

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21907

研究課題名（和文）機能性ブロックポリペプチドを用いた臓器被膜の再構築

研究課題名（英文）Construction of organ capsule using functional polypeptides

研究代表者

松原 勤（Matsubara, Tsutomu）

大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20628698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：マウス肝星細胞は、人工エラスチンまたはアテロコラーゲンでコートしたディッシュの両方とも接着培養されたが、マウス肝細胞はアテロコラーゲンディッシュ上でのみ接着培養された。マウスの肝星細胞および肝細胞のプロテオーム解析を行ったところ、肝星細胞にはエラスチン結合タンパク質が検出され、その要因が明らかになった。

天然抽出エラスチンとゼラチンの混合液にリシンとグルタミン酸の架橋を触媒するトランスグルタミナーゼを使用して架橋構造を導入し、さらに凍結乾燥させて、伸縮性のある人工エラスチン膜の作成に成功した。さらに、人工エラスチン膜の薄層化を実現し、肝被膜の基本工程を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在行われている生物学研究で、*in vitro*と*in vivo*の結果が大きく乖離することが散見される。それは、多くの*in vitro*実験では生体内環境にはないプラスチック製素材を用いて細胞培養されており、絶えず物理的刺激を受けた環境下での解析となっている事が一要因ある。本研究成果は、実用化するために克服すべき課題が残っているが、これまでにない細胞培養基材の開発、組織・臓器の再構築研究へと展開され、肝臓病学や再生医療学を始めとして広範な生物学分野を飛躍的に発展させると期待される。

研究成果の概要（英文）：Mouse hepatic stellate cells were cultured on both of artificial elastin-coated dishes and atelocollagen-coated dishes, but mouse hepatocytes were cultured on atelocollagen dishes. Proteomic analysis of mouse hepatic stellate cells and hepatocytes indicated expressions of elastin-binding proteins in only hepatic stellate cells and revealed the cause. A cross-linked structure was introduced into a mixture of naturally extracted elastin and gelatin using transglutaminase, which catalyzes the cross-linking of lysine and glutamic acid. When the mixture was then freeze-dried, we successfully constructed an artificial elastin membrane and established the basic process for liver capsules was developed.

研究分野：肝臓病学

キーワード：エラスチン 臓器被膜 機能性ブロックポリペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器は実質臓器（細胞）とそれを包む膜（被膜）で出来ているが、これまでの臓器の再生医療研究は、細胞に関する研究が多く、被膜に関する研究はほとんどされていない。肝臓における被膜（肝被膜）は、弾性線維（エラスチン線維）が豊富な伸縮性のある膜である。しかし、天然エラスチン線維は架橋構造を持ち伸縮性がある一方で不溶性であり扱いづらく、販売されている抽出エラスチン線維は水溶性であるが架橋構造を持たず伸縮性がなく、加えて、その組成が不均一でありロット間に差があるため再現性が取り難い。そのため、肝臓の再構築には、エラスチンのバイオマテリアル化は必須である。

2. 研究の目的

本研究は、天然エラスチン構造を基盤として開発したブロックポリペプチドを利用した伸縮性のある細胞培養基材を開発して、肝被膜の再構築に向けた技術基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究での最重要かつ挑戦的課題は、『如何にして膜に伸縮性を持たせるか？』である。伸縮性が優れた弾性線維（エラスチン）にあって伸縮性に乏しい膠原線維（コラーゲン）にない構造は線維間の架橋構造である。そこで、本研究では、ブロックポリペプチド(GPG)に架橋構造を導入し、薄層化する方法で、伸縮性のある膜の再構築に挑戦する。

方法1：架橋構造が構築可能なブロックポリペプチド(GPG)を開発する。このGPGに架橋構造を可能とする配列を導入して複数種の架橋型GPGを合成する。多くは、特定のアミノ酸配列を有するDNA断片をPCRによって増幅し、遺伝子組換え技術によってGPG発現プラスミドを構築する。このGPG発現プラスミドを大腸菌に導入して発現・精製することによってGPGを得る。ここで、最も重要なのは架橋構造の確立にGPGが耐えられるかである。伸縮性を持たせた架橋構造を導入するにはGPGコアセルベーションを起こす必要があり、この段階でコアセルベーションを起こすGPGに厳選して次の実験へ展開する。

