

補助事業番号 2020M-196

補助事業名 2020年度 超高静水圧処理による三次元脱細胞化素材の開発と肝臓・腎臓の
機能的再生医療の実用化 補助事業

補助事業者名 慶應義塾大学 理工学部 宮田昌悟

1 研究の概要

超高静水圧を用いた脱細胞化臓器材料の作製技術を実用化することを最終目標として、超高静水圧の繰り返し印加(パルス印加)による脱細胞化技術の開発を実現する。具体的には以下の項目を実施した。

(1) 耐圧容器に用いるシーリング材の複数アレイ化による超高静水圧のパルス印加の実現

生体外に摘出された臓器の超高静水圧処理では圧力に耐えうる処理容器が必須である。特に問題となるのはピストン摺動部のシーリングである。本事業では、シーリング基材を複数アレイ化することで耐圧能を高めた。

(2) 細胞分散液を対象として、超高静水圧のパルス印加が脱細胞化作用に与える影響の解明

開発された超高静水圧処理装置を用いて、細胞分散液を用いて細胞の分解・破砕処理に必要な静水圧のパルス処理条件を決定した。

(3) 細胞を包含するゲル材料を用いた生体模倣材料による実証試験

生体臓器の処理条件を検討する前段階として、生体組織を模倣した試料として皮膚由来細胞を包含するハイドロゲルを対象として実証試験を行った。

(4) ラット腎臓・肝臓組織を対象とした実証試験

小動物による実証試験としてラット腎臓組織を用いた実証試験を実施した。

2 研究の目的と背景

臓器から他者の細胞のみを除去する脱細胞化手法は生体に有害な薬液を用いる手法が主流であるが、もう一つの手法として超高静水圧環境下に臓器や生体組織を晒すことでも細胞のみを破壊・除去できる可能性がある。本事業では、機械工学的手法によって油圧駆動のシリンダを用いることで、臓器または生体組織に超高静水圧を繰り返し印加可能な、脱細胞化装置を開発することを目的とする。さらに、医療機関と連携してこれを用いた肝臓・腎臓の脱細胞化組織を再生医療支援基材として実用化することを最終目標としている。

3 研究内容

(1) 耐圧容器に用いるシーリング材の複数アレイ化による超高静水圧のパルス印加の実現

生体外に摘出された臓器に超高静水圧(200 MPa以上)のを印加すると、内部の細胞を死滅、除去することが可能となる。このような図1に示すような超高静水圧処理では、その圧力に耐えうる処理容器が必須である。シリンジ機構を用いた高静水圧処理で特に問題となるのは、処理液を高

圧にする際に押し込むピストン摺動部のシーリングである(図1b).

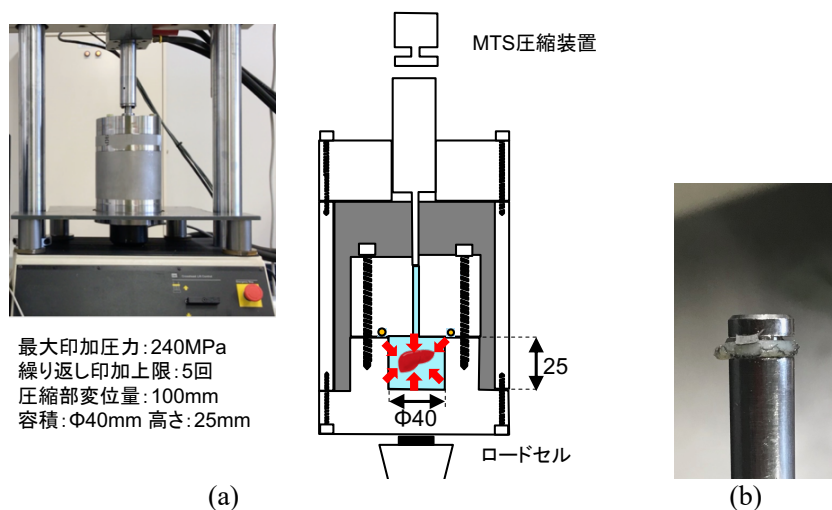


図1. (a) 汎用材料試験機を応用した超高静水圧処理を用いた脱細胞化装置および(b) ピストン摺動部.

