

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03537

研究課題名(和文) mRNA送達による立体細胞組織内タンパク質発現を利用した脈管形成と血管新生誘導

研究課題名(英文) Induction of vasculogenesis and angiogenesis in three-dimensional tissues by using protein expressions with mRNA delivery

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3D細胞シート組織内で脈管形成を誘導し、血管新生を促すことでホスト血管と連結する技術を開発した。具体的には、3D細胞シート組織にVEGFをコードしたメッセンジャーRNA (mRNA)を送達し、血管内皮細胞近傍にパラクライン様に作用させることで、3D細胞シート組織内部での脈管形成の誘導が示唆された。また、mRNA送達によりVEGFを速やかに分泌する移植可能な肝・心筋細胞シートを作製できることがわかった。本研究で得られた成果と細胞シート積層化技術により、内皮細胞による毛細血管様構造を有する機能的な三次元組織構築への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNAを利用した脈管形成と同様の内容はこれまでに報告されていない。また、移植可能な3D組織の構築が実現されれば、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と同時に、肝組織再生治療の臨床応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel technique to induce angiogenesis in 3D cell sheet tissue and promote angiogenesis to connect with a host blood vessel. By introducing VEGF-encoding messenger RNA (mRNA) into the 3D cell sheet tissue and allowing it to act like a paraclone in the vicinity of vascular endothelial cells, it was suggested to induce angiogenesis inside the 3D cell sheet tissue. It was also found that transplantable liver / cardiomyocyte sheets that rapidly secrete VEGF can be prepared by mRNA delivery. Furthermore, by stacking these, it can be expected to be applied to the construction of a functional three-dimensional tissue having a capillary-like structure of endothelial cells.

研究分野：組織工学

キーワード：細胞シート 血管新生 脈管形成 mRNA送達

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトの組織・臓器を細胞から再構築する組織工学が世界的に注目されており、様々な疾患の治療に応用されている。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の構築に成功している。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中である。

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1アンチトリプシン欠損症(K. Ohashi, *et al.*, *Nat. Med.*, 2007)など先天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 μ m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。

そこで本研究では、生体内における血管形成メカニズムを模倣し、積層化細胞シート組織内部での血管形成誘導手法を考えた。具体的には、生体内における血管形成は、中胚葉から血管内皮前駆細胞を経て血管内皮細胞の未成熟な網状構造(原始血管叢)をつくる脈管形成(vasculogenesis)と、既存の血管から発芽して血管が分岐する血管新生(angiogenesis)の二段階であることに注目した。後者の血管新生に関しては、血管新生因子の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)やbFGF、あるいはその遺伝子をコードしたウイルス/非ウイルスベクターを虚血部位に送達する治療法が開発が行われている。一方、前者の脈管形成に関しては、*in vivo*での胚形成期での分化メカニズムに関する基礎研究により、VEGFやbFGFが重要だとわかってきた。*In vitro*での脈管形成については、マウスES細胞由来Flk-1陽性細胞(血管内皮前駆細胞)がコラーゲンコート培養皿上でVEGF存在下、脈管形成様構造を形成すると報告されたが(M. Hirashima, *et al.*, *Blood*, 1999)、3D細胞組織内部での報告例はない。

2. 研究の目的

本研究は、3D細胞シート組織内で脈管形成を誘導し、その後、血管新生を促すことでホスト血管と連結する技術の開発を目指す。3D細胞シート組織にVEGFをコードしたメッセンジャーRNA(mRNA)を導入し、血管内皮細胞近傍にパラクライン様に作用させることで、3D細胞シート組織内部での脈管形成の誘導が期待される。mRNAは速やかにタンパク質発現させるのと同時に、送達方法を設計することでタンパク質発現量および時間を制御できるため、mRNA送達は本研究に適していると考えられる。さらに、3D細胞シート組織にVEGF mRNAを導入し、生体移植することでホストから血管新生を誘導し、3D細胞シート組織とホスト血管の接続を目指す。本研究のmRNAを利用した脈管形成と同様の内容はこれまでに報告されていない。また、移植可能な3D組織の構築が実現されれば、これまでに不可能であった肝臓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イクスルーとなると同時に、肝臓再生治療の臨床応用への展開が期待される。

