

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2023

課題番号：18KK0415

研究課題名（和文）細胞シート組織へのmRNA送達のための細胞外マトリックス設計

研究課題名（英文）Design of extracellular matrices for mRNA delivery to cell sheet tissues

研究代表者

小林 純（Kobayashi, Jun）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20385404

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、高効率なメッセンジャーRNA（mRNA）送達を達成するための細胞外マトリックスを利用した培養基材の開発を目的とした。生分解性ナノファイバーからなるヘパリン固定化薄膜スキャフォールドに結合させるため、ヘパリン結合性ペプチドとフィブロネクチンを融合したタンパク質を設計し、遺伝子組み換え体として作製・精製できることを明らかにした。また、mRNA送達で血管新生因子を分泌する肝細胞シート組織を作製してラット皮下に移植したところ、4週間にわたり非遺伝子導入群と比べてより効果的に生着することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で開発したヘパリン結合性フィブロネクチンとmRNA/カチオンコンプレックスをナノファイバーからなるヘパリン固定化薄膜スキャフォールドに結合させ、効率的なmRNA送達による血管新生因子分泌を誘導することにより、移植した肝細胞シート組織を効率的に生着されることが期待される。これまでに不可能であった肝組織の効率的な移植方法につながり、組織再生治療分野における大きなブレークスルーとなる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a culture substrate using extracellular matrix for achieving the highly efficient delivery of messenger RNA (mRNA). We designed a fusion protein that contained heparin-binding peptide and fibronectin for tethering with heparin-immobilized nanofiber scaffolds and demonstrated that it could be produced and purified as a genetically modified organism. In addition, hepatocyte sheet tissue that secretes angiogenic factors was produced by mRNA delivery and transplanted in the subcutaneous space of rats. For four weeks, the engraftment of mRNA-transfected hepatocyte sheets was better than that of non-transfected hepatocyte sheets.

研究分野：組織工学

キーワード：細胞シート 血管新生 フィブロネクチン mRNA送達

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

ケガや病気で損なわれた組織・臓器を治療する再生治療は、組織工学をはじめとする三次元(3D)組織化技術の発展、人工多能性幹細胞(iPS細胞)の発見による個別化医療の実現により大きく進んだ。我々の研究所では、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を表面修飾した温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製・回収し、これを積層化することによって細胞のみからなる厚い組織を構築する、新しい3D組織化技術の開発に取り組んできた。これまでに、欧州での角膜上皮再生の治験、本邦での筋芽細胞シートによる心疾患治療の製造販売承認、食道再生でも臨床応用に成功、歯根膜と軟骨、中耳疾患に関しては臨床研究を実施した。

現在、次世代の組織工学的再生治療として、肝臓、心臓など、細胞成分に富み、複雑な構造の組織・臓器の治療に注目が集まっている。特に、肝細胞シート組織は、肝臓以外の異所的部位(皮下)に生着できれば、血友病や $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症(K. Ohashi, et al., Nat. Med., 2007)など先天的性疾患に対しての凝固因子や酵素の補充療法の効果がある。ただし、移植の前に、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放デバイスで皮下移植し、毛細血管を誘導させる必要がある。よって、速やかにホスト血管との接続が起こる仕組みが重要である。また、より多くの肝細胞を移植するためには、単層のみならず3D構造の組織構築が必要である。しかし、拡散のみでの酸素と栄養分供給は100~200 μm 程度が限界で(M. Lovett, et al., Tissue Eng B., 2009)、3D細胞組織内部に毛細血管等を有する構築技術の開発が必要である。

脈管形成および血管新生を誘導するための手法として、メッセンジャーRNA(mRNA)による血管新生因子の送達および3D細胞組織内部における発現が考えられる。これまでの*in vitro*でのmRNA送達は、カチオン性脂質やカチオン性ポリマーなどの非ウイルス性ベクター、あるいはエレクトロポレーションを用いる手法にほぼ限定されており(Sahin et al., Nat. Rev. Drug Discov., 2014)、効果的に血管新生を誘導するためには、高効率なmRNA送達手法が望ましい。

