

図 1. レゾビストとPVA-Gdを大腿部の筋肉中にインジェクションした後のMRI像  
PVA-Gd は日数の経過に従い薄れていき、最終的には5日目でなくなった。一方、  
レゾビストでは、測定した10日目まで存在を確認することができた。

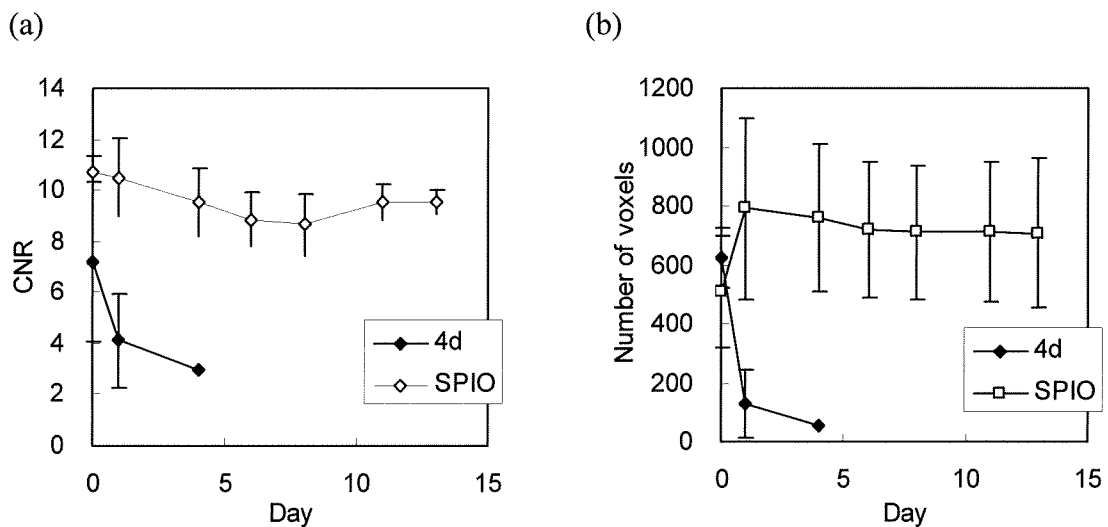


図 2. CNRとコントラストを有するボクセル数画像より算出した結果 (a) CNR (b) ボクセル数

PVA-Gdは4日目まで検出することができたが、それ以降は画像からは見られなかった。一方、レゾビストでは、測定した14日目まで存在を確認することができた。

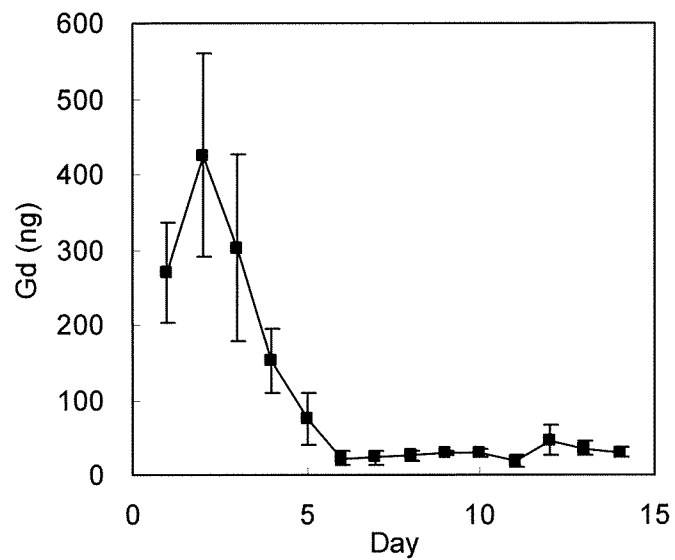


図 3. 尿中に含まれるガドリニウムの定量

主に1、2日目にガドリニウムの排泄が認められ、日数の経過と共に減少し、5日目にはほとんど排泄されなくなっていた。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名        | 書籍全体の編集者名 | 書籍名                       | 出版社名 | 出版地 | 出版年  | ページ   |
|------|----------------|-----------|---------------------------|------|-----|------|-------|
| 山岡哲二 | 再生医療用スキャホールドゲル |           | ゲルコントロールゲルの上手な作り方とゲル化の抑制— | 情報機構 | 東京  | 2009 | 63-70 |

## 雑誌

| 発表者氏名        | 論文タイトル名   | 発表誌名                              | 巻号    | ページ       | 出版年  |
|--------------|---|-----------------------------------|-------|-----------|------|
| A. Miskon    | Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate                                   | Tissue Engineering                | 15(3) | 345-353   | 2009 |
| A. Miskon    | Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components             | Journal of Artificial Organs      | 12    | 111-117   | 2009 |
| D. Ishii     | In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers   | Biomacromolecules                 | 10(2) | 237-242   | 2009 |
| T.Hashimoto  | Intracellular Enzyme-responsive Fragmentation of Nonviral Gene Carriers Leads to Polyplex Destabilization and Enhanced Transgene Expression | Chemistry Letters                 | 38(7) | 718-719   | 2009 |
| T. Hashimoto | Self-assemblies of enzymatically degradable amphiphilic oligopeptides as nonviral gene carrier  | Polymer Degradation and Stability | 94(9) | 1349-1353 | 2009 |