3. 研究の方法

(1) 血管新生因子を分泌する肝・心筋細胞シート組織のための核酸送達

細胞シート組織への遺伝子導入方法を検討する目的で、改変型緑色蛍光タンパク質(EGFP)、NanoLuc Luciferaseをレポーター遺伝子としたmRNAとプラスミドDNA(pDNA)を調製した。EGFP mRNAは、DNAを鋳型とした*in vitro*転写により合成した。具体的には、T7プロモーター領域、オープンリーディングフレーム(ORF)、poly(T)鎖を有するpDNAを線状化し、これを鋳型にしたPCRでDNA鎖を増幅した。得られたDNA鋳型とMEGAscript™ T7 Transcription kitを用いて、キャップ構造とpoly(A)鎖を有するEGFP mRNA、NanoLuc mRNAを合成した。また、CAGプロモーターを有するEGFP pDNAを大腸菌の形質転換と培養により増幅、精製した。調製したmRNAとpDNAを市販のリポフェクション試薬を用いたリポフェクション法、エレクトロポレーション法によりラット初代肝細胞、心筋細胞に導入し、EGFPの発現をフローサイトメトリーで解析した。NanoLuc Luciferaseの発現は、培地中の分泌型NanoLuc Luciferaseと発光基質を反応させ、対照に対しての発光の相対値で評価した。

さらに、血管新生因子としてヒトVEGF遺伝子をコードしたmRNAあるいはpDNAを上述と同様の手法で作製し、リポフェクション法による遺伝子導入後、細胞から培地中に分泌されるヒトVEGFを経時的に採取した。ヒトVEGF濃度は、ELISA法により決定した。

(2) 積層化 3D 細胞シート組織での脈管形成モデルの構築

VEGF mRNA を導入した細胞シート近傍に血管内皮細胞を配置し、脈管形成するモデルを構築した。3 種のヒト培養細胞 (293FT 細胞、HeLa 細胞、HEK293 細胞) を用いて、VEGF mRNA の導入条件の最適化と VEGF 発現量の経時的変化の測定を行った。また、温度応答性培養皿上でシート状に培養し、温度低下による細胞シートの脱着とゼラチンスタンプ法による細胞シートの積層化を行い、脈管形成モデルに適した細胞種を決定した。さらに、mRNA 送達培養細胞シート間に GFP を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞 (GFP-HUVEC) を導入した積層化細胞組織を構築し、積層化細胞シート組織内部での GFP-HUVEC の挙動を観察した。

(3) 血管新生因子を分泌する移植可能な細胞シート組織

血清をコートした温度応答性培養皿 (UpCell) 上で作製した初代ラット肝細胞シートに VEGF mRNA、pDNA をトランスフェクションし、フィブリンゲルをコートしたゼラチンスタンプを用いてコラーゲンコート培養皿に転写、培養したのち、培地中に分泌されたヒト VEGF を経時的に定量した。

また、新生仔ラットから採取した血管内皮細胞を含む初代心筋細胞を培養し、VEGF mRNA 送達して培養 5 日後に CD31 陽性細胞を観察した。

4. 研究成果

(1) 血管新生因子を分泌する肝・心筋細胞シート組織のための核酸送達

肝細胞シート組織を作製するためには、温度応答性培養皿上で肝細胞を高密度で培養し、細胞間結合を形成させる必要がある。まず、肝細胞の生存率を維持したまま高密度で培養する条件を検討した。ガス透過性のポリジメチルシロキサン (PDMS) 上にコラーゲンを共有結合させ、ラットから採取した肝実質細胞を培養したところ、ガス透過を遮断した PDMS、ポリスチレン製培養皿と比較して、数日間培養後の接着細胞数が多かった。これは、肝実質細胞の酸素消費量が多く、ガス透過性膜から十分な酸素を供給できなかったためと考えられる。この結果に基づき、大気からの酸素流入を促進させるため、培地上面と培養面の高さを減少させたところ (具体的には 1.3 mm 程度) 高密度を維持したまま肝細胞培養ができることがわかった。

