

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 9 月 25 日(25.09.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/148647 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058152
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 18 日(18.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-056835 2013 年 3 月 19 日(19.03.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 Fukuoka (JP). 株式会社サイフューズ(CYFUSE BIOMEDICAL K.K.) [JP/JP]; 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 東京大学アントレプレナープラザ Tokyo (JP).
- (72) 発明者: ▲ 柳 ▼ 佑典(YANAGI, Yusuke); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 田村

忠士(TAMURA, Tadashi); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 東京大学アントレプレナープラザ 株式会社サイフューズ内 Tokyo (JP). 中山 功一(NAKAYAMA, Koichi); 〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 東京大学アントレプレナープラザ 株式会社サイフューズ内 Tokyo (JP). 田口 智章(TAGUCHI, Tomoaki); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

[続葉有]

(54) Title: LIVER TISSUE SPHEROID

(54) 発明の名称: 肝臓組織型スフェロイド

図 1



構造体デザイン
AA

剣山に固定
BB

スフェロイドの癒合
CC

剣山抜去
DD

AA Structure design
BB Anchored to pin holder
CC Spheroid fusion
DD Pin holder removed

(57) Abstract: A liver tissue spheroid formed from a mixture of liver cells and at least one type of cell selected from endothelial cells and stem cells, and a production method for a three-dimensional liver tissue structure which is characterized by combining or stacking the spheroid.

(57) 要約: 肝細胞と、血管内皮細胞及び幹細胞から選ばれる少なくとも 1 種の細胞との混合物から形成された肝臓組織型スフェロイド、及び前記スフェロイドを配合又は積層することを特徴とする肝臓組織型立体構造体の製造方法。



WO 2014/148647 A1



PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称

肝臓組織型スフェロイド

技術分野

本発明は、肝臓組織型スフェロイド及びその製造方法に関する。

背景技術

肝臓は様々な蛋白質の合成や有害物質の代謝を行い、生命維持に必須の臓器である。重篤な肝疾患に対しては、肝臓移植が現在最も効果的であるが、深刻なドナー不足や手術侵襲によるリスクといった問題がある。これに代わる新たな治療法として肝再生医療が期待されている。

近年、肝細胞移植が行われるようになり、疾患によって一定の効果がみられているものの、移植した肝細胞の生着率は低く、永続的効果は得られていない。肝細胞移植は、細胞が一つ一つバラバラである為、細胞接着による相互作用を失ってしまう点、あるいは、血流内へ細胞を直接注入することにより自然免疫や細胞性免疫を介する拒絶反応を受けやすい点などの問題を抱えている。さらに、肝細胞移植はドナー細胞数等に限りがある。

これらの観点から、肝外（異所性部位）へ肝細胞を生着させて小肝組織を形成する肝組織工学的アプローチが検討されている。このアプローチは、次世代の治療法としての期待が高い。

一方、生体内において、肝実質細胞は他の細胞および細胞外マトリックスと高度に組織化された状態で存在し、その機能の維持がなされている。異所性部位で肝細胞の良好な生着を得るためには、より生体肝に近い高度な立体的細胞組織の構築が必要である。すなわち肝細胞相互および他の細胞の接着を促進させることが必要とされる。また、細胞へ栄養供給を行う血管ネットワークを構築することが重要である。これに対し近年、細胞シートや scaffold を用いた組織工学的アプローチが試みられているが（非特許文献1）、その成果はまだ十分

でない。

これらの課題を克服し、機能効率がよく、十分な大きさの肝組織の構築が望まれている。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献 1 : Da Yoon No et al., PLOS ONE, Volume 7, December 2012, p1-8

発明の開示

発明が解決しようとする課題

本発明は、肝臓組織を細胞のみで構築するための方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、肝細胞、内皮細胞及び幹細胞の混合物を用いることにより、生体内での機能に近似した肝臓組織型スフェロイドを作製することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 肝細胞と血管内皮細胞と幹細胞との混合物から形成された肝臓組織型スフェロイド。

(2) 肝細胞と血管内皮細胞と幹細胞との混合比が、肝細胞 100 に対して血管内皮細胞が 30～100、好ましくは 40～60 であり、幹細胞が 20～70、好ましくは 30～50 である (1) に記載の肝臓組織型スフェロイド。

(3) 肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイドと、血管内皮細胞から形成されたスフェロイドとを融合してなる、肝臓組織型スフェロイド。

(4) 肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイドと、血管内皮細胞由来のスフェロイドとの存在比が、肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイド 100 に対して血管内皮細胞由来のスフェロイドが 5～10 である (3) に記載

の肝臓組織型スフェロイド。

(5) 血管内皮細胞から形成されたスフェロイドが内核に、肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイドが前記血管内皮細胞から形成されたスフェロイドの周囲に存在する、(3) 又は (4) に記載の肝臓組織型スフェロイド。

(6) 前記 (1) ~ (5) のいずれか 1 項に記載の肝臓組織型スフェロイドを配合又は積層することを特徴とする肝臓組織型立体構造体の製造方法。

(7) スフェロイドの積層は、基板と、該基板に略垂直に配置させた糸状体又は針状体とを備える支持体を用いて行なうものである (6) に記載の方法。

(8) 前記 (1) ~ (5) のいずれか 1 項に記載の肝臓組織型スフェロイド、又は (6) 若しくは (7) に記載の方法により製造された立体構造体からなる人工肝臓組織。

発明の効果

本発明により、肝臓組織型スフェロイド並びにその製造方法が提供される。また、前記スフェロイドを配合又は積層することにより肝臓組織型立体構造体を製造することができる。本発明の方法により製造された組織は、生体内における肝機能に類似した機能を有しており、人工肝臓組織として使用することができる。従って、本発明は、再生医療に利用できる点で極めて有用である。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の方法を用いて立体構造体を作製した結果を示す図である。

