

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06922

研究課題名（和文）界面活性剤フリーなスキャフォールド作成手法の開発

研究課題名（英文）Development of surfactant-free scaffold creation method

研究代表者

神田 英輝（Kanda, Hideki）

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：90371624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：界面活性剤を一切使わずにブタ組織を脱細胞化するため、数mm～数cmにカットしたブタ組織に25℃・0.59Mpaに加圧して液化DMEを流通させ、抽出カラムの内部で液化DMEによってブタ組織の細胞膜を構成するリン脂質が抽出した後、DNA分解酵素であるDNaseを1～7日間接触させて組織内部のDNAを断片化した。残留した細胞核のHE染色による顕微鏡観察とDNAの定量分析を行った。

本手法でブタ大動脈の脱細胞化に成功した。またブタ脳については脱細胞化できる可能性が示された。ブタ皮膚と軟骨については従来技術と同程度の残留DNA量であり、液化DMEを界面活性剤の代わりに用いる手法の妥当性を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、万能細胞を立体的に培養するためのスキャフォールドが注目されている。従来はブタ組織から界面活性剤によってリン脂質を除去した後、DNaseによるDNAの断片化を行い、断片化したDNAを除去する工程が主流であるが、有毒な界面活性剤が細胞外マトリックスに残留して万能細胞の培養に支障がでる問題があった。界面活性剤の代わりに液化ジメチルエーテルを用いる本手法の研究成果によって、ブタ大動脈については界面活性剤を全く用いることなくスキャフォールドを作成でき、また皮膚や軟骨や脳についても従来技術と同程度にはDNA除去が可能であることから、界面活性剤の残留の恐れがないスキャフォールド作成に大きく前進した。

研究成果の概要（英文）：To decellularize porcine tissue without using any surfactant, pressurize liquefied DME was supplied to the porcine tissue cut into several mm to several cm at 25 °C and 0.59 MPa. After the extraction of phospholipids from cell membrane of the porcine tissue, DNA degrading by DNase was contacted for 1 to 7 days to fragment the DNA inside the tissue. The remaining cell nuclei were microscopically observed after HE staining and the DNA residual amount was quantitatively analyzed.

The method successfully decellularized the porcine aorta. It was also shown that pig brain could be decellularized. For pig skin and cartilage, the amount of residual DNA was similar to that of the conventional technique, and the validity of the method using liquefied DME instead of the surfactant was confirmed.

研究分野：マテリアル工学

キーワード：スキャフォールド 脱細胞化 抽出 ジメチルエーテル バイオマテリアル 亜臨界流体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、万能細胞を立体的に培養して生体組織を作る試みが注目されている。細胞を立体的に培養するためには、ブタ組織から DNA を抽出・除去(脱細胞化)した残渣(細胞外マトリックス)や、3D プリンタを用いた高分子製の細胞外マトリックス模擬材料が、立体培養の足場であるスキャホールドとして必要となる。このうち高分子製の場合は、万能細胞の分化において適切な分化の誘導がされなかったり、血圧に耐える強度が得られなかったりする問題があった。また、ブタ組織の脱細胞化では、界面活性剤によってリン脂質を除去した後に、DNase による DNA の断片化を行い、水とエタノールによって断片化した DNA を除去する工程が主流であるが、有毒な界面活性剤が細胞外マトリックスに残留して万能細胞の培養に支障がでる問題があった。また、適用可能なのは大動脈くらいで、需要が大きい皮膚や軟骨や脳といった部位に関しては残存する DNA 量や鎖長が基準を満たさない問題もあった。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が世界に先駆けて植物からの油脂抽出の溶媒として有効性を見いだした「液化ジメチルエーテル(DME)」を、動物であるブタ組織に応用してリン脂質を除去することによって、界面活性剤を一切使わずにブタ組織を脱細胞化することを目指した。DME は標準沸点が -24.8 であり、常温ではブタ組織に残留しない。また、水やリン脂質や中性脂質も良好に溶解する特徴がある。欧米では食品加工の溶媒や噴射剤としても利用が進んでおり生体への毒性も低い。また他のエーテル類とは異なり過酸化物を作らず、自然酸化の度合いも LPG と同程度であることから、利用に際して特別なハンドリングが不要な物質でもある。本研究では、ブタ大動脈の他に、皮膚や軟骨や脳といった従来技術でも脱細胞化が困難な組織も対象とした。