一方、細胞底面の基材表面から遺伝子導入を行う手法として、Sabatiniらが2001年にNature誌に報告し、さらに三宅らがフィブロネクチンを併用すると導入効率を高めるリバーストランスフェクション法を報告した(Yoshikawa et al., J. Control. Rel., 2004)。低毒性でプラスミドDNA導入効率の向上が発揮される点が特徴である。田畑らは三次元細胞足場表面からの遺伝子導入を報告した(Nagene et al., Tissue Eng., 2009)。遺伝子導入のメカニズムは完全に解明されていないが、細胞との接触機会の増加、血清タンパク質との接触の抑制、インテグリン受容体を介したストレスファイバー誘引による細胞付着・エンドサイトーシスの促進、などの理由が考えられている。以上の報告は、プラスミドDNAやsiRNA送達に関するものであり、mRNA送達に利用された例はない。また、核酸単独あるいはカチオン脂質やカチオン性ポリマーとの複合体を基材表面に塗布するのみである。

2. 研究の目的

高度な代謝機能を持つ肝臓や心筋組織を細胞から作るためには、血管等の脈管構造をはじめとする細胞組織の3D微細構造の制御が必須である。我々の研究所は細胞シートを積み重ねることで3D層状構造の具現化に成功しており、これを基盤テクノロジーとして、メッセンジャーRNA(mRNA)送達により3D組織内部に血管新生因子を発現させ、生体に移植可能な脈管構造をもつ3D肝臓および心筋組織を作製することを目指す。しかし、非分裂性の初代肝細胞からなる肝細胞シート組織へのmRNA送達は、分裂性の細胞シート組織に比べて遺伝子導入効率が低い。そこで本国際共同研究は、細胞シート組織周囲の細胞外マトリックス設計の観点から高効率なmRNA送達手法を達成し、積層化細胞シート組織内部での血管形成誘導手法開発を促進することを目的とする。その実現のために、mRNA送達を行うための細胞外マトリックスを用いた培養基材の開発を目的とした。

細胞シート底面の細胞外マトリックスからmRNAリバーストランスフェクションを行うため、最適な細胞外環境を設計する。まず、平坦な基材と比較して、微細凹凸(Adler et al., Biomaterials, 2011)あるいはナノファイバー等の表面形状で核酸の取り込みとその発現効率が1.5倍程度に向上することを利用し(Sakai et al., J. Biomed. Mater. Res. A, 2009)、エレクトロスピニング法を用いた2Dナノファイバー上での肝細胞培養を行う。

さらに、フィブロネクチンがカベオラ経路で細胞内に取り込まれ、近傍の核酸/カチオン性脂質複合体が細胞内に取り込まれることに注目し(Rea et al., Biomacromolecules, 2009)、低分子フィブロネクチンフラグメントにヘパリン結合ドメインをもつ融合タンパク質を設計、作製する。さらに、ナノファイバー基材表面をヘパリンあるいはスルホン酸基を有する合成高分子で修飾し、静電的相互作用で融合タンパク質とmRNA/カチオン性脂質複合体を近接して固定化し、培養肝細胞に対して効率的なmRNA送達を目指す。

3. 研究の方法

(1) 再現性の良い肝細胞シート培養法の検討

電子線照射によるPIPAAmの重合および表面グラフトにより、ポリスチレン製培養皿表面にPIPAAmを固定した。PIPAAm固定化量は $2.22 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。シリコーンリング(内径18mm)を取り付けたPIPAAm培養皿表面に $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ フィブロネクチン(FN)をコーティングし、ラット初代肝細胞を $6 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ の密度で播種し、37°Cで72時間培養した。この際、培地深さは1.3, 2.6mmとし、培地交換のタイミングは細胞播種後3, 15, 39, 63hとした。72時間培養したのち、20°Cで30分間インキュベーションし、セルスクレーパーによるスクラッチにより肝細胞シートを剥離した。また、ゼラチン溶液を浸漬した膜を肝細胞シート上に載せて