図 2 は、内皮細胞核に肝細胞小スフェロイドを播種して 2 層性のスフェロイドを作製する工程の概念図である。

図 3 は、内皮細胞核に肝細胞小スフェロイドを播種して 2 層性のスフェロイドを作製する工程の概念図である。

図 4 は、肝細胞小スフェロイドを用いて大スフェロイドを作製する工程の概念図である。

図 5 は、肝細胞のアンモニア代謝活性を示す図である。

図 6 は、共培養によるスフェロイド形成の比較を示す図である。

図7は、Hep+HUVECの2層性のスフェロイドで作製した構造体断面のH.E染色結果を示す図である。

図8は、2層性のスフェロイドを示す図である。

図9は、小スフェロイド作製用培養皿に細胞を播種した後のスフェロイド形成を示す図である。

図10は、立体構造体断面のH.E染色結果を示す図である。

図11は、スフェロイド1個当たりのアルブミン分泌量を比較した図である。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、肝細胞と、血管内皮細胞と、幹細胞との混合物から形成された肝臓組織型スフェロイドに関する。また、本発明は、肝細胞と、血管内皮細胞と幹細胞との混合物からスフェロイドを形成させ、このスフェロイドを配合又は積層することを特徴とする肝臓組織型立体構造体の製造方法である。

本発明の方法により製造された肝臓組織型スフェロイド又は立体構造体は、人工肝臓組織として利用することができる。

本発明者は、前記スフェロイド形成に着目し、より生体に近い機能を持たせるため目的とする臓器特有の細胞を組み合わせることにより、より立体的かつ高機能な組織を形成する技術を開発した。

本発明において、主体となる細胞は肝細胞である。この主体となる細胞を、本明細書では「主体細胞」という。主体細胞として肝細胞を用いて形成されたスフェロイド又は立体構造体を、本発明ではそれぞれ「肝臓組織型スフェロイド」、「肝臓組織型立体構造体」という。

本発明においては、上記主体細胞（肝細胞）と、血管内皮細胞と、幹細胞とを混合して肝臓組織型スフェロイドを作製する。このスフェロイドを任意の方法で配合又は積層することにより、スフェロイド同士が立体的に融合して、肝臓組織型立体構造体を得ることができる。

1. 肝臓組織型スフェロイドの形成（1）

本発明は、上記肝細胞と、血管内皮細胞と、幹細胞とを混合して細胞の混合物を作製し、この混合物を用いてスフェロイドを形成させるというものである。従って、1個のスフェロイドの中には、その構成細胞として、肝細胞、並びに血管内皮細胞及び幹細胞が含まれる。

スフェロイドを作製する細胞の混合比は以下の通りである。

肝細胞100に対し、血管内皮細胞は30～100、好ましくは40～60であり、幹細胞は20～70、好ましくは30～50である。

ここで、肝細胞は生体の肝臓組織に細胞単離酵素であるコラゲナーゼを血管内に還流することにより得ることができる。

血管内皮細胞の種類は特に限定されるものではなく、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)、頸動脈内皮細胞、肝類洞内皮細胞などが挙げられる。

また、幹細胞としては、特に限定されるものではなく任意の幹細胞を用いることができ、例えば間葉系幹細胞、造血系肝細胞、iPS などが挙げられ、間葉系幹細胞が好ましい。間葉系幹細胞を混合することにより、さらにスフェロイドの高機能化が期待できる。

また、本発明においては、血管内皮細胞及び幹細胞のほかに、これらの細胞とは異なる他の細胞を混合することもできる。他の細胞としては、例えば線維芽細胞、星細胞などが挙げられる。この場合の混合比率は、肝細胞100に対して20～80、好ましくは30～50とする。間葉系幹細胞を混合することにより、さらにスフェロイドの高機能化が期待できる。

このようにして得られた細胞混合物を、撥水处理又は細胞非接着処理を施したプレート、例えばテフロン（登録商標）加工されたプレート上で細胞を培養すると、細胞は足場を求めて、お互いに接着し合い、細胞凝集塊であるスフェロイドが形成される。スフェロイドが形成されるまでの培養時間は、6～48時間、好ましくは12～48時間である。

その他のスフェロイド形成方法としてIwaki社製の容器を使用することもでき、あるいは低接着性の10cm又は6cmディッシュを使用することもできる。

スフェロイドを形成させるための培養液は、動物細胞培養用に通常使用される標準培養液、例えばダルベッコ MEM 培地(DMEM/High glucose)、ダルベ

ッコ MEM/ハム F12 培地、RPMI-1640 培地などを使用し、これに血清を添加することができる。血管内皮細胞と混合してスフェロイドを形成するときは、ECM (endothelial cell medium: Sciencell) を使用するか、培地に血管内皮細胞増殖因子を添加することが好ましい。

2. 肝臓組織型スフェロイドの形成 (2)

本発明においては、上記のように1つのスフェロイド中に複数種類の細胞が混合されたものを使用することもできるが、1つのスフェロイドに単一種類の細胞のみが存在するようにして、複数種類の細胞の分だけ別のスフェロイドを形成することもできる。

この場合、肝細胞と幹細胞から形成されたスフェロイドと、血管内皮細胞から形成されたスフェロイドとを融合させることも可能である。「肝細胞と幹細胞から形成されたスフェロイド」には、肝細胞から作製したスフェロイドと、幹細胞から作製したスフェロイドとを予め融合させた態様のスフェロイド、及び肝細胞と幹細胞とを混合して作製した両細胞を含む態様のスフェロイドのいずれをも含む。

