

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01317

研究課題名(和文) 高機能な培養肝細胞シート組織作製のための次世代型温度応答性培養システムの設計

研究課題名(英文) Design of a next generation thermoresponsive culture system for creating functional cultured hepatic 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝特異的機能を維持したまま、移植可能な肝細胞シート組織を作製するために、生体内環境を模倣した温度応答性培養システムを構築した。具体的には、増殖因子などの基底膜成分をヘパリン固定化温度応答性培養表面上に導入し、肝細胞機能を維持したまま移植可能な肝細胞シートを作製することができた。また、細胞の受容体/増殖因子/ヘパリン修飾温度応答性表面の間に働く温度変化したアフィニティーを定量的に評価することができた。柔軟な基材やマイクロ流体デバイスと組み合わせることによって、より高度な肝細胞シート組織培養システムの構築が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to prepare transplantable hepatocyte sheets with maintaining hepatic functions, a thermoresponsive culture system mimicking biological environments was designed. Transplantable hepatocyte sheets could be prepared while maintaining hepatic functions on a heparin-immobilized thermoresponsive surface containing a component of basement membrane such as growth factors. It was also possible to quantitatively evaluate the temperature-dependent affinity between cellular receptor/growth factor/the heparin-immobilized thermoresponsive surfaces. By using flexible basal substrate and microfluidic devices, more advanced hepatocyte sheet tissue culture system would be constructed.

研究分野：生体材料

キーワード：生体材料 再生医療 組織工学 温度応答性高分子 ヘパリン

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトの組織・臓器を細胞から再生する試みが世界的に注目されている。我々の研究所では、生体組織があたかもシートを積層したような構造であることに着目し、細胞シートの積層化によって組織構造を再構築する細胞シート工学に取り組んでいる。温度応答性高分子のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) を 20 ナノメートルの厚みで均一に固定した温度応答性培養皿上で細胞を単層になるまで培養した後、温度を 20°C に低下すると、PIPAAm が水和して細胞底面の細胞外マトリックスと培養皿表面との相互作用が減少し、シート状の細胞組織を回収することができる。この細胞シート貼付による移植法により、欧州での角膜上皮再生の治験、日本での筋芽細胞シートによる心疾患治療の治験、食道再生でもヒト臨床应用到、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。

上記の細胞シート貼付のみならず、臓器不全代替のための肝臓・膵臓・心臓組織構築にも取り組んでいる。特に肝臓再生は、血友病など肝疾患の治療法として期待が寄せられており、細胞シート工学による肝臓構築はきわめて有効である。我々の研究室では、マウス皮下移植した肝細胞シートが効率的に生着し、長期にわたり肝特異的機能を発揮することをあきらかにした (K. Ohashi, *et al.*, *Nat. Med.*, **13**, 880 (2007))。一方、細胞シートではないが、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から誘導した肝臓原基を生体移植すると、血管網を持つ機能的な肝臓に成長し、治療効果を発揮することが最近報告された (T. Takebe, *et al.*, *Nature*, **499**, 481 (2013))。いずれの場合も、移植肝臓が生体内環境に適応化し、ホスト血管網と接続し、肝機能を発揮しているといえる。ところが、生体内環境と違い、生体外での培養肝細胞は、アルブミン産生能などの肝特異的機能が著しく低下する (K. Kim *et al.*, *Biomaterials*, **32**, 1406 (2012))。これは、生体内環境と培養環境との著しいギャップが存在するためである。

高度な臓器形成・再生を達成するためには、生体内環境の特徴を理解し、それを生体外で再構成するための技術開発が必要となる。通常の細胞培養環境で欠けているのは、毛細血管など灌流可能な構造体、細胞外マトリックスや基底膜、柔軟な細胞周囲環境などである。これまでの研究で、培養肝細胞の機能維持・向上を目的とした様々な細胞培養システムが提案されてきた。Bhatia らは、フォトリソグラフィ的手法を利用して、同一培養表面上に肝細胞と線維芽細胞をマイクロパターン状に近接、共培養することにより、肝細胞のアルブミン産生能が亢進することをあきらかにした (S.N. Bhatia *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 378 (1998))。我々の研究所は、肝細胞シートと内皮細胞シートを積層化することで同様の効果を得た (K. Kim *et al.*,

