

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19915

研究課題名（和文）肝ECMスポンジニードルを基盤とした肝表搭載型Detachable-Liver

研究課題名（英文）Fabrication of detachable-liver based on liver-derived ECM sponge needle

研究代表者

堺 裕輔（SAKAI, Yusuke）

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：10608904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：表面がフィルム状の多層アガローススポンジニードル基材（MSニードル）を作製した。MSニードルのBSA（分子量66.5 kDa）の拡散供給とLDH（分子量140 kDa）の拡散抑制を明らかにし、細胞・液性免疫の抑制を示唆した。ラット初代肝細胞をMSニードル上で培養すると、一般的な培養法と比較して高いアルブミン産生能を維持した。Cps1やArg1（尿素回路）、Foxo1（糖新生）、G6pc（解糖系）等、遺伝子発現レベルも維持された。肝臓表面にMSニードルを穿刺、ラット初代肝細胞を播種したところ肝細胞スフェロイドを形成し、少なくとも5日間、生存した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では肝臓に着目し、組織・臓器に穿刺して新たに培養足場を提供するシステムを創出した。移植肝細胞に肝臓（ホスト）から液性因子を拡散供給して組織形成を促すと共に、免疫拒絶や細胞拡散を抑制し得た。また、移植後に完全に除去できる特徴を併せ持つ。腫瘍形成リスクを完全には排除できないiPS細胞等の遺伝子操作により作製した細胞を安全に利用できる可能性を有する。様々な組織・臓器に対して新たな生体内培養環境を増設できる発展性からも、革新的な再生医療の実現に大いに貢献し得る。

研究成果の概要（英文）：A multi-layer agarose sponge needle substrate (MS needle) with a film-like surface was fabricated. The MS needle diffused BSA (molecular weight, 66.5 kDa) and inhibited the diffusion of LDH (molecular weight, 140 kDa), suggesting the inhibition of cellular and humoral immunity. Cultured primary rat hepatocytes in the MS needle maintained a high albumin production capacity compared to conventional culture methods. Gene expression levels of Cps1, Arg1 (urea cycle), Foxo1 (gluconeogenesis), G6pc (glycolysis) were also maintained. When the MS needle was punctured into the liver surface and primary rat hepatocytes were inoculated, hepatocyte spheroids were formed and survived for at least 5 days.

研究分野：再生医用工学

キーワード：肝臓 ECM 構造タンパク質 スポンジ ニードル 肝再生医療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 肝移植の代替として肝再生医療が期待され、血流の豊富な肝臓や腎臓内で移植肝細胞を増殖・組織化する研究が多く報告されているが (Utoh R, *et al.*, *J Hepatol*, 2018、他)。
- (2) 一度移植すると完全にグラフト除去することは不可能であり、遺伝子操作した細胞が有する腫瘍形成リスクを考慮すると臨床応用には多くの課題が残されている。
- (3) 研究代表者は、ヒト初代肝細胞/線維芽細胞複合シートを独自開発し、グラフト除去可能な皮下性血管誘導ヒト肝組織を作製した (Sakai Y, *et al.*, *Biomaterials*, 2015、他) が、肝組織肥大には至っていない。
- (4) 高い肝組織形成効率と完全なグラフト除去を両立する技術は報告されていない。

### 2. 研究の目的

- (1) “肝細胞を増殖・組織化できる移植部位”と“グラフト除去できる安全性”を併せ持つ技術を確認するため、“腸管血流を供給できる肝臓表面”に“着脱可能な移植システム”を組み合わせた肝再生医療を着想した。
- (2) マイクロニードルの概念を応用し、肝臓から液性因子を供給しつつ免疫細胞等の浸潤を抑制し得るニードル基材を開発し、肝臓表面に Detachable-Liver を作製する独創的な肝疾患治療システムの構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多層アガローススポンジニードル (Multi-layer sponge needle; MS ニードル) の作製

- ① 直径 1.1 mm、高さ 3.3 mm の円柱ニードルを 10 個/cm<sup>2</sup> で配置した金属鋳型を利用し、ポリジメチルシロキサン (PDMS) で転写して凹鋳型を作製した。3%アガロースを鋳型に導入し、凍結乾燥した。走査型電子顕微鏡 (SEM) やマイクロ CT、圧縮試験機を利用して、表面や内部構造を評価した。
- ② MS ニードルをアガロースゲルに穿刺し、フルオロセインによる初期の溶液の吸い上げ、BSA (ウシ血清アルブミン; 分子量 66.5 kDa) と LDH (L-乳酸脱水素酵素; 140 kDa) の拡散を評価した。