|                |   |                                      |          |           |      |
|----------------|---|--------------------------------------|----------|-----------|------|
| A. Mahara      | Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling   | Biotechnology Progress               | 26(2)    | 441-447   | 2010 |
| A. Miskon      | A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins.                                | Tissue Engineering                   | in press | —         | 2010 |
| A. Mahara      | Continuous separation of cells of high osteoblastic differentiation potential from mesenchymal stem cells on an antibody-immobilized column | Biomaterials                         | 31       | 4231-4237 | 2010 |
| T. Ehashi      | Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve                                 | J. Biomat. Sci. Pol. Ed.             | in press | —         | 2010 |
| Y. Tachibana   | Design and characterization of a polymeric MRI contrast agent based on PVA for in vivo living-cell tracking                                 | Contrast Media and Molecular Imaging | in press | —         | 2010 |
| Jeong-Hun Kang | Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier  | Bioorganic & Medicinal Chemistry     | 18       | 3946-3950 | 2010 |
| Koshino K      | Development of motion correction technique for cardiac <sup>15</sup> O-water PET study using an optical motion tracking system              | Ann Nucl Med                         | 24       | 1-11      | 2010 |
| Yamamoto A     | Use of clinical MRI scanner for pre-clinical research on rats   | Radiological Physics and Technology  | 2        | 13-21     | 2009 |
| Kudomi N       | A physiological model for recirculation of water correction in  | J Cereb Blood Flow Metab             | 29       | 355-64    | 2009 |
| 銭谷勉            | 小動物の高解像度SPECTイメージング   | Isotope News                         | —        | 7-9       | 2009 |

|            |   |                            |          |           |      |
|------------|---|----------------------------|----------|-----------|------|
| Iwanishi K | Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method  | Ann Nucl Med               | 23       | 363-71    | 2009 |
| Ikoma Y    | Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [ <sup>11</sup> C]raclopride              | Neuroimage                 | 47       | 1639-48   | 2009 |
| Iwanishi K | Evaluation of utility of asymmetric indexed for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction | Ann Nucl Med               | 23       | 533-9     | 2009 |
| Kudomi N   | Parametric renal blood flow imaging using [ <sup>15</sup> O]H <sub>2</sub> O and PET  | Eur J Nucl Med Mol Imaging | 36       | 683-91    | 2009 |
| Temma T    | Quantification of Regional Myocardial Oxygen Metabolism in Normal Pigs using Positron Emission Tomography with Injectable <sup>15</sup> O-O <sub>2</sub>              | Eur J Nucl Med Mol Imaging | 37       | 377-85    | 2009 |
| Ikoma Y    | Measurement of Density and Affinity for Dopamine D <sub>2</sub> Receptors by a Single PET Scan with Multiple Injections of [ <sup>11</sup> C]raclopride               | J Cereb Blood Flow Metab   | In Press | —         | 2009 |
| Nakatani T | Heart Transplantation   | Circ J                     | 73       | A-55-A-60 | 2009 |
| Mano A     | Body mass index is a useful predictor of prognosis after left ventricular assist system implantation  | J Heart Lung Transplant    | 28       | 428-433   | 2009 |
| 中谷武嗣       | 心臓移植と待機患者への治療   | 内科                         | 103      | 521-525   | 2009 |

|             |   |                      |          |           |      |
|-------------|---|----------------------|----------|-----------|------|
| 中谷武嗣        | 心臓  | 移植 2009              | 44       | S119-S121 | 2009 |
| 中谷武嗣        | わが国における心臓移植でのエベロリムスの現状  | 今日の移植                | 22       | 674-678   | 2009 |
| S. Kakinoki | Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo (Lactic Acid) Conjugates  | The Japanese Society | —        | 449-450   | 2009 |
| S. Kakinoki | Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence | Acta Biomater        | in press | —         | 2009 |

学会発表

| 演者                | 演題名  | 学会名   | 場所     | 開催年月日        |
|-------------------|--|---|--------|--------------|
| 橋 洋一              | MRI移植細胞トラッキング：下肢虚血ラットを用いたMSC移植   | 日本医工学治療学会 第25回学術大会  | 大阪     | 2009.4.10-12 |
| 橋 洋一              | MRI用高分子造影剤を用いた細胞のラベル化及びin vivoにおける移植細胞の追跡  | 第4回日本分子イメージング学会   | 東京     | 2009.5.14-15 |
| Sachiro Kakino ki | Biosynthesis of Thermoresponsive Artificial ECM Composed of Elastin-like Repetitive Sequence (VPGIG)n and the Laminin-derived Sequence | 8th International Symposium of Frontiers in Biomedical Polymers |        | 2009.5.20-23 |
| Azizi MISKON      | Effect of Extracellular Matrix Components on Beating Behavior of Cardiomyocytes and Differentiation Behavior of Stem Cells in vitro    | 2nd Asia Biomedical Congress (2st ABMC)                         | シンガポール | 2009.6.26-27 |
| 鎌田和加子             | 高コレステロール血症治療を目指したsiRNAデリバリー  | 遺伝子デリバリー研究会第9回シンポジウム  | 大阪     | 2009.7.9-11  |
| 姜 貞勲              | 細胞シグナル応答型遺伝子送達システムとバイオナノカプセルとの融合による肝癌細胞選択的遺伝子デリバリー   | 遺伝子デリバリー研究会第9回シンポジウム  | 大阪     | 2009.7.9-11  |