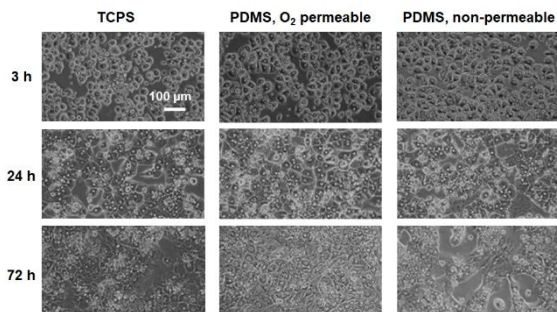


図. ポリスチレン製培養皿 (TCPS) およびポリジメチルシロキサン (PDMS) 上での初代ラット肝細胞

続いて、ラット初代肝細胞に対する核酸送達法の比較を行った。エレクトロポレーション法により EGFP pDNA トランスフェクションを行ったところ、細胞生存率が約 35%、EGFP 陽性率が約 1% 程度の低い導入率であった。一方、リポフェクション法では細胞生存率 90% 以上を維持したままトランスフェクションを行うことができ、核酸:リポフェクション試薬比 1:2 で EGFP 陽性細胞率は 1.42% (pDNA)、7.15% (mRNA) であった。ただし、ラット初代肝細胞での EGFP 発現はきわめて低く、肝細胞の自家蛍光との峻別が難しい。そこで、レポーター遺伝子として NanoLuc Luciferase を搭載した mRNA のリポフェクションにより、ラット初代肝細胞での NanoLuc Luciferase の発現を高感度に検出することができ、核酸:リポフェクション試薬比 1:2 で細胞生存率を維持しつつ十分な発現が起こることを確認した。

レポーター遺伝子の発現で最適化したリポフェクション法の条件を利用して、VEGF mRNA および pDNA トランスフェクション後の VEGF 分泌を確認した。まず、増殖性で遺伝子導入効率の高い 293FT 細胞をコンフルエント状に培養し、トランスフェクションを行った。対照の 293FT 細胞から分泌する VEGF は検出できなかったが、VEGF mRNA を導入すると培養 1 日以内で約 100 ng

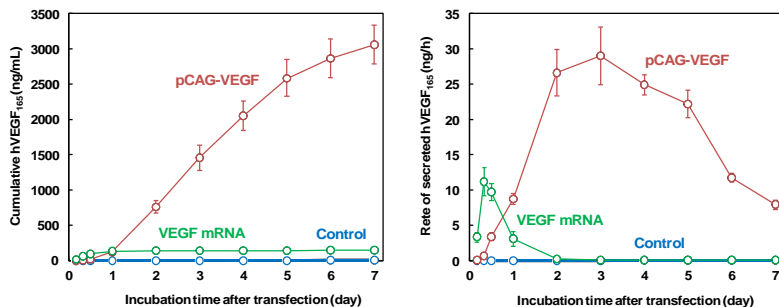


図. VEGF pDNA/mRNA を導入した 293FT 細胞が分泌したヒト VEGF (左) と分泌速度 (右)

の VEGF を培地中に分泌した。プラスミドでの遺伝子導入の場合、mRNA と比較して大量の VEGF を分泌し、7 日間の培養期間中で約 3 mg であった。さらに、VEGF mRNA、pDN コンフルエント状のラット初代肝細胞にトランスフェクションしたところ、24 時間以内に約 80 ng の VEGF を分泌した。プラスミドの場合、24 時間以内での分泌量は約 15 ng 程度で、7 日間培養後は約 120 ng であった。以上より、非増殖性の初代肝細胞に対する mRNA トランスフェクションは速やかにタンパク質発現を引き起こし、初期の発現量もプラスミドよりも高いことがあきらかになった。

また、心筋細胞シート組織への mRNA デリバリーについては、効率的な発現を行うための mRNA 設計および *in vitro* 合成を行った。具体的には、mRNA 中のウリジンを Pseudo-UTP (PsU) あるいは N1-Methylpseudo-UTP (MePsU) に置換すると、特に MePsU に置換した mRNA を用いたデリバリーの際に効率的な遺伝子発現が確認できた。

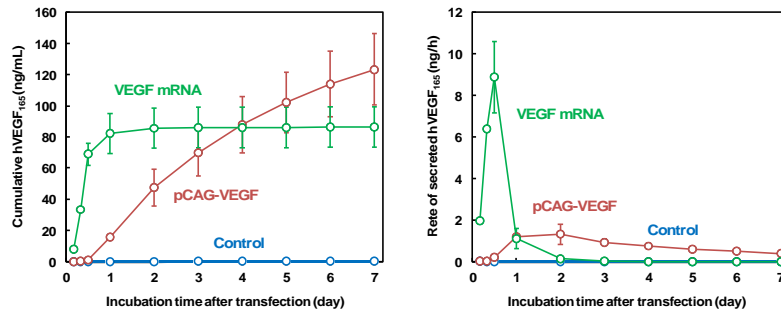


図 2. VEGF pDNA/mRNA を導入したラット初代肝細胞が分泌したヒト VEGF (左) と分泌速度 (右)