#### (2) MS ニードルでの *in vitro* 肝細胞培養

- ① MS ニードルを培地で置換したアガロースゲルに穿刺し、ラット初代肝細胞を  $4.0 \times 10^5$  cells/mL で 7 日間培養した。一般的なコラーゲンコートディッシュ、コラーゲンスポンジやアガローススポンジを比較対象とした。
- ② 培養 3 日目の培養基材を回収し、4%PFA in PBS で固定した。パラフィン切片作製後、HE 染色した。
- ③ 培養 3 日目の培養基材を回収し、Total RNA を抽出した。肝特異的遺伝子発現レベルをリアルタイム RT-PCR で評価した。
- ④ 培養 3、5、7 日目の培地を回収し、アルブミン濃度を ELISA で測定した。

#### (3) MS ニードルでの *in vivo* 肝細胞培養

- ① MS ニードルをマウス肝臓に穿刺し、穿刺後 1~14 日目の肝組織を 4%PFA in PBS で固定した。パラフィン切片作製後、HE 染色した。
- ② MS ニードルをマウス肝臓に穿刺し、ラット初代肝細胞を  $1.0 \times 10^6$  cells/mL で 5 日間培養した。
- ③ 肝細胞移植 2、5 日目の培養基材を回収し、4%PFA in PBS で固定した。パラフィン切片作製後、HE 染色及び肝特異的タンパク質を免疫化学蛍光染色した。

### 4. 研究成果

#### (1) MS ニードルの多層構造、拡散

- ① MS ニードルは表面がフィルム上、内部がスポンジ状の二層構造を有しており、目標としていた多層構造を構築することに成功した (Fig. 1a)。凍結乾燥することにより、直径 0.65 mm、高さ 3.0 mm のニードルに収縮した。
- ② マイクロ CT の評価から、スポンジ細孔は一定のサイズに制御され、均一な基材の作製に成功した (Fig. 1b)。50~200  $\mu$ m の範囲に 68%が存在した。

③ MS ニードルを構成している 3%アガローススポンジのヤング率は 3.9 MPa であり、ブタ肝臓 (0.6 MPa) やマウス肝臓 (0.03 MPa) に穿刺可能な強度を有することを明らかにした。

④ MS ニードルはアガロースゲルに穿刺後、遅くとも 5 時間でフルオロセインを吸い上げ、肝表への穿刺により移植細胞へ液性因子を供給し得ることが期待された (Fig. 2a)。分子拡散評価では、BSA は 5 時間後に平衡に達したのに対して、補体と同等の分子量を持つ LDH の拡散は抑制された (Fig. 2b, c)。移植細胞の生存に必要な液性因子を供給する一方で、補体の拡散は妨げられることが期待され、移植細胞への免疫システムによる攻撃の低減が期待される。すなわち、MS ニードルはフィルム構造による分子ふるい効果を有しており、細胞・液性免疫を抑制し得ることが示唆された。

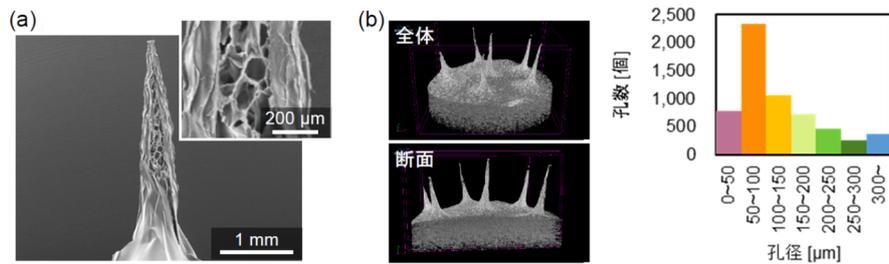


Fig. 1. (a) MSニードルの断面像(多層構造)。 (b) 制御されたスポンジ細孔サイズ。

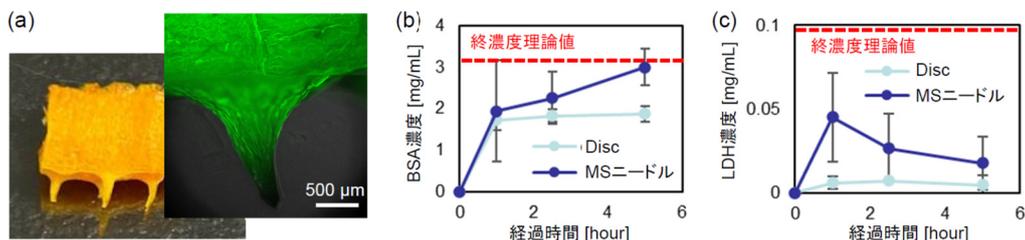


Fig. 2. (a) フルオレセインの吸い上げ(5時間後)。MSニードル内の(b) BSA及び(c) LDH濃度変化。

### (2) MS ニードルでの肝細胞のスフェロイド形成、高い肝機能発現 (*in vitro*)

① 培養 3 日目の HE 染色像から、MS ニードルの肝細胞は球状細胞組織体 (スフェロイド) を形成した (Fig. 3)。直径は 100 μm 程度であり、十分に生存し得るサイズに制御されていた。