|                   |   |  |     |               |
|-------------------|---|--|-----|---------------|
| 鎌田和加子             | 高コレステロール血症治療を目的とした糖修飾カチオン性キャリアによるsiRNAデリバリー   | 第55回 高分子研究発表会                                | 神戸  | 2009.7.17     |
| 橘 洋一              | 移植細胞のin vivo トラッキングを可能にする水溶性MRI造影剤  | 第38回医用高分子シンポジウム                              | 東京  | 2009.7.27-28  |
| 山岡哲二              | 新規MRI造影剤で標識した幹細胞の虚血部移植とin vivoトラッキング  | 第19回バイオ・高分子シンポジウム                            | 東京  | 2009.7.29-30  |
| 柿木佐知朗             | 遺伝子工学的手法を用いた神経再生性マトリックスの作製  | 日本バイオマテリアル学会 第4回 関西若手                        |     | 2009.8.7      |
| Tetsuji Yamamoto  | Myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins  | TERMIS-WC 2009                               | ソウル | 2009.8.31-9.3 |
| 馬原 淳              | 細胞ローリングカラムにより純化した間葉系幹細胞の表面マーカー密度と分化能力分析   | 第58回高分子討論会                                   | 熊本  | 2009.9.16-18  |
| 馬原 淳              | 特異的細胞ローリングを誘起する界面構造の設計と細胞分離効率   | 生体医工学シンポジウム2009                              | 千葉  | 2009.9.18-19  |
| 馬原 淳              | 細胞外マトリックスにおける間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導制御   | 第7回生活支援工学系学会連合大会                             | 高知  | 2009.9.24-26  |
| Yoichi Tachibana  | Development of siRNA carrier for liver targeting  | 第5回OTS(Oligonucleotide Therapeutics Society) | 福岡  | 2009.11.3-6   |
| Sachiro Kakinoaki | Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat | 第46回ペプチド討論会                                  | 北九州 | 2009.11.4-6   |
| Sachiro Kakinoaki | Bioactive interface composed of ECM-like peptides on PLA scaffolds for nerve regeneration   | ISBN2009                                     |     | 2009.11.9-10  |
| 柿木佐知朗             | 神経突起伸長活性ペプチド修飾ポリ乳酸ナノファイバーチューブの神経再生能評価   | 第47回日本人工臓器学会大会                               | 新潟  | 2009.11.12-14 |
| 柿木佐知朗             | 神経突起伸長活性ペプチドによるポリ乳酸表面の機能化   | 第31回日本バイオマテリアル学会大会                           | 京都  | 2009.11.16-17 |
| 田中聖也              | $\beta$ シート形成性インジェクタブルハイドロゲルの諸条件下でのゲル化挙動  | 第31回日本バイオマテリアル学会大会                           | 京都  | 2009.11.16-17 |

|                      |   |                           |    |              |
|----------------------|---|---------------------------|----|--------------|
| Sachiro Kakino<br>ki | Design of bioactive interface<br>on PLA scaffold by ECM-like<br>peptides adsorption | 第19回日本MR<br>S学術シンポジ<br>ウム | 横浜 | 2009.12.7-9  |
| 山岡哲二                 | 脱細胞血管に対する石灰化<br>評価とその抑制法  | 第9回 日本再<br>生医療学会総会        | 広島 | 2010.3.18-19 |
| 山下敦                  | 幹細胞の心筋分化誘導にお<br>ける細胞培養基質組成と物<br>性の影響  | 第9回 日本再<br>生医療学会総会        | 広島 | 2010.3.18-19 |



## 第6項 再生医療用スキャホールドゲル

### はじめに

近年、ES細胞や様々な組織幹細胞の発見に続いてiPS細胞の作製が報告され、その分化や増殖に関する生化学的・細胞生物学的、あるいは、分子生物学的進歩がめざましい。これらの有用細胞をいかにして組織や臓器へと導くかが、再生医療成功のための鍵となると期待され、様々なスキャホールド材料の開発が進められている。生体内では、多様な細胞外マトリックス(Extra Cellular Matrix)により、細胞の接着や3次元配置のみならず、その分化や増殖をも精密にコントロールされている。これらのECMの機能性は、特異的なアミノ酸配列などによる生物学的活性のみならず、その力学的特性や含水特性にも大きく関与している。本項では、再生医療における、いくつかの含水性合成スキャホールドについて紹介する。

### 1 再生医療

1993年、R. Langerらは、スキャホールド(Scaffold, 足場材料)と呼ばれるポリグリコール酸(PGA)の不織布に軟骨細胞を播種してヌードマウスの皮下に埋入することで、異所的な軟骨の再生が誘導できること、さらに、この手法が、肝臓、腸、尿管、骨などへ展開できる可能性を示唆した<sup>1)</sup>。その後、1996年以降、我が国では“再生医工学”という領域として発展した。このような、マトリックと細胞とを融合させるアイデアは、1980年頃から皮膚組織の再建をターゲットにして検討されていた。コラーゲンゲルと線維芽細胞や表皮細胞を組み合わせた皮膚の再生が次々と報告された。

