

***In vitro* construction of liver sinusoid-like tissues by spatio-temporal control of hepatic stellate cells**

March 2012

A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Doctor of Philosophy in Science (Engineering)



Keio University

Graduate School of Science and Technology
School of Integrated Design Engineering

Junichi Kasuya

主 論 文 要 旨

報告番号	甲	第	号	氏 名	粕谷 淳一
主 論 文 題 目 :					
<i>In vitro</i> construction of liver sinusoid-like tissues by spatio-temporal control of hepatic stellate cells (肝星細胞の時空間的制御による肝類洞様組織の再構築)					
(内容の要旨)					
<p>将来的な肝臓病治療にむけて組織工学に基づいた機能的な肝臓組織の再生が試みられている。その最大の課題は、類洞の再構築である。類洞は肝細胞、星細胞、血管内皮細胞が形成する機能的な複合体であり、高次の肝機能を担保している。そのため、生体外で機能的な肝臓組織を再生するためには類洞の再構築が不可欠である。しかし、未だ類洞の再構築方法は確立されていない。一方、これまでに星細胞が生体内の類洞形成において重要な役割を果たすことが明らかになってきた。そこで本研究では、肝前駆細胞の一種である小型肝細胞と、星細胞および血管内皮細胞を用いて類洞構造を生体外で再構築し、再構築過程における星細胞の関与を明らかにすることを目的とした。</p> <p>第1章に、本研究の背景と目的を記載した。 第2章では、基礎事項および従来の研究を概説した。 第3章には、実験方法を記載した。 第4章では、類洞の再構築の第一段階として星細胞による仲介構造の再構築を試みた。類洞では、星細胞が肝細胞の層状構造と血管内皮細胞の血管構造の間を仲介している。この星細胞による仲介構造は、3者が生理学的な複合体として機能するために必須である。成熟ラットから分離した小型肝細胞と星細胞をポリエチレンテレフタレート多孔性薄膜上で培養すると、小型肝細胞は層状のコロニーを形成し、星細胞は微小孔内に分布した。その後、血管内皮細胞を薄膜の反対側に接着させることで、星細胞による仲介構造を再構築した。ここで、星細胞の挙動を微小孔の孔径によって空間的に制御することが、仲介構造の再構築に必須であることが分かった。さらに、仲介構造における星細胞は血管内皮細胞の形態形成において肝細胞と内皮細胞間のコミュニケーションを仲介した。すなわち、星細胞の挙動を空間的に制御し、星細胞による仲介構造を形成することで3者の生理学的な複合体を再構築できることが分かった。</p> <p>第5章では、血管内皮細胞による血管構造の構築を試みた。生体外での血管構造の形成には、星細胞と血管内皮細胞の接触が大きく影響することが知られているが、3者の共培養下におけるその役割は不明である。そのため、上記の共培養において星細胞と血管内皮細胞の接触が血管形態形成に与える影響を検討した。その結果、星細胞と血管内皮細胞の接触は血管形態形成を抑制することが分かった。そこで、まず血管形態形成を誘導し、その後星細胞との接触を形成させると、血管内皮細胞は毛細血管様ネットワークを形成できることが分かった。すなわち、3者の共培養において血管構造を形成させるためには、星細胞の挙動の空間的な制御に加え、時間的な制御が不可欠であることを明らかにした。</p> <p>第6章では、星細胞による裏打ち構造を再構築した。類洞では星細胞が細胞突起を伸ばして血管構造を裏打ちしている。この星細胞による裏打ち構造を再構築するためには、より活発な薄膜を介した異種細胞間相互作用が必要である。そこで、従来の多孔性薄膜より薄く、空隙率の高い生分解性ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体 (PLGA) 多孔性薄膜を作製し、この薄膜を用いることによって星細胞による裏打ち構造を形成することができるか検討した。その結果、適切な形状の薄膜を用いることによって、星細胞は毛細血管様ネットワークを裏打ちし、生体内の類洞に類似した組織を形成できることが明らかになった。さらに、この類洞様組織内の小型肝細胞は、肝細胞分化マーカーの mRNA を発現しており、肝細胞機能の指標となるアルブミン分泌量も高いレベルを維持していた。これらの結果は、PLGA 多孔性薄膜が異種細胞間相互作用を促進させ、機能的な肝類洞様組織の再構築に有効な細胞足場であることを示している。</p> <p>最後に、第7章では各章で得られた内容をまとめ、本研究の成果を要約した。さらに本研究の今後の展望を述べた。</p>					
以上					

