

LSEC-HUVEC 吻合血管網を実装した肝臓 MPS における血管灌流性 および肝機能の評価

○松本 倫実¹、^{まつもと ことみ}孫 一心¹、洲河 青¹、矢田 大地¹、Anna K. Kopec²、Julie Harney²、
Lindsay Tomlinson²、Nasir Khan²、藤本 和也¹、横川 隆司¹
1：京都大学、2：Pfizer, Inc.

[1. 背景] 薬物性肝障害は、薬剤代謝に起因する肝臓の炎症および機能障害であり [1]、新薬開発における安全性評価の重要な対象である。現在、非臨床試験における薬物性肝障害の評価には、主に動物実験が用いられているが、種差によりヒトでの薬物応答を十分に予測することは困難である。そのため、薬物性肝障害は、新薬候補化合物の臨床試験中止や既存薬の市場撤退を招く主要因の一つとなっている [2]。

近年、動物実験の代替法としてヒト由来細胞を用いた *in vitro* モデルが注目されている。しかし、ウェルプレートなどを用いた従来の培養法では、肝組織に特徴的な細胞外マトリクスや類洞血管構造を十分に再現できず、薬剤の拡散や濃度勾配を含む生理的な肝微小環境の模倣には限界がある。ヒト肝スフェロイドは比較的高い肝機能を維持できる一方、血管構造を欠くため、大型化に伴い内部の低酸素化や壊死が生じ、機能低下を引き起こすという課題がある [3]。

そこで、微小空間内でヒト由来細胞を培養し、臓器機能を再現する生体模倣システム (microphysiological systems, MPS) が注目されている。既存の肝臓 MPS では、肝細胞と血管内皮細胞を共培養し、肝血管内外の物質交換を再現する試みが行われてきたが、多くは半透膜を介した二次元培養系であり [4]、三次元肝組織内部への酸素・物質輸送を担う血管網の再現が不十分である。

そこで本研究では、ヒト肝スフェロイド内に三次元かつ灌流可能な血管網を実装した肝臓 MPS の構築を目的とした。肝細胞、肝類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cells, LSECs) および肺線維芽細胞 (lung fibroblasts, LFs) から共培養肝スフェロイドを作製し、ハイドロゲル中でマイクロ流路内に培養することで、スフェロイドと一体化した血管構造を形成した。さらに、血管構造、物質拡散、肝機能の評価した。

[2. 実験手法] 本実験では、3チャンネル型マイクロ流体デバイスを用いた。デバイスは、中央チャンネルとその両側に配置された2本のサイドチャンネルから構成され、チャンネル間はマイクロピラーにより仕切られている。中央チャンネル幅、サイドチャンネル幅、チャンネル高さはそれぞれ、1.5 mm, 1 mm, 100 μ m とした。デバイスは PDMS を用いてソフトリソグラフィにより作製した。

本研究では、HepaRG 肝がん細胞株、LSECs、LFs および type I collagen を含んだスフェロイドを、メチルセルロース含有培地を用いた急速凝集法で作製した[5]。各スフェロイドの細胞比は、HepaRG:LSECs:LFs = 1:2:2 とした。スフェロイド作製後、LFs を含むゲルとともにセンターチャンネルへ導入した。ゲルは、fibrinogen, aprotinin, type I collagen, thrombin の最終濃度が、それぞれ 5.0 mg/mL, 0.15 U/mL, 2.0 ng/mL および 0.5 U/mL となるよう調製した。ゲル内の LFs の最終濃度は 7.0×10^6 cells/mL とした。翌日、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) を 5.0×10^6 cells/mL 含む細胞懸濁液をサイドチャンネルに導入し、デバイスを傾斜させることでマイクロピラーおよびゲル表面に接着させた。この日を Day 0 とし、37°C, 5% CO₂ 下で約 2 週間培養した。培地には Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM2) を用いた。

培養は、静置培養条件および動的培養条件で行った。静置培養条件では、デバイスを 37°C, 5% CO₂ 下で静置した。動的培養条件では、デバイスを同条件下でロッキング式振とう培養器上に設置し、チャンネル内に重力駆動性の培地流を誘導した。

血管形態評価には、蛍光顕微鏡および 10 倍対物レンズを用いて Day 1, 3, 5, 7, 9 に取得した画像を用いた。取得画像に対してノイズ除去および二値化を行った後、血管占有面積、総血管長および血管分岐点数を算出した。血管占有面積および総血管長を血管量の指標、血管分岐点数を血管網の複雑性の指標とした。物質輸送評価では、共焦点顕微鏡を用いて Day 13 における蛍光標識マイクロビーズおよび蛍光標識アルブミンの挙動を観察した。マイクロビーズの血管網内への流入を灌流性の指標、アルブミン分布変化を拡散性の指標とした。また、スフェロイド内部の血管の局在を評価するため、スフェロイド凍結切片を作製し、血管内皮マーカーである CD31 に対する免疫染色を行った。