通常のゴム材料からなるシーリング材(Oリング)の耐圧は、大きくても20 MPa程度で超高静水圧に耐えうるレベルにないのが現状である。事業実施者らの予備的検討では、同シーリング材を用いた場合、超高静水圧(200 MPa)の印加に一度は耐えるものの、断裂してしまい複数回のシーリング材としての活用は不可能であった。そこで本研究では、図2aに示すようにシーリング材を複数アレイ化することで、複数回の超高静水圧の印加(パルス印加)に耐えうる機構を開発した。リン酸緩衝生理食塩水を処理液として、稼働試験を行った結果を図2bに示す。この結果より、パルス数が10回の印加はシーリングに問題なく超高静水圧(250 MPa)の印加が実施できることが示された。

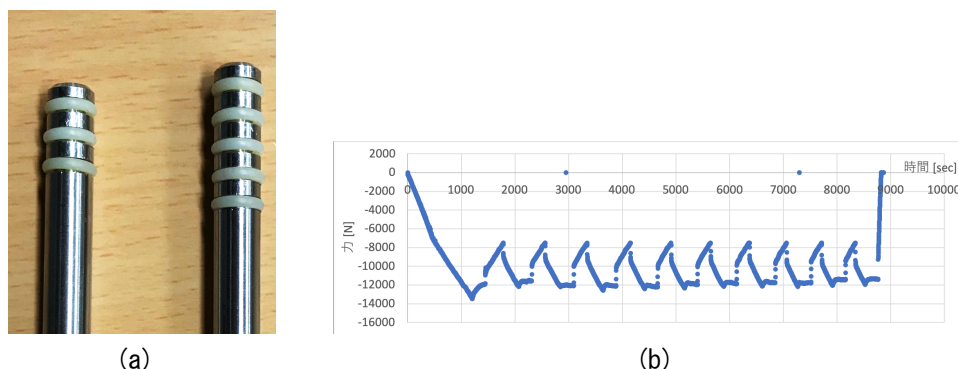


図2. 圧力印加部のシーリング材の多連化による超高静水圧処理のパルス印加。(a) シーリング材(Oリング)を多連化したピストン部、(b)多連化による超高静水圧のパルス印加(10回)の実施例.

(2)細胞分散液を対象として、超高静水圧のパルス印加が脱細胞化作用に与える影響の解明
臨床に近い形態を想定した形態としてヒト由来細胞を対象とした実験を行った。これにより、超高静水圧によって他家(他人)由来のヒト組織から細胞のみを除去するための基礎的知見を得ることができる。

具体的な実験としては、ヒト新生児皮膚由来の細胞(理化学研究所バイオリソース事業セルバンクから入手)の分散溶液に対して、超高静水圧を印加することで、高静水圧のパルス印加が脱細胞処理(細胞構造の破壊、細胞死の誘発)に与える影響について明らかにした。図3に示すように、パルス印加を行うことで、通常脱細胞化が難しい圧力が200 MPaにおいても単発の高静水圧印加より細胞数が低下していることから、脱細胞効果はパルス印加により向上すると考えられた。さらに処理後の細胞を顕微鏡で観察したところ、パルス印加した細胞群では、細胞内部から核が除去されている細胞が複数例見られた(図4)。この現象は“脱核”とよばれ、核が除去された細胞は生命活動を継続することが不可能となることから脱細胞化が促進していることが明らかとなった。走査型電子顕微鏡(SEM)による観察では、パルス印加を行うことで、細胞膜表面の陥没や損傷が生じることが認められ、パルス処理が細胞膜構造の変性・破壊においても優位に働くことが実証された(図5)。

