持できる肝特異的機能は、分離した肝細胞培養の数分の一である。今後、肝組織培養における機能維持をどのようにするか、さらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Miyazawa M, Ueda M, Kitajima, et al: The current status and problems of the artificial liver development from the the viewpoint of the shape of a reactor of artificial liver. *Acta Hepatologica Japonica* 41: 230-231, 2000
- 2) Steinberg MS: Reconstruction of tissues by dissociated cells. *Science* 141: 401-408, 1963
- 3) Powers M, Rodriguez R, Griffith L: Cell-substratum adhesion strength as a determinant of hepatocyte aggregate morphology. *Biotechnol Bioeng* 53: 415-426, 1997
- 4) Miyazawa M, Ueda M, Kitajima M, et al: Shear stress promotes albumin and interleukin-6 production in hepatic parenchymal and nonparenchymal cell co-cultures. *Gastroenterology* 118: A903, 2000
- 5) Powers M, Griffith L: Adhesion-guided in vitro morphogenesis in pure and mixed cell cultures. *Microsc Res Tech* 43: 379-384, 1998
- 6) Lauffenburger D and Horwitz A: Cell migration: A physically integrated process. *Cell* 84: 359-369, 1996
- 7) Abu-Absi S, Friend J, Hansen L, et al: Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res* 274: 56-67, 2002
- 8) Martz E, Phillips H, Steinberg M: Contact inhibition of overlapping and differential cell adhesion: a sufficient model for the control of certain cell culture morphologies. *J cell Sci* 16: 401-419, 1974