その後の研究の進歩とともに、ますます再生医療の手法は広がりを見せてきた。その戦略を図1に整理した。まず、再生医工学と細胞移植に大別される。再生医工学の中心は、生分解性スキャホールドに細胞を播種して組織再生を狙うタイプの戦略である(図1-②、③)。これに対して、スキャホールドのみを使って、*in vivo*で組織再生を試みる戦略は、組織再生誘導法(GTR, Guided Tissue Regeneration)と呼ばれる(図1-①)。例えば、断裂した末梢神経を生体吸収性チューブでつなぐことで、ある期間、末梢神経が再生する空間を確保する研究が精力的に進められた。また、多孔質のコラーゲンスポンジが人工真皮として開発され、*in vivo*での真皮再生が報告されている。初期に利用されたポリグリコール酸やポリ乳酸のスポンジや不織布などの多孔質体をスキャホールドとして利用する場合、その高い疎水性のために水分を多く含む軟組織との親和性には問題があった。一方、含水性のコラーゲンゲルをスキャホールドとして用いた場合は、ECMが有する優れた組織親和性を発揮する。図2には、ポリグリコール酸のような疎水性スキャホールドと、コラーゲンスキャホールドに対する組織再生の違いについて示した。ポリグリコール酸や

ポリ乳酸などの場合でも表面の細胞親和性が確保できれば、多孔質構造中へと細胞が侵入してマトリックス表面に細胞が接着する(図2A)。しかしながら、疎水性が高いPLAでは、加水分解によってバルク体積が減少して、その結果大きくなった空隙部分で細胞が増殖するというステップが律速であるために、生体の治癒能力を十分に生かしきれない。それに対して、コラーゲンなどの含水性のスキャホールドにおいては、含水特性と生体分解性、さらに、高い組織親和性のために、周囲細胞がバルク内部へと浸潤することで極めて速やかな組織置換・組織再生が期待できる(図2B)。近年、生体由来材料に対する感染などが懸念され化学合成材料に期待が寄せられている。実際に、合成材料で水ドロゲルを作成することは容易であるが、一般的な化学合成材料表面には細胞が接着できず、その結果、細胞増殖さえも抑制されてしまうために、組織再生は期待できない(図2C)。すなわち、組織親和性(細胞接着性)に加えて、含水性をも併せもつ化学合成水ドロゲルを開発することが有用である。

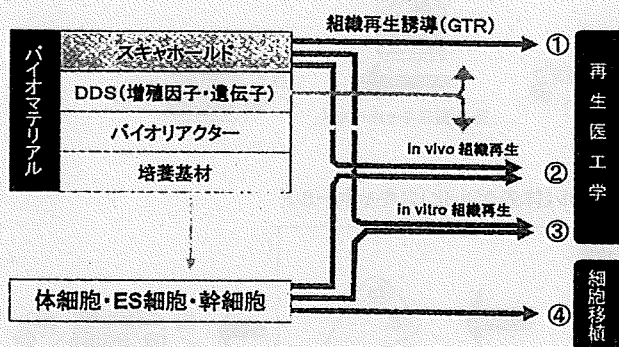


図1 再生医療の戦略

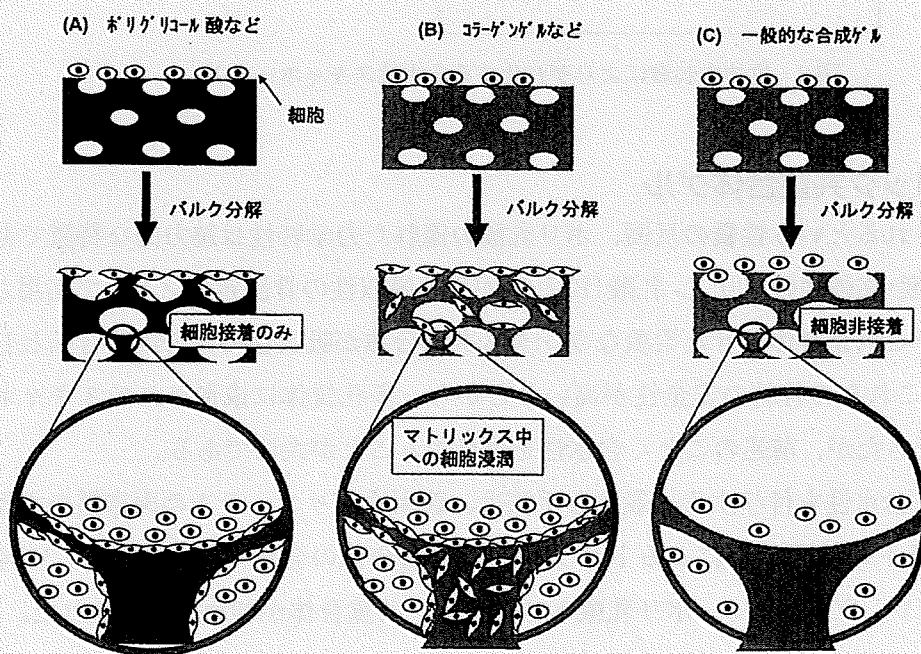


図2 含水性スキャホールドの能動的組織誘導

図1の④に示した細胞移植は、マトリックスを利用することなく、幹細胞や体細胞などを欠損部位に注入する方法である。近年、様々な細胞ソースが見い出された結果、この細胞移植に対する期待が大きく、臨床化も急速に進んでいる。特に自己幹細胞を移植することによる心疾患<sup>2)</sup>やパーキンソン病<sup>3)</sup>の治療において優れた効果が報告されている。しかし、これらの先進的手法が、一般的な治療法となるには解決しなくてはならない課題もまだまだ多い。疾患部位に直接細胞を注入するために、生体内深部や複雑な形状の疾患領域に対しても、低侵襲的に治療を行うことができるが、細胞懸濁液を組織中に注入した場合の細胞の生着率は極めて低く、その結果、治療効果が十分に発揮されない。そこで、なんらかの外部刺激によってゲル化するような材料がインジェクタブルスキャホールドとして注目を集めている(図3)。従来は光硬化性が広く研究されたが、我々は、さらに毒性の引く材料を用いて温度応答的にゲル化するインジェクタブルスキャホールドの研究を進めてきた。以下、これらのマトリックスゲルについて紹介する。