② Cps1 や Arg1 (尿素回路)、Foxo1 (糖新生)、G6pc (解糖系) 等、肝特異的な遺伝子発現レベルが維持された。

③ 一般的なコラーゲンコートディッシュ、コラーゲンスポンジやアガローススポンジでは培養 5 日目にはアルブミン産生能が低下・消失するものの、MS ニードルでは向上・維持された (Fig. 4)。組織体形成や、液性因子の拡散供給に起因していると考え得る。

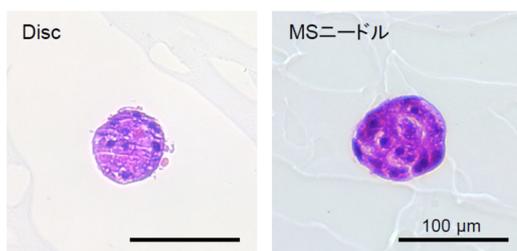


Fig. 3. MSニードルでのスフェロイド形成。

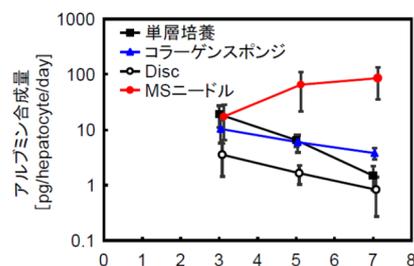


Fig. 4. アルブミン産生速度。

### (3) MS ニードルでの肝細胞のスフェロイド形成、高い肝機能発現 (*in vivo*)

① MS ニードルが肝臓表面の漿膜を貫いて固定された (Fig. 5)。MS ニードル内にほとんど細胞浸潤は見られなかった。細胞の生存と細胞・液性免疫を抑制し得ることが期待された。

② *In vitro* での培養結果と同様に、肝細胞スフェロイドを形成し、少なくとも 5 日間、生存した (Fig. 6a)。

③ 肝細胞スフェロイドはアルブミン合成能や細胞間接着タンパク (E-cadherin) 発現を維持した (Fig. 6b)。MS ニードルを利用した肝細胞移植は、肝疾患治療への展開が期待される。

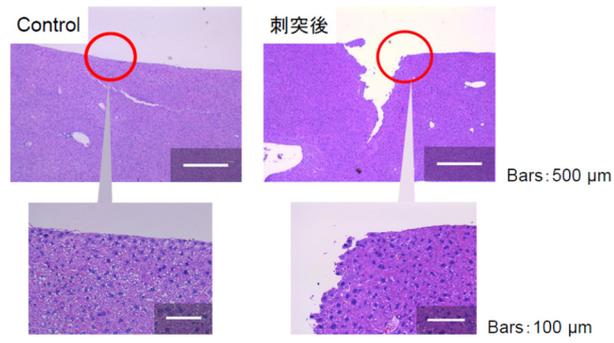


Fig. 5. MSニードルを穿刺した肝臓表面。

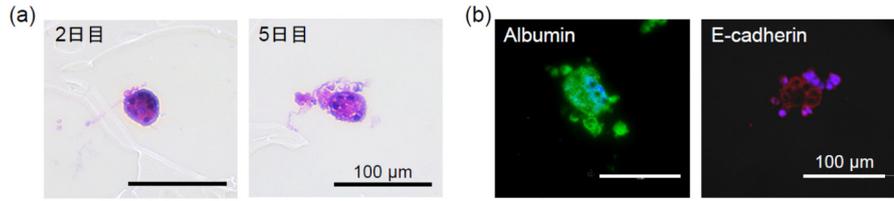


Fig. 6. (a) 肝臓表面に移植した肝細胞のスフェロイド形成。(b) スフェロイドのタンパク質発現。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福村将成、白木川奈菜、堺裕輔、江口晋、井嶋博之
2. 発表標題 肝細胞移植のための多層スポンジニードル足場基材の創製
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白木川奈菜、福村将成、比江島光司、堺裕輔、井嶋博之
2. 発表標題 肝臓表面における肝組織構築に向けたスポンジニードル基材の開発
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白木川奈菜、堺裕輔、福村将成、井嶋博之
2. 発表標題 肝臓表面における肝組織構築に向けた基材開発
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 福村将成、堺裕輔、白木川奈菜、井嶋博之
2. 発表標題 肝組織構築のための多層スポンジニードル足場基材の開発
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022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	江口 晋  (EGUCHI Susumu)  (80404218)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授   (17301)	

	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 協力者	白木川 奈菜  (SHIRAKIGAWA Nana)  (90724386)	九州大学・工学研究院・助教   (17102)	

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