方法2：細胞培養によってGPGを選別する。実験1で合成した架橋型GPGをコートした細胞培養用ディッシュを作製する。この架橋型GPGコートディッシュを用いて、種々の細胞を用いて、細胞が培養できる事を確認し、細胞に適したGPGを選別して、実験3へ展開する。

方法3：GPG分子に架橋構造を確立して薄層化する。【松原】松原は、厚さ100 μmのコラーゲンシートを作製に成功しているため、この手法で架橋型GPGをシート化する。架橋法については、①申請者が確認済であるBS3やデスモシンとの脱水縮合反応などや②リシンとグルタミン酸の架橋を触媒するトランスグルタミナーゼの使用などを考えている。単独では伸縮性を得られるのは難しいので、BS3とデスモシンとの比率が重要になると考えており、複数の比率を検討して、最適な条件を確立する。

4. 研究成果

1. 本研究で開発している機能性ポリブロックペプチド（GPG）について以下の研究を行った。

(1) 肝臓細胞が培養可能な人工エラスチン基材の開発。

架橋構造の構築が難しいと推定されるGPG1と架橋構造が可能と考えられるGPG3を大腸菌で産生、精製し、ファイバー化した（図1）。これらは、コアセルベーション化していると推定された。さらに、架橋型GPGを用いた細胞培養の有用性を確認した。ラット肝星細胞ならびにラット肝細胞を単離して、(1-1)で合成したGPG1、GPG3ならびにアテロコラーゲン（一般的な培養系）をコートしたディッシュ上で培養した。ラット肝星細胞は非コート、GPG1、GPG3ならびにアテロコラーゲンコートディッシュのすべてで変わらず接着培養されたが、ラット肝細胞は、非コートおよびアテロコラーゲンコートディッシュ上で接着培養されたが、GPG1およびGPG3ディッシュ上では接着能が低く、スフェロイド様に培養された。スフェロイド培養の方が肝細胞の機能が維持されるという報告があるので、GPG培養の方が優れている可能性が示唆された。ラットに加えて、マウス肝星細胞ならびにマウス肝細胞についても検討した。マウス肝星細胞はラット肝星細胞と同様にすべてで変わらず接着培養された。一方、マウス肝細胞は、ラット肝細胞と違って、GPG1ディッシュ上では接着能がほとんどなく、GPG3ディッシュ上ではアテロコラーゲンコートディッシュ上と同様に接着培養