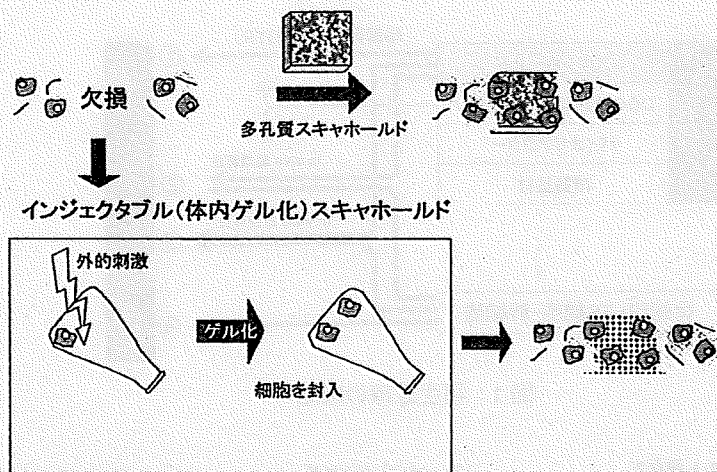


図3 生体内刺激によりゲル化する含水性スキャホールド

## 2 マルチブロック共重合体ゲル

生体内で吸収されるという性質の反面、ポリ乳酸の優れた力学特性は魅力的な特徴である。高分子量・高光学純度・高強度のポリ-L-乳酸(PLLA)が生体吸収性の骨固定ピンとして応用され<sup>4,5)</sup>、他の環状モノマーと共重合体させた柔軟なランダム共重合体が吸収性の外科用縫合糸として用いられてきた<sup>6,7)</sup>。これらの材料の安全性が高いことから、多孔質体に成形されてスキャホールドとして用いられてきたが、前述のごとく含水性を付与することが大切である。

ポリ乳酸などに含水性を付与する一般的な手法は、親水性ポリエーテルの両末端の水酸基を開始点とするラクチドの開環重合によるトリブロック共重合体の合成である(図4)。1984年、ポリ乳酸-ポリエチレングリコール-ポリ乳酸トリブロック共重合体が初めて報告された。その後、

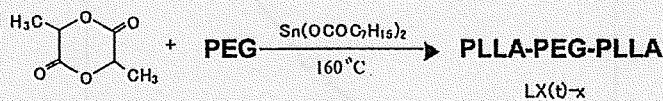
ポリエーテル組成が比較的高いトリブロック共重合体が薬物担体として利用され、1992年以降その論文数は爆発的に増加した。しかしながら、力学強度を要求されない薬物担体としては有用であるが、組織再生スキャホールドとして用いるには大きな問題があり、我々は、高親水性かつコラーゲンゲルのように組織再生を誘導するスキャホールド材料として研究してきた<sup>8,9)</sup>。

一般的には、フィルムや繊維あるいはスポンジなどのバルク材料として利用する場合には、問題がある。目的とする材料に要求される3つの条件を以下に示した。

- 十分な力学的強度を得るためには、100,000程度の分子量が必要
- PEGの分子量が、腎臓から排泄される20,000程度以下であることが必要
- 十分な含水性を達成するためには、数十%以上のPEG組成が必要

これら3つの条件を満たす共重合体を考えると、トリブロック共重合体の限界が見えてくる。例えば、分子量20,000のPEGを使用して、分子量が100,000の共重合体を作製するには、PLA-PEG-PLAの各ブロックの分子量は、40,000-20,000-40,000となり、PEG組成は20%となる。さらなる親水化を目指してPEG組成を上昇させるには、PLAの分子量を低下させて、15,000-20,000-15,000(総分子量=50,000、PEGの分子量=20,000、PEG組成=40%)とするか、あるいは、PEGの分子量を上げて例えば、30,000-40,000-30,000(総分子量=100,000、PEGの分子量=40,000、PEG組成=40%)とするしか手段はない。すなわち、上記の第一条件、あるいは、第三条件が満たせなくなり、トリブロック共重合体法では目的の材料合成は不可能であり、(ポリ乳酸-ポリエーテル)<sub>n</sub>型マルチブロック共重合体が有用となる(図4)<sup>8)</sup>。

#### トリブロック共重合体の合成法



#### マルチブロック共重合体の合成法

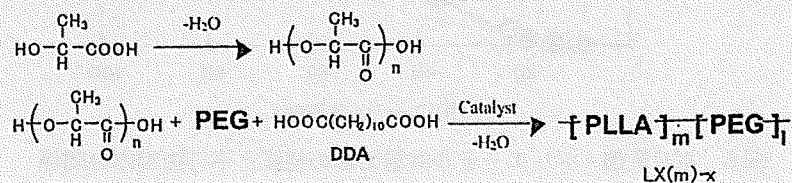


図4 ポリ乳酸-ポリエーテル共重合体の合成法

得られたマルチブロック共重合体のポリエーテル組成と分子量との関係を図5に示した。ポリエーテル組成の上昇と共に共重合体の分子量が低下するトリブロック共重合体(●印)とは異なり、マルチブロック共重合体(○印)では、ポリエーテル組成に関係なく分子量100,000以上を突