Biomaterials, **32**, 1406 (2012))。これらの結果は、主にパラクリン効果によって肝機能が亢進したものと考えられる。また、培養基材表面組成と弾性率の効果もきわめて重要であり、例えば基底膜成分を豊富に含むマトリゲル上で、より柔軟なマトリゲルだと肝細胞機能が亢進する (E.J. Semler *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **69**, 359 (2000))。以上のことから、生体内に近い環境を細胞培養システムで模倣することで、肝細胞シート機能の低下を回避しようという着想に至った。

2. 研究の目的

高度な臓器形成・再生を達成するためには、生体内環境の特徴を理解し、それを生体外で再構成するための技術開発が必要となる。本研究は、生体肝環境 (具体的には基底膜成分、弾性率、灌流状態) を模倣した温度応答性培養システムを構築することで、*in vitro* での肝細胞シート機能を維持し、さらに移植可能な肝細胞シート組織の作製を目的とする。本研究を通じて、肝細胞シート組織を利用した診断・治療法を確立すると同時に、高度な体内環境の特徴を理解し、生体外で細胞から組織・臓器を再構築する原理の解明に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 基底膜を模倣した温度応答性培養表面の開発

基底膜の主要成分であるプロテオグリカンのヘパラン硫酸鎖は、種々の増殖因子や接着タンパク質などと特異的に結合し、これら分子の空間配置や機能を調節することが知られている。そこで、ヘパラン硫酸の一種であるヘパリンを温度応答性表面に導入し、基底膜成分を保持した温度応答性培養表面を開発する。既に我々は、ヘパリン固定化温度応答性表面上で、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) やヘパリン結合性上皮細胞増殖因子様増殖因子 (HB-EGF) の活性維持に成功している。ここでは、ヘパリン固定化温度応答性培養表面上での肝細胞シート機能維持に適した最適条件を模索する。

(2) 柔軟な温度応答性培養表面を用いた細胞シート作製

ポリスチレン製培養基材 (弾性率 約 3 GPa) に比べて、実際の生体の組織・臓器は著しく柔らかい (例えば肝臓の場合、弾性率 約 6 kPa)。既に、ポリスチレンよりも柔軟な培養基材上でアルブミン産生能など肝細胞の機能亢進することがわかっている (A.A. Chen *et al.*, *Biomaterials*, **30**, 1113 (2009))。そこで、ポリジメチルシロキサン (PDMS) など柔軟な基材上に温度応答性培養表面を調製し、生体内環境と近い環境で細胞培養を行い、細胞シートを作製する。

(3) マイクロ流体デバイスを用いた肝細胞シート培養システム

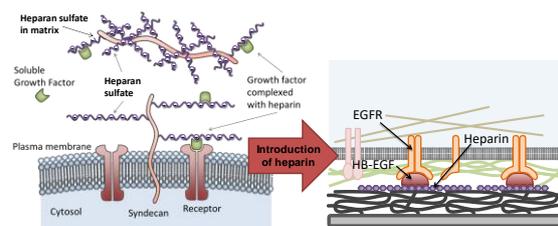
上記(1)と(2)を用いて作製した肝細胞シ-

ト組織の長期培養および機能解析を目的として、灌流可能なマイクロ流体デバイスを作製する。具体的には、本研究室で独自に開発した、マスクレス露光装置を利用したフォトリソグラフィにより、ネガ型フォトレジストのマイクロ流路鋳型を作製したのち、PDMS を熱硬化してマイクロ流体デバイスを作製した。さらに、マイクロ流路内に蛍光標識ポリスチレン製ビーズを分散させた溶液を送液し、蛍光顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