例えば、肝細胞のみから形成させたスフェロイド (肝細胞由来のスフェロイドともいう。他のスフェロイドも同様に表現する。) のほかに、血管内皮細胞由来のスフェロイド及び幹細胞由来のスフェロイドを作製して、これらの各スフェロイド同士を融合させればよい。

スフェロイドの形成方法 (容器や培養条件など) は前記と同様である。

この場合のスフェロイドの存在比率は、前記「肝臓組織型スフェロイドの形成 (1)」の項で記載した細胞の比率を適用することができ、肝細胞由来のスフェロイド100に対し、血管内皮細胞由来のスフェロイドは30～100、好ましくは40～60であり、幹細胞由来のスフェロイドは20～70、好ましくは30～50である。

本発明においては、肝臓組織の機能を高めるために、肝細胞由来スフェロイドと血管内皮細胞由来スフェロイドと幹細胞由来スフェロイドとの配合順序や配合位置を調整することができる。

例えば、先ず血管内皮細胞由来の小スフェロイドを作製し、このスフェロイドを内核として、(a)その周囲に肝細胞由来スフェロイド及び幹細胞由来スフェロイドをそれぞれ播種するか、あるいは(b)肝細胞と幹細胞との混合物から形成されたスフェロイドを播種する層状のスフェロイドとする。これにより、より肝機能が向上した肝臓組織型スフェロイドを得ることができる。各スフェロイドの存在比は、(a)の態様の場合は、前記個別にスフェロイドを作製して融合させるときと同様であり、(b)の態様の場合は、肝細胞と幹細胞との混合物から形成されたスフェロイド100に対して血管内皮細胞由来のスフェロイドが5～10である。

肝臓組織型スフェロイドが所定の機能を有しているかどうかは、任意の手法により評価することができる。例えば、アルブミンの分泌、アンモニア代謝、尿素の産生、薬物の代謝などを指標として肝機能を評価すればよい。

3. 肝臓組織型又は血管組織型立体構造体の構築

本発明においては、前記のように形成させたスフェロイドを配合又は積層することにより、肝臓組織型立体構造体を作製することができる。

スフェロイドを立体的に配合又は積層する方法は、特に限定されるものではない。例えば、チューブなどにスフェロイドを入れて培養すると、スフェロイド同士が融合してさらに大きなスフェロイドの塊となる。

また、例えば WO2008/123614 号公報に記載の方法を採用して立体構造体を作製することもできる。WO2008/123614 号公報には、基板と、細胞塊（スフェロイド）を貫通させるための糸状体又は針状体（以下、単に「針状体」という）とを備える支持体が記載されており、この支持体を用いると、スフェロイドを任意の空間に配置することができる。上記支持体において、針状体は、基板に略垂直に備えられており、スフェロイドを串刺し状にして積層することができる。各針状体（基板上の各座標の針状体）に突き刺すスフェロイドの個数を制御することで、スフェロイドを任意の3次元空間に配置させる。スフェロイド同士が融合／結合して構造体が形成された後に、支持体を抜去することによって、スフェロイドのみからなり、しかも、全体として任意形状の立体的細

胞構築物を得ることができる。スフェロイドは、近接した状態で放置すると融合することが知られているが、上記支持体を用いることによって、スフェロイドの融合により形成される構築物の形状を制御し、任意の3次元空間にスフェロイドを所望のとおり配置することができる。

任意の3次元空間にスフェロイドを配置させた後は、所定時間培養することにより、目的の組織を得ることができる。

単一種類の細胞により形成させたスフェロイドを複数種類配合又は積層する場合において、それぞれの単一種類の細胞由来のスフェロイドの存在比は、複数種類の細胞の混合によりスフェロイドを形成させるときの細胞の混合比率に準じることができる。あるいは、肝細胞:血管内皮細胞:肝細胞=2:1:1という比率にしてもよい。

このようにして構築された肝臓組織型立体構造体は、アルブミン分泌、尿素の産生などが行なわれることから、得られた立体構造体は実際の肝臓の機能を再現したと言える。

従って、本発明の肝臓組織型スフェロイド又は立体構造体は、人工肝臓組織として利用することができる。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

肝臓組織型スフェロイドの作製

(1) 肝細胞の調製

Wistar ラットより two-step collagenase 還流法を用いて成熟肝細胞を単離した。

50g で 2 分の遠心を数回行い、生存率 80%以上の肝細胞を使用した。なお、生存率を上げるために Percol を用いて遠心を行うこともできる。

肝細胞用培地組成は以下の通りである。

DMEM with low glucose supplemented with 5 μ g/L EGF, 10mg/L insulin, 60mg/L Plorine, 3.7g/L NaHCO_3 , 5.985g/L HEPES,

10% FBS and antibiotics (58.5mg/L penicilline, 10mg/L streptomycin)

(2) 血管内皮細胞の調製

ヒト正常臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を Lonza 社より購入した。

HUVEC 用培地 : Lonza EBM-2

(3) 幹細胞の調製

幹細胞として脂肪由来幹細胞 (MSC) をラットより単離した。あるいは、Lonza 社製 ADSC を使用した。

(4) スフェロイドの作製

スミロン 96well U 底 プレート(Prime surface)に上記(1)~(3)で作製した細胞を播種した。直径約 500 μ m の球形のスフェロイドが形成されるまで、37℃、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。培地交換は 24 時間毎に行なった。

小スフェロイド作製は、EZ-Sphere 100mm dish, 14000well/dish (IWAKI) に細胞を播種した。直径約 50 μ m の小スフェロイドが形成されるまで、37℃、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。

(5) 立体構造体の作製

本発明者は、Scaffold free スフェロイド積層技術を自動化し、これを用いて立体的肝構造体の作製を行った (バイオリピッドプロトタイピングシステム: BRP system)。BRP system はロボットシステムにより直径 500 μ m 程度の細胞凝集塊であるスフェロイドを、3D デザインデータを元に自動的に剣山に固定し、スフェロイド癒合後に剣山を抜去することで、細胞のみで (scaffold free) 様々な形・大きさの立体組織を作成するシステムである (WO2008/123614 号公報)。