### 3. 研究の方法

液化 DME を充填した容器、送液ポンプ、抽出カラム、減圧バルブ、リン脂質の回収容器が直列に繋がった装置を作成して、数 mm ~ 数 cm にカットしたブタ大動脈・軟骨・脳組織を抽出カラムに充填した。25 · 0.59Mpa に加圧して液化状態にした DME を、液化 DME を充填した容器から抽出カラムに流速 10 ml/min で 45 ~ 60 分間流通させた。抽出カラムの内部で液化 DME によってブタ組織から細胞膜を構成するリン脂質が抽出された。その後、液化 DME と油脂と水の混合物が回収容器に導入された。液化 DME の標準沸点は -24.8 なので、減圧バルブを開放し、回収容器の内部を常圧に減圧すると液化 DME は蒸発してリン脂質などの油脂と水を得た。

この抽出操作の後にブタ組織の残渣に、DNA 分解酵素である DNase を 1 ~ 7 日間接触させて組織内部の DNA を断片化した。その後 80%エタノールや水で 3 日間洗浄した後に、残留した細胞核の顕微鏡観察と DNA の定量分析を行った。大動脈に関しては、電気泳動による DNA 断片鎖長の測定も実施した。

顕微鏡観察では Hematoxylin-Eosin(HE)染色を採用した。HE 染色は、ヘマトキシリンとエオジンの二種の色素により、細胞核と細胞外マトリックスをそれぞれ異なる色彩に染色する。ヘマトキシリンは青紫色の色素であり、リン酸基、カルボキシル基を多く含む細胞核と結合する。エオジンは赤色の色素であり負に帯電しているため、正に帯電している細胞外マトリックスやタンパク質と結合して染色する。この染色の後、薄片へとスライスして顕微鏡観察を行った。

ブタ組織内の DNA 残存量を微量分光光度計 (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) により吸収波長 230 ~ 280nm のピーク強度から決定した。前準備として、ブタ組織 10 mg をマイクロチューブに計り取り、0.01 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 0.5%SDS に、タンパク質分解酵素プロテナーゼ K を混合した溶液 200 $\mu$ L を加えて、ブタ組織が溶けるまで 1 日間静置した。ブタ組織が溶液に溶けたのち、TE 飽和フェノール 500  $\mu$ L を加えて十分に転倒混和させ、冷蔵庫で 5 分間冷却した。冷却後に遠心分離(12000 rpm, 10 min)を行い、上清 400  $\mu$ L をマイクロチューブに回収し、その上清に TE 飽和フェノール 250  $\mu$ L、クロロホルム 250  $\mu$ L を加え十分に転倒混和させた。その後冷蔵庫で 5 分間冷却し、遠心分離(12000 rpm, 10 min)を行い、先と同様上清 250  $\mu$ L をマイクロチューブに回収し、クロロホルム 500  $\mu$ L 加え十分に転倒混和させた。その後冷蔵庫で 5 分間冷却し、遠心分離(12000 rpm, 10 min)を行い、上清 100  $\mu$ L を回収し、5 M NaCl 50  $\mu$ L, 100 %エタノール 800  $\mu$ L を加えて軽く転倒混和させた。30 分間-20 で保存した後、遠心分離(12000 rpm, 18 min)をおこないデカンテーションで上清を除去した。そして 70 %エタノール 500  $\mu$ L を加え冷蔵庫で 5 分間冷却した。最後に遠心分離(12000 rpm, 14 min)をおこないデカンテーションで上清を除去した後、TE Buffer 100 $\mu$ L を加えて微量分光光度計による DNA 定量測定に供した。

### 4. 研究成果

大動脈の場合、液化 DME を 45 分流通したところ、サンプル乾燥重量あたり 1.65 重量%の油脂を抽出できた。液化 DME による脂質抽出後(酵素処理は未実施)では残存 DNA 量は 2070ng/mg-dry であり、一般的なスキャホールドの基準値である 50ng/mg-dry を大幅に上回った。また、抽出残渣をタンパク質分解酵素で分解して、電気泳動測定に供したところ、液化 DME との接触段階で DNA が断片化されていたことが判明した。ヘッドスペース GC-FID ならびに GC-MS で、水で洗浄した抽出残渣からは残留 DME は検出されなくなった。液化 DME 抽出処

理の後、3日間のDNaseによるDNA断片化処理を施した結果、スキャホールド内の残存DNAは32ng/mg-dryとなりDNA残留基準を下回り、HE染色でも細胞核は視認できなかった。7日間のDNase処理の後には2ng/mg-dryとなりほぼ完全にDNAが除去された。これにより界面活性剤を用いないスキャホールドの作成に成功した。