(1) 基底膜を模倣した温度応答性培養表面の開発

カルボキシル基を有する温度応答性表面のポリスチレン製培養皿にヘパリン分子を共有結合させ、ヘパリン修飾温度応答性培養表面を調製した。調製したヘパリン修飾温度応答性培養表面にアフィニティーにより HB-EGF を導入したのち (図 1)、ラット初代肝細胞シートの培養およびその機能評価を行った。HB-EGF が培地中に含まれない場合、肝細胞は機能維持できず培養時間の経過とともに肝細胞の接着細胞数が減少した。一方、HB-EGF 結合ヘパリン修飾温度応答性培養表面を用いた場合、培養 4 日間、播種したほぼすべての肝細胞の接着が維持された。また、温度を 20°C に低下することにより、フィブロネクチンと HB-EGF を保持したまま肝細胞シートを回収することができた。さらに、HB-EGF 結合ヘパリン修飾温度応答性培養表面上で培養した肝細胞のアルブミン産生能は、HB-EGF 培地添加に比べて約 2 倍であった。このことから、基底膜成分として HB-EGF を導入したヘパリン修飾温度応答性表面は、肝細胞シートの機能維持と同時に、温度低下による肝細胞シート脱着を可能とすることが



わかった。

図 1. 基底膜を模倣したヘパリン修飾温度応答性培養表面の設計。

ヘパリン修飾温度応答性培養表面の温度に応答した特性解析を行うために、ヘパリン修飾温度応答性表面と HB-EGF の間のアフィニティーを定量した。まず、Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring System (QCM-D) 法でタンパク質吸着を観察するために、ポリスチレン製温度応答性培養皿と同様の表面組成を QCM-D センサーチップ上に構築し、温度変化に応答したタンパク質吸着のモニタリングを行った。具体的には、

QCM-D センサーチップの金表面上にポリスチレン溶液をスピンコーティングし、約 130 nm の薄膜を形成した。さらに、電子線照射法によって温度応答性高分子の表面グラフトおよびヘパリン修飾を行い、ヘパリン修飾温度応答性表面を調製した。QCM-D 法を用いて HB-EGF 吸着を観察したところ、20°C および 37°C の際の吸着量はほとんど変わらず、温度変化の影響は小さいことがわかった (図 2)。

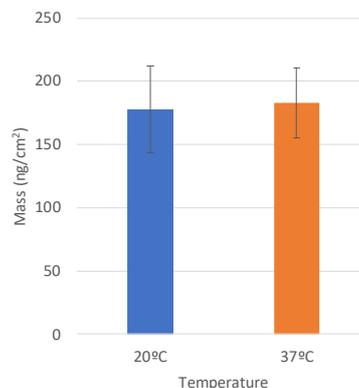


図 2. QCM-D 法で測定した HB-EGF (440 ng/mL) の吸着量。

さらに、HB-EGF/固定化ヘパリン間のアフィニティー能を評価するために、ELISA 法による 50%効果濃度 (EC₅₀) の測定を行った。温度を変化したときの EC₅₀ はそれぞれ 3.6 nM (20°C)、2.1 nM (37°C) であり、温度変化が EC₅₀ に与える影響は小さいことがわかった。ヘパリン修飾温度応答性表面が 20°C のとき温度応答性高分子鎖は膨潤し、37°C のときは収縮していると考えられる。QCM-D 法および ELISA 法による測定結果より、温度応答性高分子鎖の膨潤/収縮は HB-EGF-固定化ヘパリン鎖間のアフィニティーにほとんど影響を与えないことを示唆する。よって、温度応答性高分子鎖の膨潤/収縮に関わらず、HB-EGF は立体障害をほとんど受けずに温度応答性高分子鎖内部に拡散したと考えられる。

さらに、HB-EGF 固定化ヘパリン修飾温度応答性表面と EGF 受容体間のアフィニティーを解析するために、温度を変えたときのラット肝細胞接着率を可溶 EGF 存在下で評価した。20°C のとき肝細胞は HB-EGF 固定化表面にほとんど接着しないのに対し、37°C になると、接着率約 6% の弱い初期接着を示すことがわかった (図 3)。さらに、可溶 EGF 濃度の増加とともに細胞接着率が低下した (図 4)。これは、37°C では固定化 HB-EGF と肝細胞 EGF 受容体とのアフィニティーが働くことを示唆している。さらに、低温時の温度応答性高分子鎖の水和・膨潤に伴う立体障害増加の影響で、細胞との相互作用が減弱することがわかった。