前記のとおり作製したスフェロイドを、BRP system を用いて、直径 5mm、高さ 10mm の管状に剣山に固定した。1 層辺り 48 個のスフェロイドで円形にし、これを 15 層に積層した (図 1)。合計スフェロイド数 720 個。

スフェロイド同士の癒合が得られるまで、バイオリアクターを用いて管状構造体を 2 日間培養した。スフェロイド同士の癒合物が得られたところで剣山を抜去し、管状の立体的肝細胞構造体を得た。さらにこれを、バイオリアクターを用いて還流培養を継続した。

(6) 立体構造体の機能測定

アンモニア測定:培養上澄みのアンモニア濃度をアンモニア-テストワコーを用いて、吸光度より測定した。

アルブミン濃度の測定:培養上澄みのアルブミン濃度を Rat Albumin ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, INC)を用いて ELISA 法にて測定した。

(7) 共培養によるスフェロイド形成の比較

播種細胞種と細胞数

Group1: 肝細胞 1×10^4 /well

Group2: 肝細胞 1×10^4 /well+HUVEC 1×10^4 /well

Group3: 肝細胞 1×10^4 /well+HUVEC 1×10^4 /well+MSC 1×10^4 /well

共培養による小スフェロイド形成の比較

肝細胞のみ: 肝細胞 7×10^6 /dish=500/sphere

肝細胞 + HUVEC+MSC: 肝細胞 7×10^6 /dish:HUVEC 1.4×10^6 /dish:MSC 2.8×10^6 /dish =500/sphere:100/sphere:200/sphere

(8) スフェロイドの作製方法による構造体中の肝細胞の生存率およびアルブミンの分泌機能の比較

I 群

HUVEC 3000 個/well を 96 well spheroid plate に播種し、先に直径 400 μ m のスフェロイドを作製した。次に、小スフェロイド形成用培養皿で直径約 50 μ m の肝細胞小スフェロイド(細胞数 Hep : HUVEC : MSC=500:100:200/spheroid)を作製した。

HUVEC のスフェロイドを核として、その周囲に肝細胞小スフェロイド約 20 個を播種し、中心部に HUVEC スフェロイド、外層に肝細胞小スフェロイドが配置される 2 層性スフェロイドとした (最終細胞数 Hep : HUVEC : MSC=10000:5000:40000/spheroid) (図 2)。

II 群

HUVEC 3000 個/well を 96 well spheroid plate に播種し、先に直径 400 μ m

のスフェロイドを作製した。次に HUVEC のスフェロイドを核として、その周囲に肝細胞 10000 個、HUVEC 2000 個、MSC 4000 個を播種した。これにより、中心部に HUVEC スフェロイド、外層に肝細胞が配置される 2 層性のスフェロイドとした（最終細胞数 肝細胞（Hep ともいう）：HUVEC：MSC=10000:5000:4000/spheroid）（図 3）。

III 群

小スフェロイド形成用培養皿で直径約 50 μ m の肝細胞小スフェロイド(細胞数 Hep：HUVEC：MSC=500:250:200/spheroid)を作製した。肝細胞小スフェロイドを 96 well spheroid plate に約 20 個/well で播種し、大きなスフェロイドを作製した（最終細胞数 Hep：HUVEC：MSC=10000:5000:40000/spheroid）（図 4）。

(9) 結果

まず、肝細胞のみでスフェロイド作製を試みたところ、スフェロイド形成には 5 日間を要した。さらに、培養 3 日目にはアンモニアの代謝活性が低下してしまうことが分かった（図 5）。

そこで、スフェロイド形成の促進を図るために、他の非実質細胞との共培養を行いスフェロイド形成の速さを比較した（図 6）。

Group1:肝細胞のみではスフェロイド形成に 5 日要した。

Group 2:肝細胞+HUVEC の 2 種類の細胞ではスフェロイド形成に 3 日要した。

Group 3:肝細胞+HUVEC+MSC の 3 種類の細胞では 1 日目より癒合が進み、2～3 日でスフェロイド形成した。

実施例 2

立体構造体の作製

先ず、HUVEC で直径 400 μ m のスフェロイドを作製した。次に HUVEC のスフェロイドを核として、その周囲に肝細胞と MSC を播種し、外層に肝細胞が配置される 2 層性のスフェロイドとした。スフェロイド形成には 3～4 日を

要した。

この方法で作製したスフェロイドを用いて、立体構造体を作製した（図7）。図7は、その H.E.染色図である。このときの肝細胞の生存率は約 30%であった。

上記立体構造体においては、肝細胞の接着に時間を要することから、さらに肝細胞同士の接着を促進するため、まず小スフェロイド作成用培養皿 (EZ-sphere) で肝細胞の小スフェロイドを作製し、この小スフェロイドを HUVEC スフェロイドに癒合させて 2 層性のスフェロイドを作製した (図8)。

また、小スフェロイド作製用培養皿でのスフェロイド形成の速さを肝細胞のみと他の非実質細胞との共培養で比較した（図9）。

その結果、肝細胞のみでは小スフェロイド形成に 2 日を要した。

肝細胞+HUVEC+MSC を播種した場合小スフェロイドは 1 日で形成された。

図9において、上パネルは肝細胞を小スフェロイド作製用培養皿に播種後 1 日目のスフェロイドであり、下パネルは肝細胞+HUVEC+MSC を小スフェロイド作製用培養皿に播種後 1 日目のスフェロイドである。