20°Cで30分間培養したのち、ピンセットで膜を操作して肝細胞シートをラット皮下に移植した。

(2) エレクトロスピンニング法による2D ナノファイバー上での肝細胞培養

微細凹凸構造を有する生分解性スキャフォールドを作製した。具体的には、生分解性高分子ポリカプロラクトン (PCL) をエレクトロスピンニング法により紡糸し、PCL ナノファイバーからなる薄膜スキャフォールドを作製した。作製したPCL 薄膜スキャフォールド上にラット初代肝細胞を 1.0×10^5 cells/cm²の密度で播種し、3日間培養したのち、エチジウムホモダイマー1 (EthD-1)とAlexa fluor 488 ファロイジンで染色した固定化ラット肝細胞を蛍光顕微鏡で観察した。また、走査型電子顕微鏡で細胞形態および接着の様子を観察した。

(3) ヘパリン結合性フィブロネクチンフラグメントの設計および作製

組み換えタンパク質であるヘパリン結合性フィブロネクチンフラグメントとして、ヘパリン結合性タグ (MASKAQAQAKQWKQAQKAQK AQAQKQAKQW) と細胞接着性 RGD モチーフを有するフィブロネクチン III10 モジュール、シナジー配列の PHSRN を有するフィブロネクチン III9 モジュールからなるヘパリン結合性フィブロネクチン III9-10 (HB-FNIII9-10)を設計した (図1)。設計したHB-FNIII9-10 のコドンを含むプラスミド DNA を構築し、大腸菌培養およびIPTG によるHB-FNIII9-10 発現誘導を行った。さらに、大腸菌可溶化物を Heparin Sepharose 充填カラムに導入し、0.4 mol/L NaCl 水溶液による溶出でアフィニティー精製した。

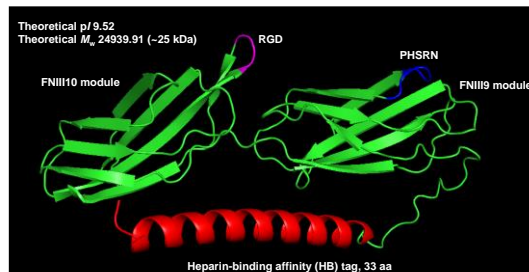


図1. 設計したHB-FNIII9-10の立体構造

(4) mRNA 送達による血管新生分泌肝細胞シート組織の作製と移植

3. (1)の手法で培養したラット肝細胞シートに対して、リポフェクション法によりヒト VEGF-165 (hVEGF₁₆₅)遺伝子を導入し、VEGF 分泌ラット肝細胞シート組織を作製した。具体的には、肝細胞シートを剥離する直前に、hVEGF₁₆₅ mRNA あるいは hVEGF₁₆₅ pDNA をリポフェクション法により遺伝子導入した。また、肝細胞シート組織の生着を長期に観察するために、親油性近赤外蛍光シアニン色素である 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl indotricarbocyanine iodide (DiR)で細胞膜をラベル化した。DiR ラベル化した VEGF 分泌肝細胞シート組織をラット背部皮下に移植し、IVIS Imaging System を用いて経時的に近赤外蛍光イメージングを行い、肝細胞シート組織が移植部位に生着しているかどうかを定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 再現性の良い肝細胞シート培養法の検討