現していることがわかる。そのために、速い分解速度と親水性表面を有しながらも市販の外科用縫合糸と同等の初期破断強度を有する強い材料が調製でき、メッシュ、フィルム、不織布、スポンジなど様々な形状でスキャホールドとして利用できる材料となった。さらに、図6には、これらのブロック共重合体の含水特性の結果を示した。ポリエーテル組成が87%の場合には自重の5倍の含水性を有し、ラット皮下への埋入実験において、カプセル化反応が極めて軽微であるといふバイオイナートナ特性を引き出すことが証明された<sup>9)</sup>。

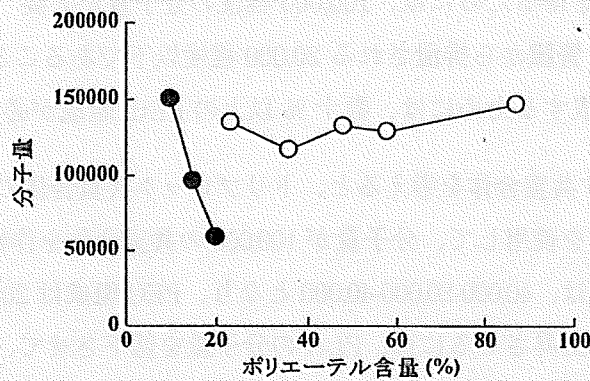


図5 ポリ乳酸-ポリエーテル共重合体の組成と分子量の関係

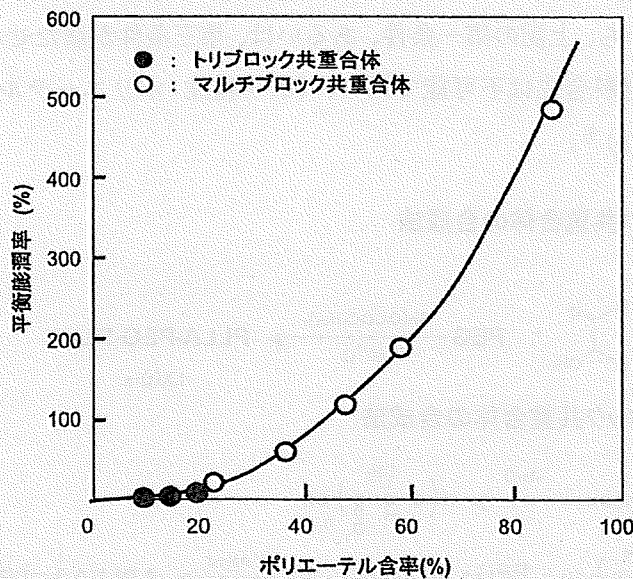


図6 ポリ乳酸-ポリエーテル共重合体の組成と平衡膨潤率の関係

次に、前述したように含水性に加えて細胞接着性を付与する必要がある。我々は、コラーゲンなどの生体由来材料とのコンポジットや、化学修飾法による新規物質の導入は、その医療応用開発速度を遅くすると考え、無機物質とのコンポジットを進めた。すなわち、含水性マルチブロック共重合体をベースに、田口らにより報告された交互浸漬法<sup>10)</sup>によって、無機微細結晶とのコン

ポジット材料を調整し、生体吸収性多孔質創傷被覆材を作製した(図7A)。ラット皮膚前奏欠損モデルへの適応1ヶ月の所見では、ほぼ完全に組織再生が完了し、毛細血管網も構築されている(図7B)。この所見は、コラーゲンをベースにした比較実験に匹敵する組織浸潤性であり、今後のさらなる物性最適化により、完全合成の含水性人工真皮として期待される。

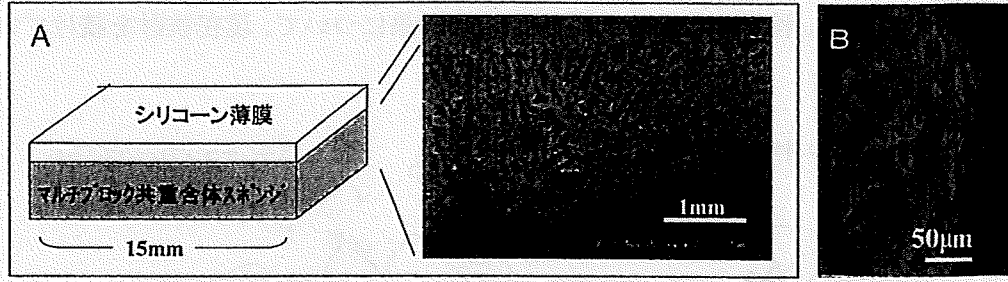


図7 マルチブロック共重合体多孔質体をベースにした人工皮膚(A)と in vivo 組織再生(B)