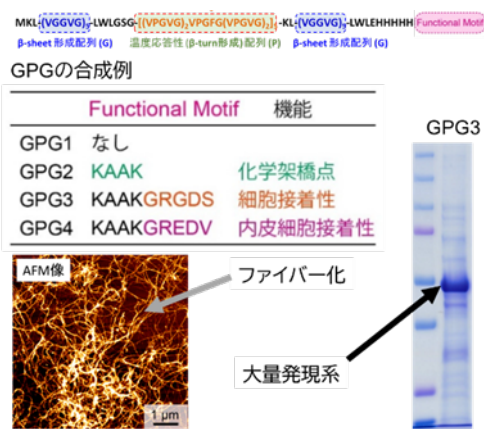


図1. GPG合成

された。以上の結果より、ラット肝細胞とマウス肝細胞では細胞外マトリックスに対する接着能に違いがあることが分かった (図2)。

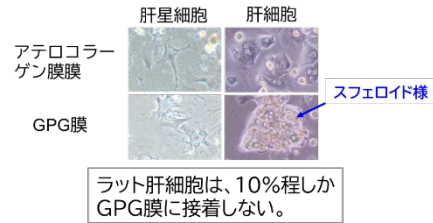


図2. GPG膜における細胞接着

(2) GPG の合成率が良い大腸菌発現系の開発。

まず、GPG1 ならびに GPG3 の DNA コドン配列を pCold プラスミドへ導入し、低温による GPG1 ならびに GPG3 発現を試みたが、GPG1 および GPG3 の収量に大きな改善が認められなかった。次に、グルタチオントランスフェラーゼ (GST) 融合 GPG1 ならびに GPG3 蛋白質を発現させるために GPG1 ならびに GPG3 の DNA コドン配列を pET41a プラスミドへ導入して発現を試みると、劇的に GPG1 および GPG3 の収量が改善され、GPG1 および GPG3 発現量は共に大腸菌総蛋白質量の約 70% を占めた。大腸菌発現系による GPG の回収率が改善したが、大腸菌で得られる GPG 量が予備検討するには少なすぎたため、天然抽出エラスチンを用いて、架橋型膜の構築および薄層化を検討することにした。

(3) 架橋型 GPG 膜を目指した薄層化の技術開拓。

天然抽出エラスチンにリシンとグルタミン酸の架橋を触媒するトランスグルタミナーゼを使用して架橋構造を導入すると若干の伸縮性が得られたが脆くすぐに壊れてしまった。実際の肝臓膜にはエラスチンに加えてコラーゲンも含まれているので、コラーゲンを混ぜて合成すると、伸縮性が得られ脆さが改善されたが、水に溶ける点が改善されていなかった。そこで、凍結乾燥を行う等の工夫をすると、伸縮性のあるエラスチン膜の開発に成功し、細胞培養が可能であることが確認でき、紙一枚程度の厚さの膜へと展開させるまでに至った。この人工エラスチン膜の表面を原子間力顕微鏡で観察すると、コラーゲン膜よりも凹凸が大きいことが分かった。現在、凹凸と細胞培養との関連性を検証している。次に、この伸縮性エラスチン膜の風船化(袋状にすること)に挑戦した。3D バイオプリンターを用いて風船化をするために、伸縮性エラスチン膜に使用した材料(エラスチン・ゼラチンの混合液)のインク化を目指した。エラスチンやゼラチンの組成など複数の項目について検討したが、3D バイオプリンターに適したインクを構築することができなかった。そこで、アイスクリームにチョコレートコーティングするアイデアに基づいてディップ法による風船化を試みたところ、直径 5mm 程度ではあるが風船化した伸縮性エラスチン膜の開発に成功した。

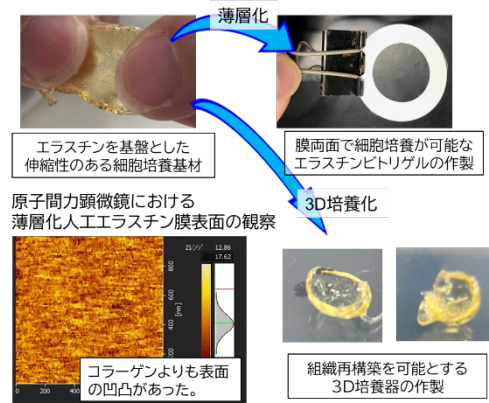


図3. 伸縮性人工エラスチン膜の開発

(4) 伸縮性エラスチン膜に使用した材料がもたらす細胞障害性の検討。

通常培地で 10 倍希釈した高濃度のエラスチン・コラーゲン混合液は、37 度でゾル化、4 度でゲル化する。37 度培養では、高濃度のエラスチン・コラーゲン混合液を用いて HepG2 細胞ならびに HEK293 細胞を培養すると、通常培地に比べ細胞生存率が 10% 程度であった。一方、4 度培養では、通常培地では細胞生存率が数%程度であるに対して、高濃度のエラスチン・コラーゲン混合液を用いて HepG2 細胞ならびに HEK293 細胞を培養すると細胞生存率が 80% であった。細胞が液体よりもゲルの方が安定的に存在するというアイデアをサポートする結果が得られた。次に伸縮性エラスチン膜で細胞障害性が認められたため、伸縮性エラスチン膜合成で使用しているカルシウムイオン濃度と細胞障害性を検証した。カルシウム濃度を 0%、4.4%、8.8% に調製して伸縮性エラスチン膜を合成し、細胞培養すると、4.4% まで細胞障害性を示さないことが分かった。以後、4.4% 以下のカルシウム濃度で伸縮性エラスチン膜を合成することにした。