(2) 三次元細胞シート組織での脈管形成モデルの構築

ヒト培養細胞からなる 3D 組織に VEGF mRNA を送達し、血管内皮細胞ネットワーク形成を誘導するモデル構築を行った。三種類のヒト培養細胞株 (293FT, HEK293, HeLa) のうち、主要な血管新生因子の分泌が少なく、かつ温度応答性培養皿を用いて細胞シートを回収できたのは HeLa 細胞であった。HeLa 細胞をモデルとして用いて、VEGF mRNA 送達した HeLa 細胞シートの中に GFP-HUVEC を挟み、積層化組織内での GFP-HUVEC の挙動を観察した。VEGF mRNA 送達せず培地中に VEGF を添加しただけの場合、VEGF 濃度に関わらず GFP-HUVEC の挙動に変化が見られなかった。一方、VEGF mRNA 送達群は対照群と比較して HUVEC 細胞数が多く伸展した。これは、HeLa 細胞シートから分泌された VEGF が傍分泌によって積層化細胞シート内 GFP-HUVEC に作用したことを示唆する。このことより、mRNA 送達による積層化細胞シート組織内部へのタンパク質送達の可能性が示された。

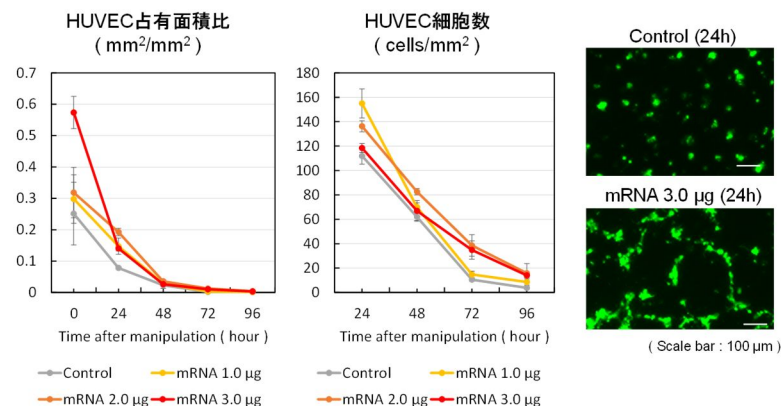


図 3. mRNA 導入 HeLa 細胞シート組織内での GFP-HUVEC 挙動

(3) 血管新生因子を分泌する移植可能な細胞シート組織

(1) で最適した遺伝子導入条件を用いて、移植可能な VEGF 分泌肝細胞シート組織の作製を行った。具体的には、温度応答性培養皿でラット初代肝細胞を培養し、転写直前に VEGF 遺伝子を導入したのち、ゼラチンスタンプ法により肝細胞シートをコラーゲンコート培養皿上に転写・培養した。転写後、肝細胞シートから培地中に分泌される VEGF を定量した。転写後の肝細胞シートは、ヒト VEGF を分泌していることを確認した。また、VEGF mRNA を導入した肝細胞シートは、VEGF pDNA を導入したものと比較して、速やかに VEGF を分泌することがわかった。

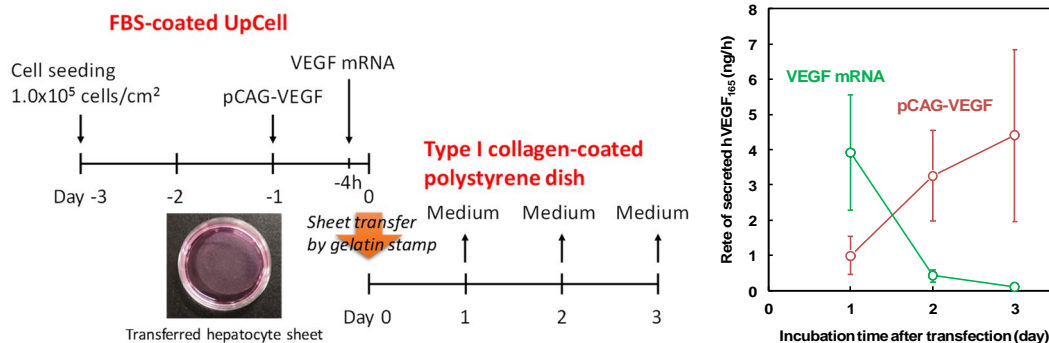


図 4. ゼラチンスタンプを用いた遺伝子導入肝細胞シートの転写 (左) と転写後の遺伝子導入肝細胞シートが分泌したヒト VEGF (右)