培養肝細胞への酸素供給を促進し、再現性のよい移植可能な肝細胞シート組織の構築を確立した。具体的には、酸素供給不足を回避するために、培地深さを減少させて拡散距離を短くし、気相/培地界面から培養肝細胞への酸素供給を促進させた。PIPAAm 修飾ポリスチレン製培養皿上で72時間培養したところ、培地深さ1.3 mm では肝細胞は単層を形成しほぼ均一なE-カドヘリンの発現が見られた。しかし、培地深さ2.6 mm の場合、完全な単層は形成されず、死細胞の凝集といくつの欠損が見られた (図2)。さらに、培地深さ1.3 mm で72時間培養したのち、20°Cで30分間培養すると、グラフトされたPIPAAm は水和・親水性になるが、肝細胞シート自身の収縮力が弱いため自発的に剥離しない。その後セルスクレーパーを用いてシート周縁部をこすると、肝細胞シートとして脱着した (図3)。また、ゼラチン溶液を浸漬した膜を肝細胞上に載せ、20°Cで30分間培養したのち、ピンセットで膜を物理的に掴むと、ほぼ100%の効率で別の培養皿上、あるいはラット皮下組織に肝細胞シートを転写・移植することができた。

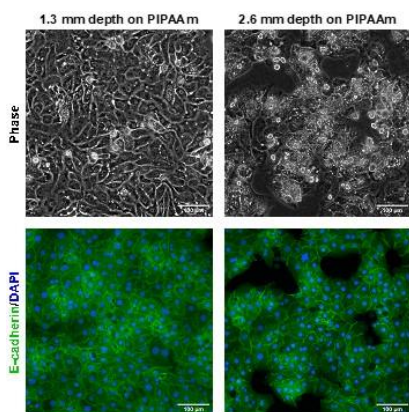


図2. 1.3 mm (左)および2.6 mm (右)の培地深さで72時間培養後、E-カドヘリンおよび核染色肝細胞の位相 (上)および蛍光画像 (下)。

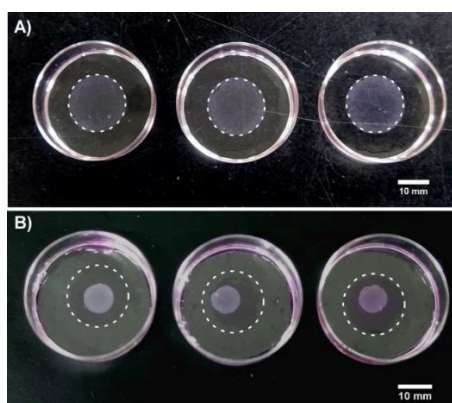


図3. (A) 20°C, 30分間後の肝細胞シート. (B) 20°C, 30分間後にセルスクレーパーで剥離した肝細胞シート. 破線は剥離前の細胞シート (直径 18 mm).

(2) エレクトロスピンニング法による 2D ナノファイバー上での肝細胞培養

PCL ナノファイバー上にラット初代肝細胞を播種し、培養 3 日後の固定化ラット肝細胞を EthD-1 と phalloidin で染色し蛍光顕微鏡で観察したところ、コラーゲンコートした PCL ナノファイバー内部に多くの肝細胞が侵入、接着することがわかった(図 4)。また、ナノファイバー内部に侵入した肝細胞は小さくコンパクトな状態で接着しており、細胞骨格が比較的未発達であった。一方、ナノファイバー表層に接着した肝細胞は細胞骨格が発達しており、電子顕微鏡像で大きく伸展していることが観察された(図 5)。以上のことから、ナノファイバーの表面形状がラット肝細胞の接着形態に大きく影響を与えることがあきらかとなった。