### 3 温度応答性ゲル化スキャホールド

臨床化が大いに期待される幹細胞移植術であるが、細胞注入を支援する材料として、体内で水溶液から含水ゲルへ変化するインジェクタブルスキャホールドが注目されている。我々は、体温付近に LCST を有するポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を多糖側鎖にグラフト重合した、くし形共重合体を合成し、25度で溶液でありながら37度に昇温するとゲル化するインジェクタブルスキャホールドを開発した。しかしながら、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)は生体内で分解も吸収もされず、必ずしも最適な材料ではない。そこで、新たな試みとして、ポリ乳酸とポリエチレングリコール(PEG)という、生体内での利用実績に優れる2つの高分子材料のみを利用することで、温度応答性を実現させる検討を進めた。

図4に示したようなトリブロック共重合体が水中で形成する、いろいろなミセルをAFMで観察していた時、ある条件を満たしたミセルが、加熱処理によってナノ繊維構造に変化することを、偶然、見出した<sup>11)</sup>。ミセルからナノ繊維への変化には、隣接するミセル同士が相互作用(コアを形成するポリ乳酸部分が、コロナ構造を形成するPEG層を乗り越えて融合)する必要がある。そこで、ポリ-L-乳酸からなるミセル(L体ミセル)と、ポリ-D-乳酸からなるミセル(D体ミセル)の分散液を混合することを発案した(図8A)。というのも、加熱により隣接するL体ミセルとD体ミセルが融合すると、ステレオコンプレックスミセルが形成し、その結果、図8Bに示すように3次元架橋構造が成長してゲル化するというアイデアである。ポリ乳酸のステレオコンプレックスは、ホモ結晶に比べて融点が約50℃も高い安定な構造であることも、ゲル化を促進して安定化することに寄与すると考えられる。実際に、共重合組成などを調節して37℃でゲル化することに成功したインジェクタブルスキャホールドの写真を図9に示した。X線散乱測定により、温度

上昇とともにステレオコンプレックス結晶が成長することでゲル化することも証明された。得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに、細胞毒性を誘発する一切の化学物質を利用していないために、細胞生存率を下げることなく、対象部位に細胞を注入できる材料となる。混合ミセル液にGFP(緑色蛍光タンパク)組換えマウス胎児線維芽細胞を懸濁させて、アガロースゲル中で昇温ゲル化させた3日後にも、細胞は正常な携帯とGFP発現機能を維持することが確認され、移植細胞の生存期間や治療効果について、現在検討を続けている。

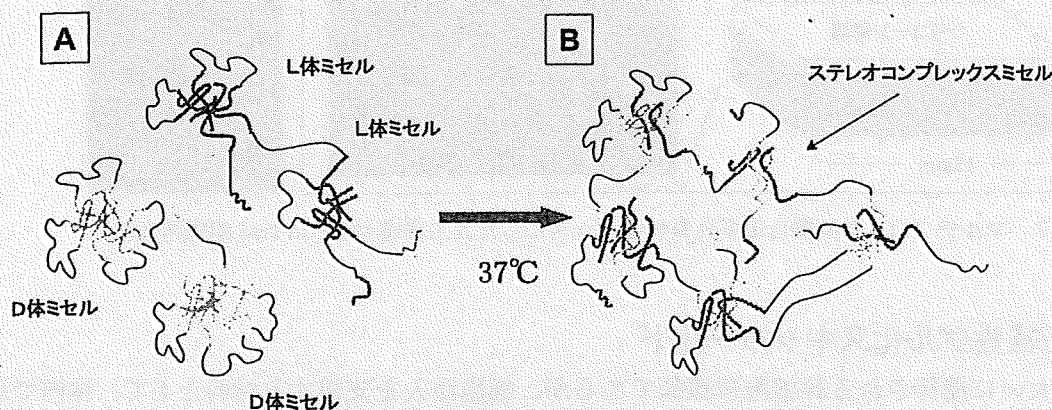


図8 L体ミセルとD対ミセルの混合液は、加温によりゲル化し、細胞移植用のインジェクタブルスキャホールドとなる

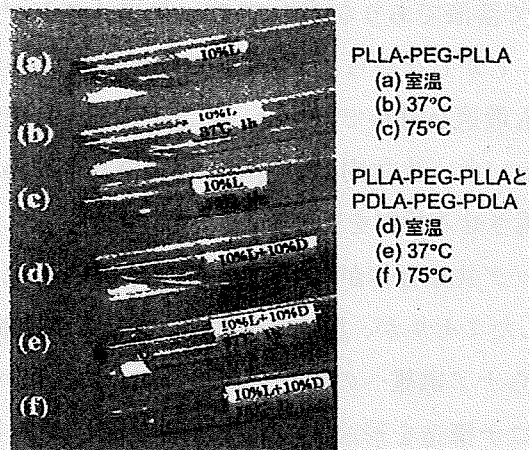


図9 L体ミセルとD体ミセル混合液(d)は、37度に加温することで透明なゲルに転移する(e)。それに対して、L体ミセルのみの分散液(a)は75度で白濁はするがゲル化には至らない

### おわりに

再生医療の研究が進むとともに、得られた有用細胞を組織や臓器へと3次元構築する困難さが明らかになり、また、もっとも単純と思われる自己細胞移植でさえ多くの問題が浮上している。ますます加速する幹細胞研究に後れを取らないように、工学技術の開発研究を進めなくてはならない。