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Integrated Design Engineering	Student Identification Number 80945835	SURNAME, First name KASUYA, Junichi
Title <i>In vitro</i> construction of liver sinusoid-like tissues by spatio-temporal control of hepatic stellate cells		
Abstract <p>Development of tissue-engineered liver is an ongoing study for the future therapy of liver diseases. Its major challenge is reconstruction of sinusoidal structures. The sinusoids are functional multicellular complex composed of hepatocytes, hepatic stellate cells (HSCs) and endothelial cells (ECs), and responsible for highly differentiated functions of the liver. Therefore, the reconstruction of the sinusoidal structures is essential to achieve the functional liver tissues <i>in vitro</i>. However, the reconstruction of the sinusoidal structures has not been achieved yet. The role of HSCs in the sinusoid formation <i>in vivo</i> has been increasingly recognized. Therefore, this dissertation focused on a reconstruction of liver sinusoids <i>in vitro</i> using small hepatocytes (SHs) <i>i.e.</i>, hepatic progenitor cells, HSCs and ECs and elucidating the HSC's role in the reconstruction process.</p> <p>Chapter 1 summarizes the background and purpose of this dissertation. Chapter 2 summarizes the previous studies. Chapter 3 summarizes the materials and methods. Chapter 4 describes a reconstruction of HSC-mediated sinusoidal structures <i>in vitro</i>. In the sinusoids, HSCs mediated between layers of hepatocytes and EC capillaries. These HSC-mediated sinusoidal structures are essential to form the functional complex of these cell types. SHs and HSCs were first isolated from adult rat livers and cultured on polyethylene terephthalate (PET) microporous membranes. The SHs formed single-layered colonies on the membranes while HSCs resided in the micropores. Thereafter, ECs were inoculated on the opposite side of the membranes, resulting in a formation of the HSC-mediated structures. To obtain these structures, spatial control of HSC behavior by changing the pore size was critical. Furthermore, HSCs were confirmed to mediate the SH-EC communication in terms of EC morphogenesis. These results indicate that the SH-HSC-EC physiological complex can be achieved in the reconstruction of the HSC-mediated structures.</p> <p>In chapter 5, an effect of direct contacts between HSCs and ECs on EC capillary formation was determined in the SH-HSC-EC tri-culture. The HSC-EC contacts are increasingly recognized for their roles in EC capillary morphogenesis. However, the hypothetical role of HSC-EC contacts in morphogenesis remains unclear in the tri-culture. HSC-EC contacts were shown to inhibit EC capillary morphogenesis, suggesting that the HSC-EC contacts may be an important factor in EC capillary formation. In addition, ECs responded to the induction of capillary morphogenesis before the formation of HSC-EC contacts, suggesting that both spatial and temporal, of HSC behavior is a key engineering strategy for the reconstruction of sinusoidal tissue <i>in vitro</i>.</p> <p>Chapter 6 describes the reconstruction of HSC-incorporated sinusoidal structures. In the sinusoids, HSCs surrounded the outer surface of EC capillary structures. To achieve these structures, heterotypic cell-cell interactions across the membranes need to be improved. To overcome this problem, poly (<i>D,L</i>-lactide-<i>co</i>-glycolide) (PLGA) microporous membranes were used. When pore size and porosity of the membranes were optimized, HSCs surrounded the EC capillary structures, resulting in the reorganization of sinusoidal-like structures. This model will provide a basis for the construction of functional, thick, vascularized liver tissues <i>in vitro</i>.</p> <p>Finally, Chapter 7 summarizes the results of this study and describes its future prospects.</p>		