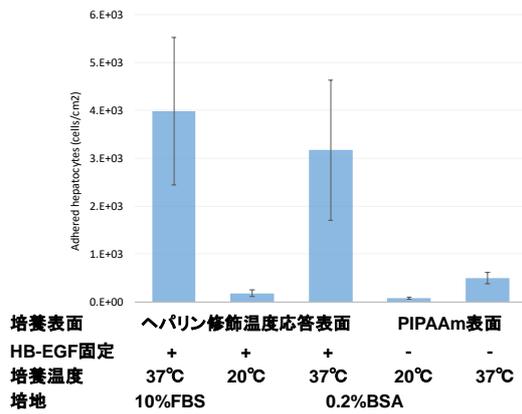


図3. HB-EGF 固定ヘパリン修飾温度応答性表面に対する肝細胞初期接着 (1.5h).

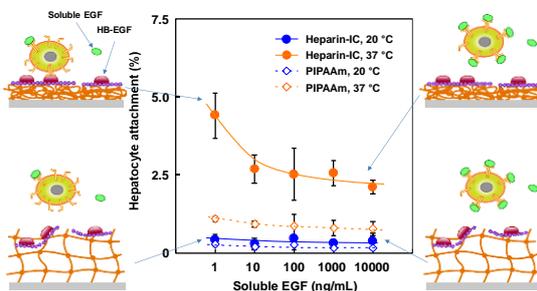


図4. 溶解EGF添加による肝細胞接着阻害.

(2) 柔軟な温度応答性培養表面を用いた細胞シート作製

柔軟な温度応答性培養表面を作製するために、PDMS上に電子線照射法によって PIPAAm を表面固定化する方法を用いた。シランカップリング剤による前処理を行い、PIPAAm 固定化の最適条件を検討したところ、培養温度の 37°C における培養細胞の接着性を維持するとともに、温度を 20°C に低下させた際、培養細胞が脱着する条件を見出すことができた。一方、PDMS を用いた肝細胞培養と肝特異的機能測定 (アルブミン産生能) および免疫学的組織染色を行ったところ、PDMS に対する肝細胞接着性が低く、肝特異的マーカーである E-カドヘリンが検出されなかった。

細胞接着性を有する柔軟な温度応答性培養基材を作製するために、PDMS 等のプラスチック製基材表面に共有結合で固定可能な、光反応性温度応答性高分子を作製した。具体的には、可視光反応性のカンファーキノン を側鎖に有する温度応答性高分子を合成した。光反応性温度応答性高分子をコーティングしたプラスチック基材に可視光を照射すると、励起状態になったカンファーキノンが近傍の炭化水素から水素引き抜きすることでラジカルを発生し、架橋反応およびプラスチック基材への共有結合形成による固定化が起こる。本手法を用いることで、柔軟な PDMS 表面上に任意量の温度応答性高分子層を形成することができ、培養肝細胞の機能を維持

したまま、温度低下のみによる肝細胞シート回収への応用が期待される。

(3) マイクロ流体デバイスを用いた肝細胞シート培養システム

本研究室で独自に開発した、マスクレス露光装置を利用したフォトリソグラフィーにより PDMS 製マイクロ流体デバイスを作製した。流路内に蛍光標識ポリスチレン製ビーズを含む溶液を送液したところ、層流状態で流動していることを確認した (図5)。流体デバイス内部に肝細胞シート組織を留置し、培地を灌流することで、持続的に栄養成分および酸素を供給、老廃物を除去することが可能となり、肝細胞機能を維持した *in vitro* 肝細胞シート組織培養システムとして応用できる。