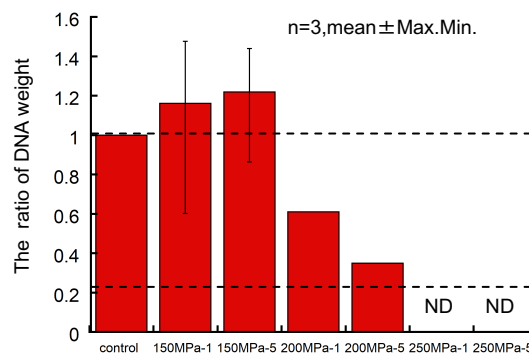


図3. 細胞懸濁液へのパルス型超高静水圧処理が脱細胞化に与える影響。

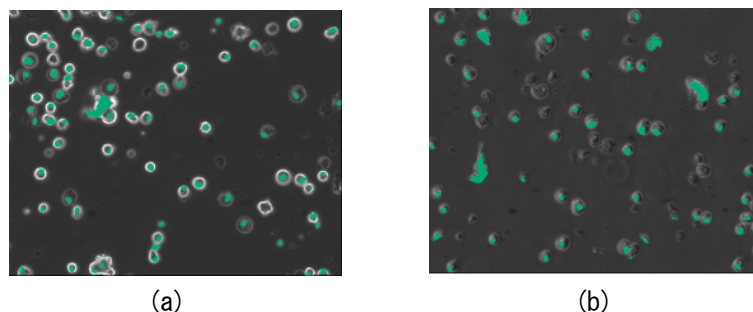


図4. 細胞懸濁液へのパルス型超高静水圧処理が脱核作用に与える影響。(a)未処理細胞および(b)高静水圧処理が施された細胞の核染色像(Hoechst染色)。

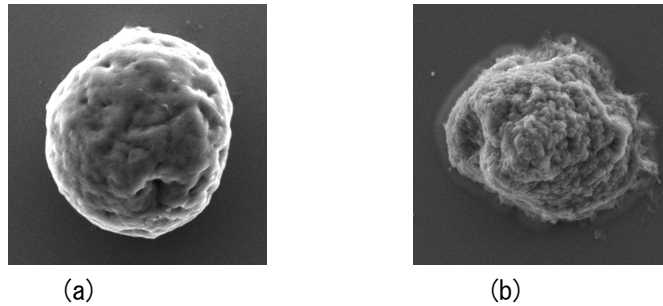


図5. (a) 超高静水圧 (200MPa) の単発処理後および(b)パルス処理後 (200 MPa, 5回) 後のSEM観察画像.

(3)細胞を包含するゲル材料を用いた生体模倣材料による実証試験

本研究課題で実用化を目指すパルス印加型の超高静水圧処理装置の実証試験には、実際に適用を想定する生体臓器での試験が必要不可欠である。しかしながら、生体臓器試料は個体差が大きく脱細胞効果を正確に検証するための試料には適していない。そこで本研究では、当初ラット腎臓組織を対象とした実証試験を想定していたが、より脱細胞効果の検証が詳細に実施可能となる細胞含有ハイドロゲルを試料として研究開発を実施した。

静水圧処理を施さなかった試料群では死細胞がゲル全体で認められなかったのに対し、それ以外の高静水圧を施した試料群では、ゲルの全域にわたって死細胞の存在が認められた。これは250 MPaの低レベルの高静水圧の印加であれば10 min程度の持続時間でも十分に細胞膜の変性すなわち脱細胞化において必須要件である細胞膜の破壊効果が見込めることを示すものである。これにより通常、脱細胞化で用いられる高静水圧である1000 MPaよりも十分に低い圧力帯である250 MPaの高静水圧においても、三次元組織の脱細胞化が可能であることが示された。

(4)ラット腎臓・肝臓組織を対象とした実証試験

(1)～(3)の試験結果をもとに生体外に摘出したラット腎臓組織に対するパルス型の高静水圧処理実験を実施した。腎臓組織の脱細胞効果を検証するためにヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ、細胞懸濁液、細胞含有ハイドロゲルと同様に高静水圧パルス型印加によって脱核が認められた。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本事業は、腎臓・肝臓の治療・再建を主対象とする脱細胞化素材の実用化を最終目標としている。今後、動物試験、前臨床試験、臨床試験を経ることで肝臓疾患だけでも国内で年間5～7万人に対して治療効果が望める。さらに、本事業の成果として実現される脱細胞化技術は多臓器へも容易に展開可能である。心臓弁、皮膚、血管、など脱細胞化素材が実用化されている臓器であっても、細胞生着率は決して高いとは言えない。本事業で提案した組織の微細構造が温存された脱細胞化素材の優位性が前臨床試験、臨床試験で示されれば、我々の提案する脱細胞化処理技術が現在の脱細胞化技術に置き換わるスタンダードとなることが期待される。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

研究代表者の専門である材料試験技術および細胞工学技術を、再生医療における細胞足場材料としての脱細胞化骨格の創製に応用した研究プロジェクトである。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

1. Zemmyo, Daiki, Masashi Yamamoto, and **Shogo Miyata**. 2020. "Fundamental Study of Decellularization Method Using Cyclic Application of High Hydrostatic Pressure" *Micromachines* 11, no. 11: 1008. <https://doi.org/10.3390/mi11111008>
2. Zemmyo, Daiki, Masashi Yamamoto, and **Shogo Miyata**. 2021. "Efficient Decellularization by Application of Moderate High Hydrostatic Pressure with Supercooling Pretreatment" *Micromachines* 12, no. 12: 1486. <https://doi.org/10.3390/mi12121486>

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

<http://www.miyata.mech.keio.ac.jp/JKA2022.pdf>

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし。

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 慶應義塾大学理工学部(ケイオウギジユクダイガクリコウガクブ)

住 所： 〒223-8522

神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1

担 当 者： 准教授 宮田 昌悟

E - m a i l: miyata@mech.keio.ac.jp

U R L: <http://www.miyata.mech.keio.ac.jp/>