また、ラット初代心筋細胞シート組織に VEGF mRNA 送達し、シート組織内に含まれている血管内皮細胞の形態変化を観察した。VEGF mRNA 送達していない対象群では、ごく一部の血管内皮細胞がネットワーク構造を形成し、多くは円形のままであった。一方、VEGF mRNA 送達群では毛細血管様のネットワーク形成が顕著に観察された。さらに、温度応答性培養皿 UpCell II 上で培養し

ラット初代心筋細胞に VEGF mRNA 送達し、温度を 20 に低下させると 1 時間以内に自発的に脱着し、移植可能なラット初代心筋細胞シート組織を回収できることを確認した。

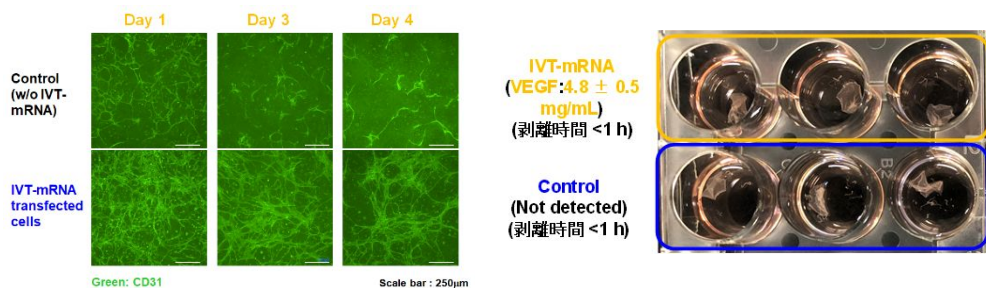


図 . VEGF mRNA 送達したラット初代心筋細胞中に形成される血管内皮細胞のネットワーク形成 (CD31 染色) (左) と温度応答性培養皿 UpCell を用いた VEGF mRNA 送達心筋細胞シート組織の回収 (右)

以上のことから、mRNA 送達により VEGF を分泌する移植可能な肝・心筋細胞シートを作製できることがわかった。さらにこれらを積層化することによって、内皮細胞による毛細血管様構造を有する機能的な三次元組織構築への応用が期待できる。

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 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16件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

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 秋山義勝, KWON Hyo Kyoung, 原口裕次, 坂口勝久, 大和雅之, LEE Hyukjin, 清水達也
2. 発表標題 IVT-mRNAを利用した成長因子を分泌する細胞シートの作製の検討
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 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 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 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 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

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
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 長瀬健一, 白木 義基, 小林純, Lee Hyukjin, 大和雅之, 金澤秀子
2. 発表標題 血管内皮細胞網形成のためのVEGF mRNA送達積層化細胞シート組織の作製
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林純, Hyukjin Lee, 大和雅之, 岡野光夫
2. 発表標題 肝細胞シート組織の機能維持と生体移植のためのバイオマテリアル
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Kobayashi, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano
2. 発表標題 Temperature-dependent binding of growth factors and cells to a heparin-immobilized thermoresponsive surface
3. 学会等名 Society For Biomaterials 2019 Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林純, Hyukjin Lee, 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核酸送達
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白木義基, 小林純, Hyukjin Lee, 大和雅之, 長瀬健一, 金澤秀子
2. 発表標題 三次元細胞シート組織内血管網様構造の構築を目指したVEGF mRNAの送達
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山義勝, Hyo Kyoung Kwon, 原口裕次, 大和雅之, Hyukjin Lee, 清水達也
2. 発表標題 iVT-mRNAを利用した目的の成長因子を分泌する細胞シート作製の検討
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林純, Hyukjin Lee, 大和雅之, 岡野光夫
2. 発表標題 肝細胞シート組織からの血管新生因子分泌を誘導するための核酸送達
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Kobayashi, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano
2. 発表標題 Temperature-dependent affinity binding of heparin-binding growth factors and cells with a heparin-immobilized thermoresponsive surface
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018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	秋山 義勝 (Akiyama Yoshikatsu) (20349640)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	
研究分担者	増田 信奈子 (Masuda Shinako) (30342851)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	
研究分担者	中山 正道 (Nakayama Masamichi) (00338980)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	
研究分担者	辰巳 公平 (Kohei Tatsumi) (70555432)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	
研究分担者	山岡 哲二 (Tetsuji Yamaoka) (50243126)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	長瀬 健一 (Kenichi Nagase) (10439838)	慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・准教授 (32612)	

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