同様にブタ皮膚に液化DMEを60分間流通させて細胞膜のリン脂質を除去した場合、スキャホールドの中のDNA残存量は、DMEによる脂質抽出後(DNase処理は未実施)では1622ng/mgであり、一般的なスキャホールドの目標値である50ng/mg-dryを上回った。また、HE染色でもDNAの残留が視認された。ブタ皮膚スキャホールドを減圧雰囲気下において蒸留水で洗浄して凍結乾燥させたところ、残留DMEは水で容易に抽出・除去されて、GC-FIDやGC-MSで検出不可能になった。5日間のDNase処理(7日間もほぼ同様)によって残存DNAは72ng/mgとなり目標値に近くなった。目標値までもう一步のところまでDNA残留量を低減できたことから、手法はブタ軟骨に対しても基本的な研究の方向性は正しいとの確信が得られたが、まだ改良が必要であることも判明した。残留DME量を更に低減させるには、液化DMEによる抽出処理時間を長くしたり、超臨界流体を液化DMEに混合してDME分子のブタ軟骨内への拡散性を向上させたりするなどの改良が必要だと考えられる。

同様にブタ軟骨に液化DMEを60分間流通させて細胞膜のリン脂質を除去した場合、スキャホールドの中のDNA残存量は、DMEによる脂質抽出後(DNase処理は未実施)では1305ng/mgであり、一般的なスキャホールドの目標値である50ng/mg-dryを上回った。また、HE染色では、軟骨の外表面つまり皮膚組織との境界から深さ100 $\mu$ mの部分のみ細胞核の除去が確認され、それより深い部分ではDNAの残留が視認された。ブタ軟骨スキャホールドを減圧雰囲気下において蒸留水で洗浄して凍結乾燥させたところ、残留DMEは水で容易に抽出・除去されて、GC-FIDやGC-MSで検出不可能になった。7日間のDNase処理によって残存DNAは456ng/mgとなり、大動脈や皮膚と比べて明らかに残留DNA量は増大した。この傾向は、従来の界面活性剤を用いた手法でも同様であることから、液化DMEは界面活性剤の代わりとして機能するものの、DNAの除去性能については従来の界面活性剤を用いる手法と同等であることも判明した。

最後に脳についても同様の手順で脱細胞化を試みた。脳には他の臓器とは異なり意識や記憶や人格の移植という倫理問題を有している。また、こうした倫理問題を抜きにしても脳死の場合にはそもそも物理的に移植に適さない問題もある。このた、他の臓器のような生体間移植や脳死移植は不可能であり、自身の培養細胞から作成した脳組織に対する潜在的ニーズが高いと考えられる。しかし、脳組織は油脂の含有率が他の臓器よりも高いことから、従来技術でも脱細胞化が困難な部位である。ブタ脳に液化DMEを60分間流通させて細胞膜のリン脂質を除去するとともに、7日間のDNase処理によってDNA除去を試みた後に、HE染色を行ったところ、脳組織には細胞核の残留が認められないサンプルや、残留が認められたサンプルの双方があった。このことから、脳組織に対しては本手法が有効である可能性が残されるに過ぎない状態であり、現在は実験結果のバラツキの原因の解明と、DNA残留量の定量分析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平手 快斗、山本 直将、篠原 悟史、鈴木 章悟、鄭 慶新、Wahyudiono、神田 英輝、後藤 元信
2. 発表標題 液化ジメチルエーテルを用いたブタ真皮の脱細胞化
3. 学会等名 化学工学会 第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平手 快斗、山本 直将、篠原 悟史、鈴木 章悟、鄭 慶新、Wahyudiono、神田 英輝、後藤 元信
2. 発表標題 液化ジメチルエーテルを用いたブタ真皮の脱細胞化
3. 学会等名 第49回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田英輝
2. 発表標題 液化ジメチルエーテルを用いるブタ大動脈からのスカフォールド作成
3. 学会等名 化学工学会 第50回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sayaka Fujimori, Satoshi Shinohara, Shogo Suzuki, Masaki Ogawa, Rintaro Hoshino, Wahyudiono, Hideki Kanda, Motonobu Goto
2. 発表標題 Preparation of Biologic Scaffolds by Liquefied Dimethyl Ether
3. 学会等名 The 10th International Conference on Supercritical Fluids (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神田 英輝、篠原 悟史、鈴木 章悟、小川 真輝、星野 倫太郎、Wahyudiono、後藤 元信
2. 発表標題 液化ジメチルエーテルを用いるスキャフォールドの作成手法
3. 学会等名 分離技術会年会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木 章悟・篠原 悟史・鳥井 昭吾・神田 英輝・後藤 元信・中村 奈緒子・木村 剛・岸田 晶夫
2. 発表標題 液化ジメチルエーテルを用いた生体材料創製
3. 学会等名 化学工学会 第49回秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤森さやか・篠原悟史・鈴木章悟・小川真輝・星野倫太郎・Wahyudiono・神田英輝・後藤元信
2. 発表標題 化ジメチルエーテルを用いたスキャホールドの作製
3. 学会等名 第48回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 動植物組織、動植物組織の細胞破壊方法及び動植物組織の細胞破壊装置	発明者 篠原悟史、鈴木章 吾、神田英輝	権利者 リコー、名古屋 大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-047362	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