次に、以下の I 群～III 群に分けて立体構造体中の肝細胞の生存率およびアルブミンの分泌機能の比較を行った。

I 群

HUVEC で先に直径 400 μ m のスフェロイドを作製した。小スフェロイド形成用培養皿を用いて、直径約 50 μ m の肝細胞小スフェロイドを Hep+HUVEC+MSC で作製した。HUVEC のスフェロイドを核として、その周囲に肝細胞小スフェロイドを播種し、外層に肝細胞小スフェロイドが配置される 2 層性のスフェロイドとした。(Hep spheroids on EC spheroid)

II 群

HUVEC で先に直径 400 μ m のスフェロイドを作製した。HUVEC のスフェロイドを核として、その周囲に肝細胞,HUVEC,MSC を播種し、外層に肝細胞が配置される 2 層性のスフェロイドとした。(Hep on EC spheroid)

III 群

小スフェロイド形成用培養皿で直径約 50 μ m の肝細胞小スフェロイドを

Hep+HUVEC+MSC で作製。肝細胞小スフェロイドをさらにスフェロイドプレート上で癒合させ直径 500 μ m のスフェロイドとした。(Hep spheroids)

構造体中の肝細胞の生存率は I 群 80%、II 群 20%、III 群 60%であった (図 10)。

図 10 において各パネルは以下の通りである。

上パネル：I 群 (Hep spheroids on EC spheroid)構造体断面の H.E 染色：肝細胞生存率 80%

中パネル：II 群 (Hep on EC spheroid)構造体断面の H.E 染色：肝細胞生存率 20%

下パネル：III 群 (Hep spheroids)構造体断面の H.E 染色：肝細胞生存率 60%

また、構造体培養液上澄み中のアルブミン量を測定し、スフェロイド 1 つ辺りのアルブミン分泌量に換算し、比較したところ、I 群が最も高く積層培養 8 日目までアルブミン分泌機能は維持されていた (図 11)。これは、スフェロイド単独で培養を継続した場合と同等に維持されていた。

また、I 群の構造体を積層培養 8 日目に H.E 染色、HUVEC の蛍光染色および抗アルブミン抗体で免疫染色した。HE 染色では、肝細胞相互に接着し、生体肝組織に類似した索状構造が構築されていた。HUVEC の蛍光染色の結果、HUVEC は自動的にソーティングが起こり、スフェロイドの中央にあった HUVEC が構造体表面および肝細胞間に配置されていた。さらにアルブミンの免疫染色では、肝細胞が染色され、肝細胞の生存とアルブミンの分泌が確認できた。

以上の結果から、I 群の作製方法に示される通り、本発明の方法は、スフェロイドおよび構造体を作製するために最適な方法であると言える。

請 求 の 範 囲

1. 肝細胞と血管内皮細胞と幹細胞との混合物から形成された肝臓組織型スフェロイド。
2. 肝細胞と血管内皮細胞と幹細胞との混合比が、肝細胞100に対して血管内皮細胞が40～60、幹細胞が30～50である請求項1に記載の肝臓組織型スフェロイド。
3. 肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイドと、血管内皮細胞から形成されたスフェロイドとを融合してなる、肝臓組織型スフェロイド。
4. 肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイドと、血管内皮細胞由来のスフェロイドとの存在比が、肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイド100に対して血管内皮細胞由来のスフェロイドが5～10である請求項3に記載の肝臓組織型スフェロイド。
5. 血管内皮細胞から形成されたスフェロイドが内核に、肝細胞及び幹細胞から形成されたスフェロイドが前記血管内皮細胞から形成されたスフェロイドの周囲に存在する、請求項3又は4に記載の肝臓組織型スフェロイド。
6. 請求項1～5のいずれか1項に記載の肝臓組織型スフェロイドを配合又は積層することを特徴とする肝臓組織型立体構造体の製造方法。
7. スフェロイドの積層は、基板と、該基板に略垂直に配置させた糸状体又は針状体とを備える支持体を用いて行なうものである請求項6に記載の方法。
8. 請求項1～5のいずれか1項に記載の肝臓組織型スフェロイド、又は請求項6若しくは7に記載の方法により製造された立体構造体からなる人工肝臓組