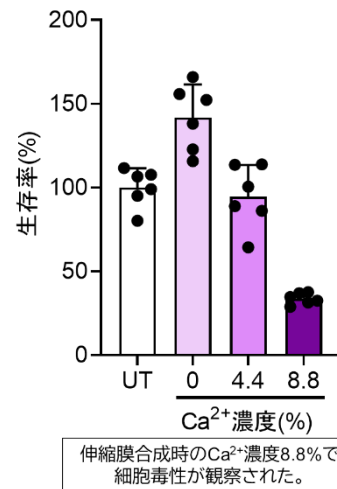
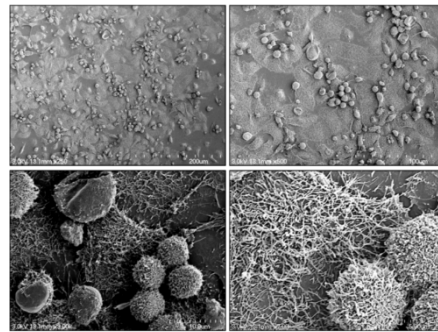


図4. 伸縮性人工エラスチン膜の開発

(5) 中皮細胞の単離培養条件の検討。

肝臓の被膜を再現することを目指し、中皮細胞の単離に挑戦し、伸縮性エラスチン膜上で中皮細胞が培養できることを検証した。麻酔下のマウスの門脈から灌流液を流し、肝臓内の血液を除去した後、肝臓を取り出しプロテナーゼで肝臓表面の中皮細胞を剥離し、MACS を用いて中皮細胞

胞を回収した。回収した中皮細胞をゼラチンコートディッシュで培養すると、培養後 24 時間あたりまでは、中皮細胞の特徴である絨毛が観察されるが、48 時間以降になると絨毛が消失し、線維芽細胞様の形態に変化した。そこで、伸縮性エラスチン膜上で中皮細胞の培養を試みたが、細胞接着率が悪く、伸縮性エラスチン膜を改善させる必要があると考えられた。



中皮細胞の微絨毛が観察された。

図5. 中皮細胞の単離・培養

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugioka Yusuke, Nakamura Jin, Ohtsuki Chikara, Sugawara-Narutaki Ayae	4. 巻 22
2. 論文標題 Thixotropic Hydrogels Composed of Self-Assembled Nanofibers of Double-Hydrophobic Elastin-Like Block Polypeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4104 ~ 4104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22084104	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上喜来々、松原三佐子、Truong Huu Hoang、松原勤、宇留島隼人、湯浅秀人、大黒敦子、池田一雄、吉里勝利、河田則文
2. 発表標題 肝細胞と肝星細胞との細胞膜を介した直接的なクロストーク
3. 学会等名 第28回 肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kirara Inoue, Misako Sato-Matsubara, Truong Huu Hoang, Tsutomu Matsubara, Hayato Urushima, Atsuko Daikoku, Kazuo Ikeda, Katsutoshi Yoshizato, Norifumi Kawada
2. 発表標題 Cell membrane-mediated direct crosstalks between hepatocytes and HSCs
3. 学会等名 Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference 2021 Osaka (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayae Sugawara-Narutaki
2. 発表標題 Elastin-Inspired Protein Nanofibers and Hydrogels with Tailored Functionalities
3. 学会等名 32nd 2021 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦晴菜、乗鞍敏夫、湯浅勲、湯浅（小島）明子
2. 発表標題 In vitro 非アルコール性脂肪性肝疾患モデルの確立とその応用
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 勤
2. 発表標題 肝脂質の恒常性維持における臓器ネットワーク
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会合同大会
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
研究分担者	鳴瀧 彩絵 (Sugawara-Narutaki Ayae) (10508203)	名古屋大学・工学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	湯浅 明子(小島明子) (Kojima-Yuasa Akiko) (90295709)	大阪公立大学・大学院生活科学研究科・准教授 (24405)	

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
---------	---------