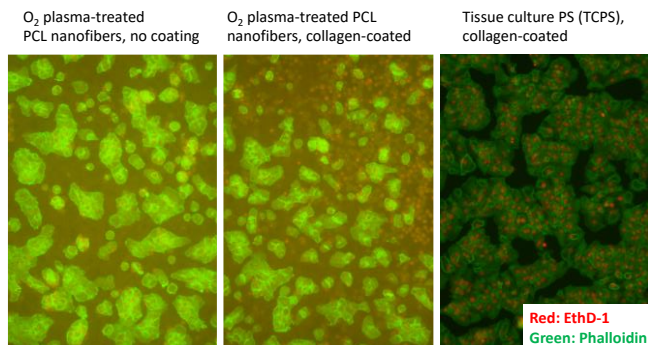


図 4. PCL ナノファイバー上で 3 日間培養したラット初代肝細胞の蛍光顕微鏡像。

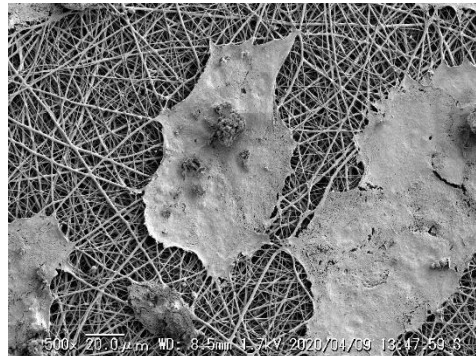


図 5. PCL ナノファイバー上で 3 日間培養したラット初代肝細胞の電子顕微鏡像。

(3) ヘパリン結合性フィブロネクチンフラグメントの設計および作製

大腸菌における HB-FNIII9-10 の発現は、37°C では不溶性の凝集体となったが、室温で溶解性のタンパク質として得られた。大腸菌の溶解物を Heparin Sepharose 樹脂充填カラムに導入したのち、0.4 mol/L NaCl 水溶液を流してタンパク質が得られた。また、ウェスタンブロッティングにより、この溶出タンパク質は FN 領域を含むことが確認された(図 6)。以上のことから、0.4 mol/L NaCl 水溶液で溶出したタンパク質はヘパリンとの間で強い静電的相互作用で吸着しており、溶出したタンパク質はヘパリン結合性 FN フラグメントであると考えられる。

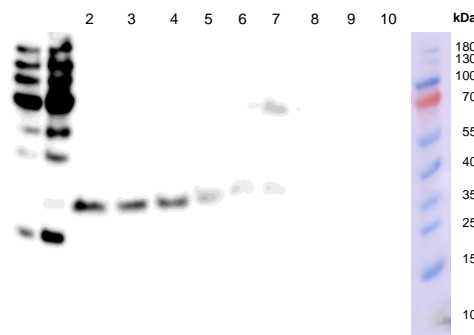


図 6. カラムから溶出したフラクションのウェスタンブロッティング

(4) mRNA 送達による血管新生分泌肝細胞シート組織の作製と移植

皮下移植した DiR ラベル化肝細胞シート組織の *in vivo* 近赤外蛍光イメージングを図 7 に示す。VEGF 遺伝子導入肝細胞シート、非遺伝子導入肝細胞シートともに、移植後 1 週間は近赤外蛍光強度が高く維持されており、十分に生着していることがわかった。移植後 2 週間以降、徐々にラベル化 DiR 由来の近赤外蛍光強度が減少した。しかし、VEGF mRNA 群はそれ以外の非遺伝子導入群、VEGF pDNA 群と比較して、移植後 4 週間後の近赤外蛍光強度の平均値が高かった。このことから、VEGF mRNA トランスフェクションによる VEGF 分泌が、移植した肝細胞シート組織周囲の血管新生を誘導し、肝細胞シート組織自身の生着率を向上させたことが示唆された。今後、移植組織周囲の組織切片の観察等を実施し、VEGF mRNA 送達が肝細胞シート組織の生着率に与える影響について解析を進める。