織。

図 1

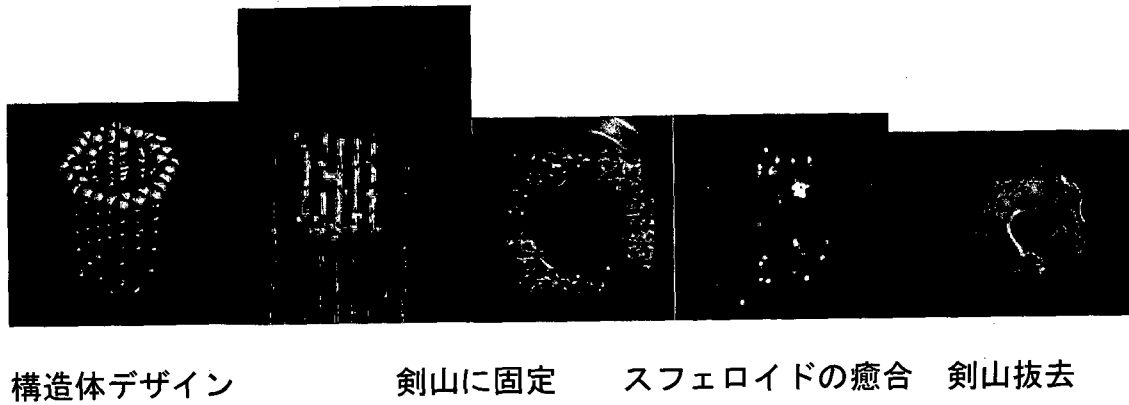


図 2

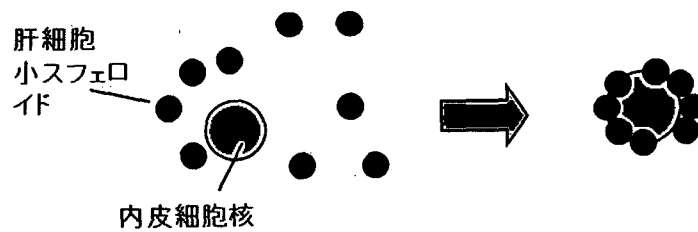


図 3

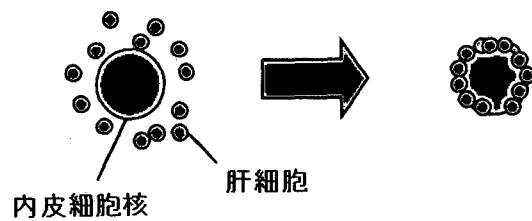


図 4

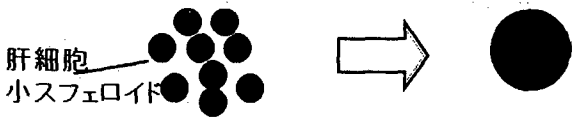


図 5

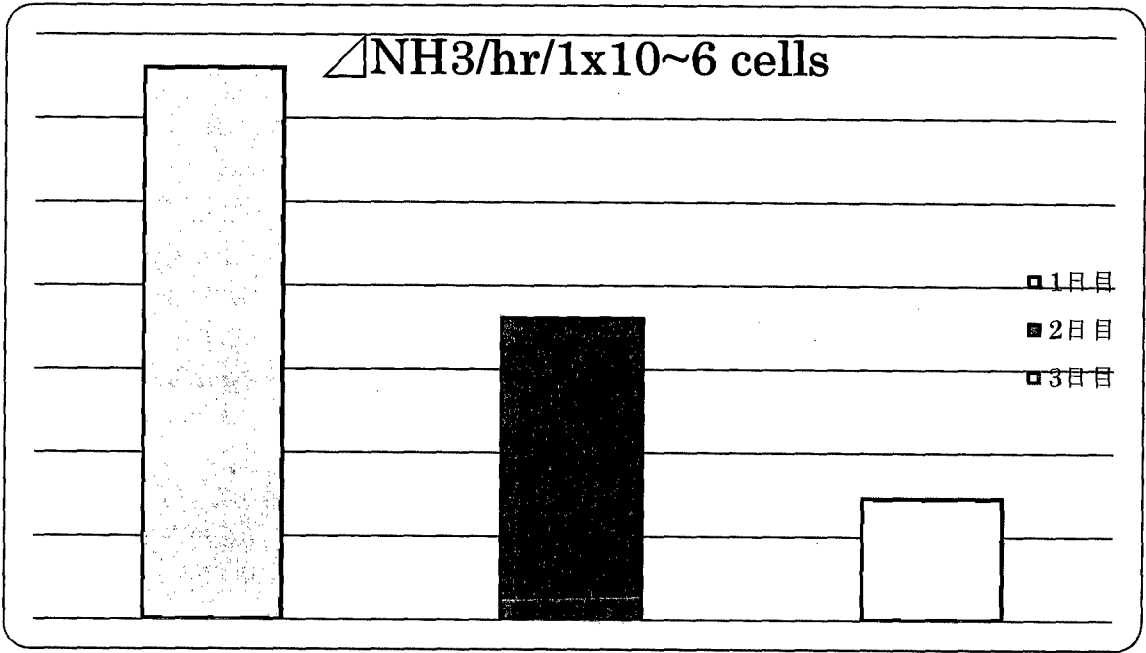


図 6

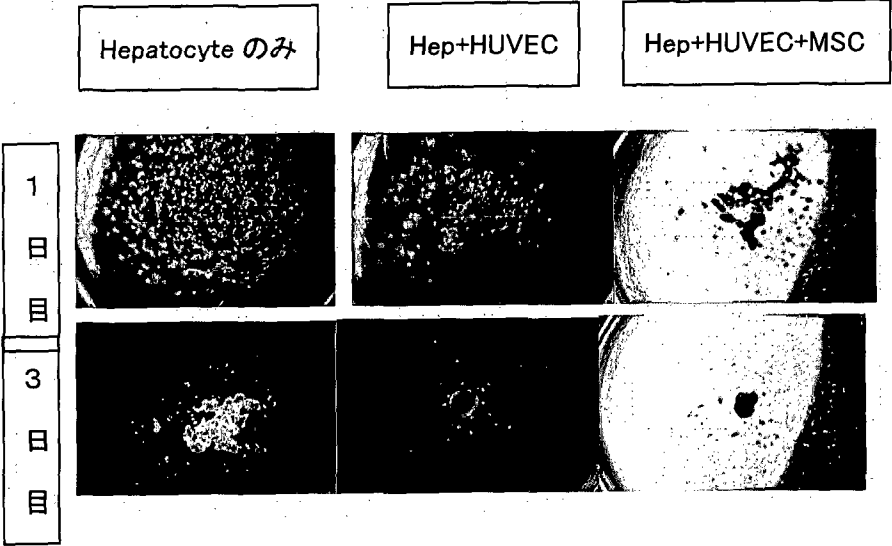


図 7

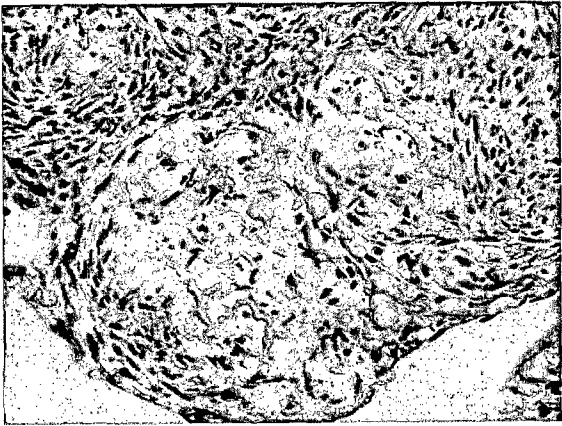


図 8

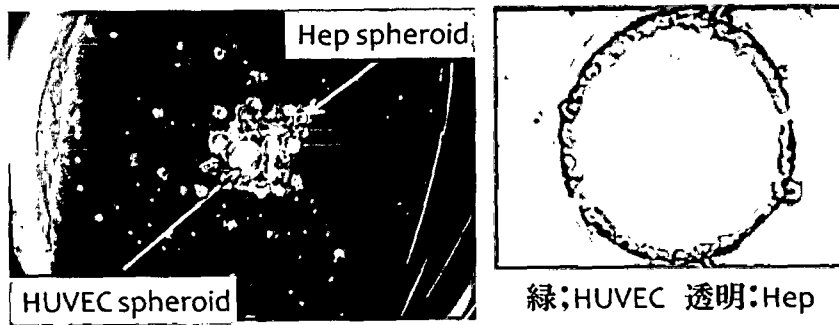


図 9

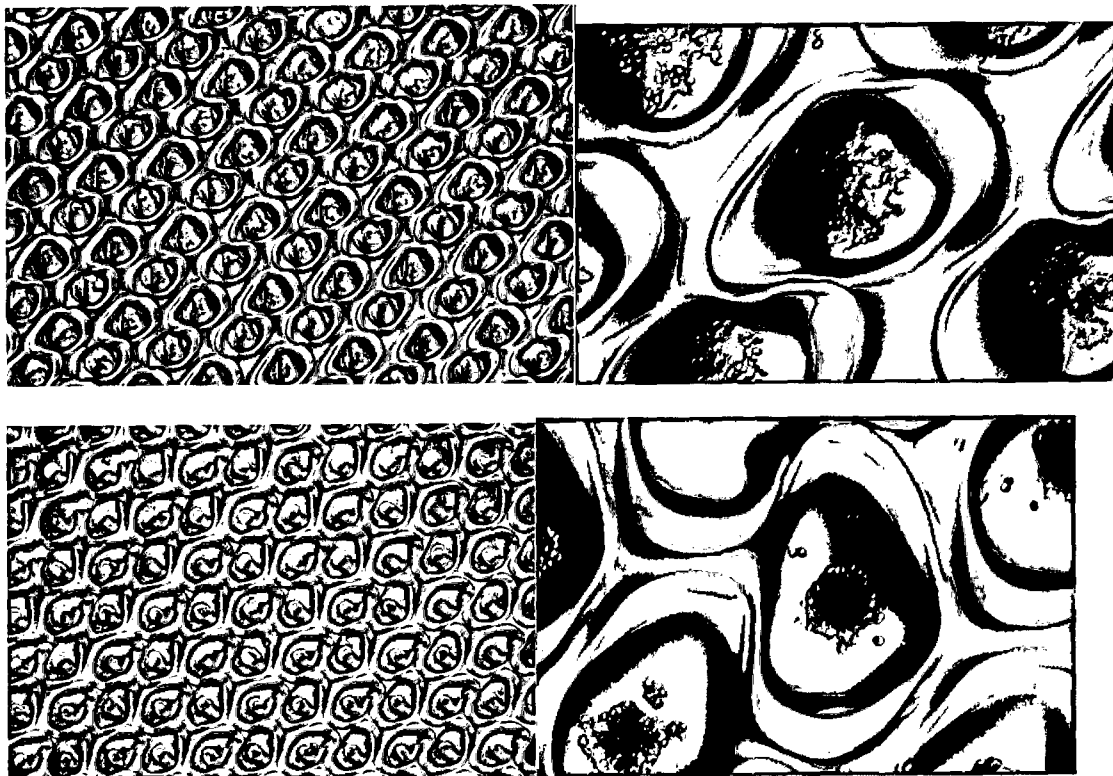


図 10

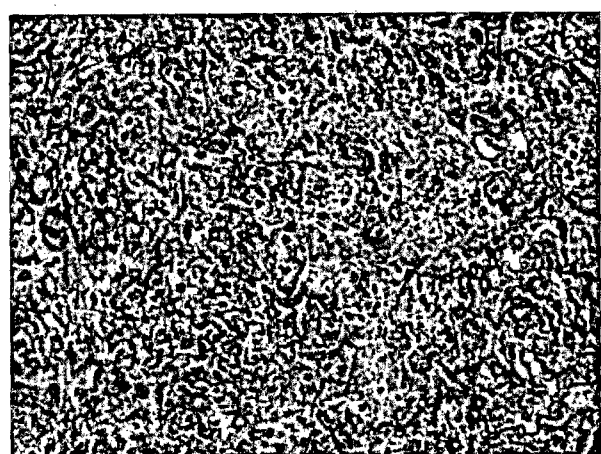
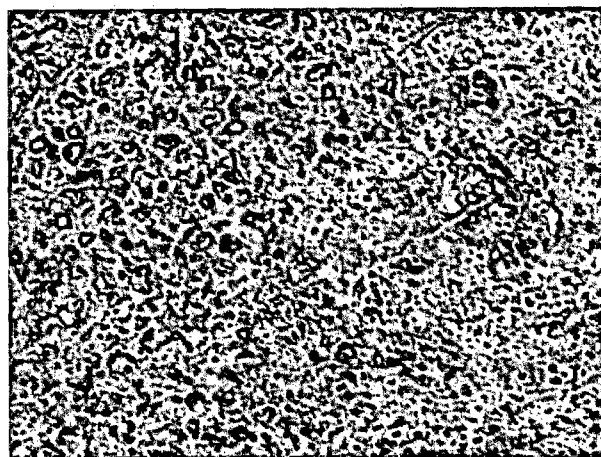
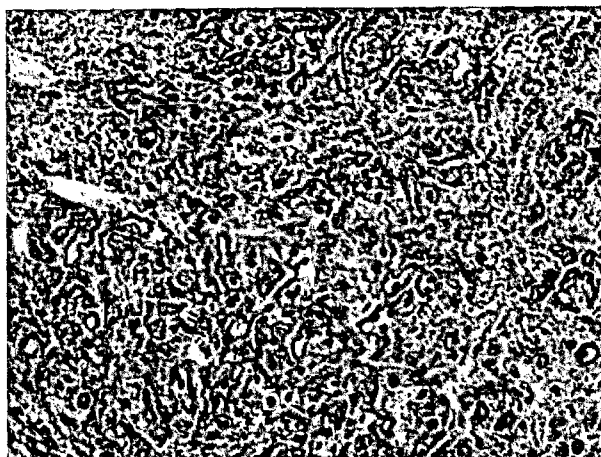
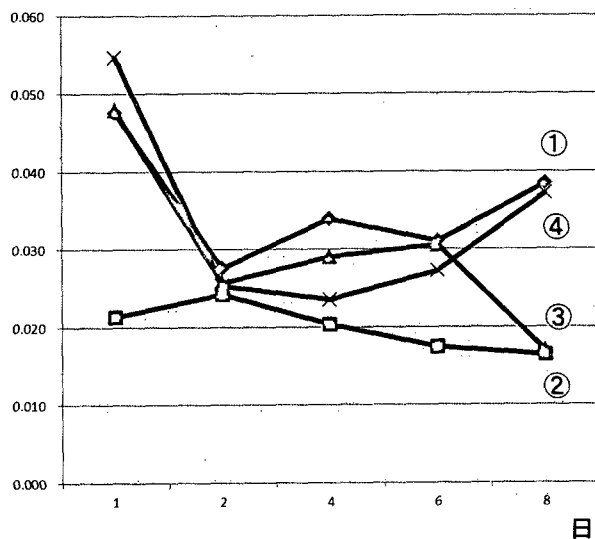


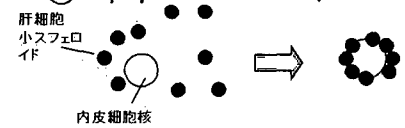
図 11

スフェロイドーつ当たりのアルブミン分泌量の比較

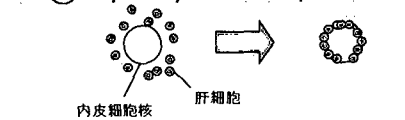
 $\mu\text{g/ml}$ 

構造体中のスフェロイド

① Hep spheroids on EC spheroid



② Hepatocytes on EC spheroid



③ Hep spheroids



プレート上で培養した単独スフェロイド

④ Spheroid on plate



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Yusuke YANAGI et al., "Bio Rapid Prototyping System (BRP system) o Mochiita (scaffold free) Kanzo Kozotai no Kochiku", Regenerative Medicine, 01 June 2012 (01.06.2012), 11(suppl.), page 247, entire text	1, 6, 8 1, 2, 6-8 3-5