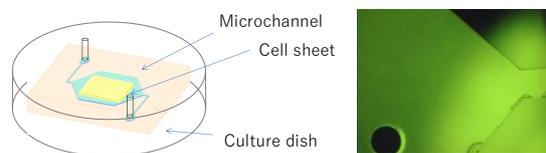


図5. マイクロ流体デバイスを用いた肝細胞シート培養システム (左) と流体デバイス内に蛍光標識ポリスチレン製ビーズを流した際の蛍光顕微鏡像 (右).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- (1) Jun Kobayashi*, Yoshinori Arisaka, Nobuhiko Yui, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, “Effect of temperature changes on serum protein adsorption on thermoresponsive cell-culture surfaces monitored by a quartz crystal microbalance with dissipation”, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(5), 1516 (2018). doi:10.3390/ijms19051516 (査読有)
- (2) Jun Kobayashi*, Masayuki Yamato, Teruo Okano*, “On-off affinity binding modulation on thermoresponsive polymer-grafted surfaces for capture and release of proteins and cells”, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **28**(10-12), 939-957 (2017). doi:10.1080/09205063.2017.1295508 (査読有)
- (3) Yoshinori Arisaka, Jun Kobayashi*, Kazuo Ohashi, Kohei Tatsumi, Kyungsook Kim, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano*, “A heparin-modified thermoresponsive surface with heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor for maintaining hepatic functions *in vitro* and harvesting

hepatocyte sheets”, *Regen. Ther.*, **3**, 97-106 (2016). doi:10.1016/j.reth.2016.03.003 (査読有)

* corresponding authors

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 小林純, 秋山義勝, 大和雅之, 岡野光夫, “細胞増殖因子固定化温度応答性培養表面と細胞の相互作用”, 第 17 回日本再生医療学会総会 (横浜), 2018 年 3 月
- (2) 小林純, 秋山義勝, 大和雅之, 岡野光夫, “ヘパリン修飾温度応答性表面と増殖因子および細胞とのアフィニティー結合制御”, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 (東京), 2017 年 11 月
- (3) 小林純, 秋山義勝, 大和雅之, 岡野光夫, “肝細胞シート培養および脱着のためのヘパリン修飾温度応答性培養表面とのアフィニティー結合制御”, 第 66 回高分子討論会 (松山), 2017 年 9 月
- (4) Jun Kobayashi, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, “Heparin-immobilized thermoresponsive cell culture surfaces for sustained stimulation of heparin-binding EGF and recovery of cultured cell sheets by lowering temperature”, 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (Athens, Greece), 2017 年 9 月
- (5) 小林純, 秋山義勝, 大和雅之, 岡野光夫, “肝細胞シート組織作製のためのヘパリン修飾温度応答性培養表面の設計”, 第 55 回日本人工臓器学会大会 (東京), 2017 年 9 月
- (6) Jun Kobayashi, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, “Temperature-controlled capture and release of heparin-binding proteins and cells on heparin-immobilized thermoresponsive cell culture substrates”, Society For Biomaterials 2017 Annual Meeting and Exposition (Minneapolis, USA), 2017 年 4 月
- (7) Jun Kobayashi, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, “Heparin-immobilized thermoresponsive cell culture surface for sustained growth factor stimulation and cell sheet recovery”, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (Tokyo), 2016 年 11 月
- (8) Jun Kobayashi, “Mimicking ECM nanostructure on thermoresponsive cell culture surfaces for creating functional cellular tissues”, 2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (Tsukuba), 2016 年 7 月 (招待講演)
- (9) 小林純, 秋山義勝, 大和雅之, 岡野光夫, “ヘパリン修飾温度応答性表面と固定化増殖因子で作製した培養肝細胞シート”, 第 45 回医用高分子シンポジウム (東京), 2016 年 7 月
- (10) Jun Kobayashi, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, “Switching of growth factor binding on heparin-functionalized thermoresponsive surface for hepatocyte sheet manipulation with maintenance of hepatic functions”, 10th World Biomaterials Congress (Montreal, Canada), 2016 年 5 月

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

秋山 義勝 (AKIYAMA, Yoshikatsu)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20349640