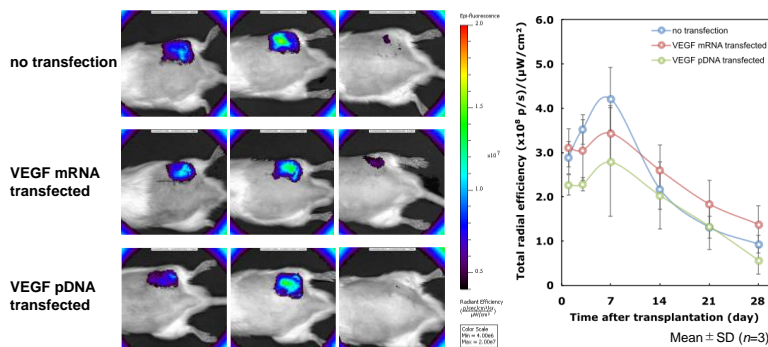


図 7. 皮下移植した DiR ラベル化肝細胞シート組織の *in vivo* 近赤外蛍光イメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kobayashi Jun, Okano Teruo	4. 巻 29 (10)
2. 論文標題 Reproducible Preparation of Primary Rat Hepatocyte Sheets Using a Thermoresponsive Culture Dish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part C: Methods	6. 最初と最後の頁 479 ~ 491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.tec.2023.0099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onodera Yu, Kobayashi Jun, Mitani Seiji, Hosoda Chihiro, Banno Kimihiko, Horie Kyoji, Okano Teruo, Shimizu Tatsuya, Shima Midori, Tatsumi Kohei	4. 巻 24 (2)
2. 論文標題 Terminus Selective Covalent Immobilization of Heparin on a Thermoresponsive Surface Using Click Chemistry for Efficient Binding of Basic Fibroblast Growth Factor	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2300307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202300307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KOBAYASHI Jun, ARISAKA Yoshinori, YUI Nobuhiko, YAMATO Masayuki, OKANO Teruo	4. 巻 11 (59)
2. 論文標題 Preservation of heparin-binding EGF-like growth factor activity on heparin-modified poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 37225-37232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA07317F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 KOBAYASHI Jun, YAMATO Masayuki, OKANO Teruo
2. 発表標題 Coating of visible light-crosslinkable poly(N-isopropylacrylamide) for thermoresponsive cell culture surfaces
3. 学会等名 72nd SPSJ Annual Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林純, 岡野光夫
2. 発表標題 移植可能な肝組織シート組織を作製するための温度応答性表面上での肝細胞培養
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林純, 岡野光夫
2. 発表標題 温度応答性表面上での肝細胞培養と移植可能な肝組織シート組織の作製
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林純, 岡野光夫
2. 発表標題 温度応答性培養皿を用いた再現性のよいラット初代肝細胞シート組織の構築
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小林純, LEE Hyukjin, 大和雅之, 岡野光夫
2. 発表標題 血管新生因子を分泌する肝細胞シート組織の作製
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 KOBAYASHI Jun, LEE Hyukjin, YAMATO Masayuki, OKANO Teruo
2. 発表標題 Gene delivery for creation of hepatocyte sheets secreting angiogenic factors
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 KOBAYASHI Jun, LEE Hyukjin, YAMATO Masayuki, OKANO Teruo
2. 発表標題 Messenger RNA delivery for fabrication of hepatocyte tissues secreting angiogenic factors
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials and The 8th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 KOBAYASHI Jun, LEE Hyukjin, YAMATO Masayuki, OKANO Teruo
2. 発表標題 Ex Vivo Gene Delivery for Fabrication of Hepatocyte Sheet Tissues Secreting Angiogenic Factors
3. 学会等名 Society for Biomaterials/Japanese Society for Biomaterials Hawaii Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林純, 有坂慶紀, 由井伸彦, 大和雅之, 岡野光夫
2. 発表標題 ヘパリン修飾温度応答性高分子グラフト表面に結合したヘパリン結合EGF様増殖因子の活性維持
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林純
2. 発表標題 肝組織工学のためのバイオマテリアル
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 KOBAYASHI Jun, LEE Hyukjin, YAMATO Masayuki, OKANO Teruo
2. 発表標題 Creation of transplantable hepatocyte sheet tissues by using thermoresponsive cell culture surfaces
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林純, LEE Hyukjin, 大和雅之, 岡野光夫
2. 発表標題 血管新生因子を分泌する肝細胞シート組織作製のための遺伝子デリバリー
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
	クォン イルグン (Kwon Il Keun)	慶熙大学校・歯学部・教授	
	ガルシア アンドレス (Garcia Andres J.)	ジョージア工科大学・機械工学科・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	慶熙大学校			
米国	ジョージア工科大学			