肝機能評価では、凍結切片を用いてアルブミンおよび MRP2 に対する免疫染色を行った。さらに、代表的な肝機能指標として、アルブミン産生量および尿素合成量を測定した。Day 4, 6, 8, 10, 12 に各デバイスから培養上清を回収し上清中のアルブミン量尿素量をそれぞれ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) , 蛍光比色法により定量した。

[3. 結果・考察] MPS 培養条件下において、メチルセルロース含有培地を用いた急速凝集法により作製したスフェロイドを導入した場合は、96 well プレート内で 5 日間自然凝集させたスフェロイドを導入した場合と比較して、Day 7 以降における血管占有面積、総血管長および血管分岐点数が有意に増加した。また、約 1 週間の培養により、スフェロイドから伸長した LSECs 由来血管と、サイドチャンネルから伸長した HUVECs 由来血管が吻合する様子が観察された。血管吻合後、片側のサイドチャンネルに導入したマイクロビーズが、血管網を介してスフェロイドに到達した後、反対側のサイドチャンネルへ流出したことから、本モデルにおいて灌流可能な血管網が形成されたことが示された。拡散評価の結果、アルブミンは血管網内への導入後約 20 分間、血管内に保持された。その後、血管外への漏出が経時的に認められ、導入後約 2 時間で血管内外の蛍光強度は概ね平衡に達した。凍結切片を用いた免疫染色

により、スフェロイド内部に CD31 陽性の管腔様構造が確認された。この結果から、スフェロイド内にも血管腔様構造が形成されていることが示された。以上より、本モデルでは、スフェロイド内外を接続する灌流可能な血管網が形成され、スフェロイド内部への物質輸送に寄与しうることが示唆された。

肝機能評価について、Day 8 における血管化スフェロイドのアルブミン産生量は、二次元培養された初代培養肝細胞の文献値と同程度であった [6]。MPS 培養条件間の比較では、HUVECs を播種しない非血管化静置培養条件と比較して、血管化静置培養条件において Day 6 および Day 12 のアルブミン産生量が有意に高値を示した。このことから、血管化がアルブミン産生能の維持または向上に寄与することが示された。さらに、血管化動的培養条件では、血管化静置培養条件と比較して、アルブミン産生量が約 2 倍に増加した。これは、ロッキングによる重力駆動性の培地流が、培地成分および酸素の輸送を促進し、アルブミン産生能の向上に寄与した可能性を示している。一方、尿素合成量はいずれの MPS 培養条件においても、二次元培養された培養された初代培養肝細胞の文献値の約 2-3 倍で推移した [6]。

[4. 結論] 本研究では、ヒト肝スフェロイド内に三次元かつ灌流可能な血管網を有する肝臓 MPS を構築し、MPS 培養において肝スフェロイド内外を接続する血管構造の形成に成功した。マイクロビーズの灌流およびアルブミンの拡散評価により、その血管網の灌流性と、血管から周囲組織への局所的な物質拡散が示された。さらに、血管化および動的培養によってアルブミン産生能が向上し、尿素合成能も高い状態で維持されることが明らかとなった。以上より、本モデルは、血管構造、物質輸送および肝機能を備えた肝臓 MPS として有用であることが示された。

[5. 謝辞] 本研究は、Drug Safety Research and Development, Pfizer, Inc., JSPS 科研費（課題番号：JP23K19214, JP24K21085），中谷財団「奨励研究助成」（課題番号: 2023S228），文部科学省「マテリアル先端リサーチインフラ」事業（課題号: JPMX1222KT1172），小柳財団「研究助成」（交付番号: 23050069），小野医学研究財団「第 33 回研究奨励助成」の支援を受けて実施された。本研究で使用したヒト細胞は、関係法規および倫理審査を経たプロトコルに基づき、適切に認可された販売元より入手した。

[参考文献]

- [1] D. E. Ingber, *Nat. Rev. Genet.*, 23(8), 467-491, 2022.
- [2] V. Tiwari, S. Shandilya, J. Albert *et al.*, *Toxicol. Rep.*, 14, 101976, 2025.
- [3] L. Wang C. Wang, Q. Li *et al.*, *J Biomed Opt.*, 30(3), 035003, 2025.
- [4] L. Ewart A. Apostolou, S. A. Briggs *et al.*, *Commun Med*, 2, 154, 2022
- [5] F. Tao, K. Kitamura, S. Hanada *et al.*, *Bioengineering*, 10(3), 349, 2023.
- [6] A. R. Baudy, M. A. Otieno, P. Hewitt *et al.*, *Lab Chip*, 20, 215-225, 2020.