Y A	Yusuke YANAGI et al., "Bio Rapid Prototyping System (BRP system) o Mochiita Kinoteki Sanjigen Kan Kozotai no Kochiku", Regenerative Medicine, 28 February 2013 (28.02.2013), 12(suppl.), page 153, entire text	1, 2, 6-8 3-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 May, 2014 (19.05.14)

Date of mailing of the international search report
27 May, 2014 (27.05.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058152

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	CHOU, M.-J., et al., Application of open porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres and the strategy of hydrophobic seeding in hepatic tissue cultivation, J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2013.03.18, 101A, pp.2862-2869, entire text, particularly, abstract	1, 2, 6-8 3-5
Y A	WO 2008/123614 A1 (Kyushu University), 16 October 2008 (16.10.2008), entire text & JP 4517125 B & US 2011/0200559 A1 & EP 2130910 A1 & CN 101679947 A & KR 10-2010-0014544 A & TW 200848512 A	6-8 3-5
A	KR 10-2012-0125196 A (Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation), 14 November 2012 (14.11.2012), (Family: none)	3-5

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N5/071

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	柳佑典ら, バイオラピッドプロトタイピングシステム (BRP system) を用いた (scaffold free) 肝臓構造体の構築, 再生医療, 2012.06.01, 11(suppl.), p.247, 全文	1, 6, 8 1, 2, 6-8 3-5
Y A	柳佑典ら, バイオラピッドプロトタイピングシステム (BRP system) を用いた機能的三次元肝臓構造体の構築, 再生医療, 2013.02.28, 12(suppl.), p.153, 全文	1, 2, 6-8 3-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.05.2014

国際調査報告の発送日

27.05.2014

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

荒木 英 則

4 B

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CHOU, M.-J., et al., Application of open porous poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres and the strategy of hydrophobic seeding in hepatic tissue cultivation, J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2013.03.18, 101A, pp.2862-2869, 全文, 特に要旨	1, 2, 6-8
A		3 - 5
Y	WO 2008/123614 A1 (国立大学法人九州大学) 2008.10.16, 全文	6 - 8
A	& JP 4517125 B & US 2011/0200559 A1 & EP 2130910 A1 & CN 101679947 A & KR 10-2010-0014544 A & TW 200848512 A	3 - 5
A	KR 10-2012-0125196 A (Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation) 2012.11.14 (ファミリーなし)	3 - 5