## 参考文献

- 1) R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, 260, 920-926 (1993)
- 2) Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura, H. Mori, *Nat. Med.*, 12 (4), 459 (2006)
- 3) S. W. Kim, H. Han, G. T. Chae, S. H. Lee, S. Bo, J. H. Yoon, Y. S. Lee, K. S. Lee, H. K. Park, K. S. Kang, *Stem Cell*, 24, 1620 (2006)
- 4) J. Mauduit, E. Perous, M. Vert : *J Biomed Mater Res*, 30, 201-207 (1996)
- 5) Y. Ikada, Y. Shikinami, Y. Hara, M. Tagawa, E. Fukada : *J Biomed Mater Res*, 30, 553-558. (1996)
- 6) R.E. Johnson, L.A. Lanaski, V. Gupta, M.J. Griffen, H.T. Gaud, T.E. Needham, H. Zia : *J Controlled Release*, 17, 61-67 (1991)
- 7) N. Nihant, C. Schugens, C. Grandfils, R. Jerome, P. Teyssie : *Pharm Res*, 11, 1479-1484 (1994)
- 8) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Ohta, M. Miyamoto, A. Murakami, and Y. Kimura : *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 37, 1513-1521 (1999)
- 9) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Fujisato, C. W. Lee, T. Tsuji, T. Ohta, A. Murakami, and Y. Kimura : *J. Biomed. Mater. Res.*, 54 (4), 470-479 (2001)
- 10) T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi : *J Biomater Sci Polym Edn*, 10, 331-339 (1999)
- 11) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, 1, 204-208 (2001)



## Preservation of Porcine Hepatocytes in Three-Dimensional Bioreactor at Room Temperature Using Epigallocatechin-3-Gallate

Azizi Miskon, M.Eng.,<sup>1-3</sup> Tetsuji Yamaoka, Ph.D.,<sup>1</sup> Suong-Hyu Hyon, Ph.D.,<sup>4</sup>  
Makoto Kodama, Ph.D.,<sup>3</sup> and Hiroshi Uyama, Ph.D.<sup>2</sup>

A bioartificial liver (BAL) assist system employing a three-dimensional (3D) bioreactor has been studied as a temporary support in liver failure. In the present study, a novel preservation method of primary cultured porcine hepatocytes in monolayer and 3D culture systems was studied. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), which has recently been found to have various bioactivities, was selected as a key compound for hepatocyte preservation. Hepatocytes isolated from porcine liver using the collagenase perfusion method were pre-cultured for 6 days, preserved at room temperature in the presence of EGCG at various concentrations for 4 days, and post-cultured in normal medium for another 6 days. In the monolayer culture, only albumin production rate was fully recovered after preservation when EGCG concentration was high (0.25 mg/mL). In contrast, albumin production and ammonium metabolism in the 3D bioreactor under the same condition recovered to  $72 \pm 16\%$  and  $98 \pm 32\%$ , respectively, of levels before preservation. These results indicate that hepatocytes can be preserved in the presence of 0.25 mg/mL of EGCG at room temperature, especially in a 3D culture system, which is promising technology for BAL preparation.

### Introduction

VARIOUS CELL-BASED THERAPIES have been proposed and widely studied recently. Among them, hepatocyte-based treatments for fulminant or chronic hepatitis have been attracting great attention. Injection of hepatocytes isolated from unused donor livers and bioartificial liver (BAL) assist systems is used for treating acute liver failure and liver-based metabolic defects.<sup>1-5</sup> A large number of hepatocytes must be prepared for emergency care and for repeated treatment,<sup>6</sup> but because the isolation and reconstruction into a three-dimensional (3D) structure of the hepatocytes would take a long time and requires complex steps, metabolic activity rapidly decreases during the preparation process. We previously reported that the BAL system, using a radial flow bioreactor, needs at least  $1.0 \times 10^9$  hepatocytes to maintain function.<sup>7</sup> Therefore, it is essential to preserve cells that maintain their functions in BALs. However, maintaining the specific functions of the hepatocytes using conventional cryopreservation is difficult.<sup>8-16</sup>

Various strategies to maintain cell functions have been proposed. Watts *et al.* and McKay *et al.* reported that mono-

layer culture is superior to suspension culture in preserving hepatocytes.<sup>17,18</sup> Kakinoki *et al.* have succeeded in storing peripheral nerves for longer than 1 month using green tea polyphenol,<sup>19</sup> and Hyon *et al.* reported that green tea polyphenol also preserved the rat pancreatic islet for longer than 2 months.<sup>20</sup>

The green tea polyphenol is composed of epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, epicatechin, and epigallocatechin, but the effect of each component on cell preservation is unknown. We focused on epigallocatechin-3-gallate (EGCG) because it is the main component of the green tea polyphenol and is well known to have a wide range of pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-atherogenic, and anti-thrombotic.<sup>21-23</sup> Recently, the effects of polyphenol on various diseases such as tissue ischemia,<sup>24,25</sup> neoplasm inflammation,<sup>26,27</sup> and arteriosclerosis<sup>28,29</sup> have been reported.

In the present study, we attempted to preserve primary cultured hepatocytes for a 3D BAL system. The effect of EGCG on hepatocyte preservation at room temperature was evaluated using monolayer culture. The preservation experiments in 3D BAL systems were also conducted in our

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan.

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

<sup>3</sup>Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu City, Fukuoka, Japan.

<sup>4</sup>Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.

original BAL, which consisted of a perfusion-type bioreactor and a polytetrafluoroethylene (PTFE) non-woven fabric coated with the copolymer of poly ( $\gamma$ -methyl-L-glutamate) and poly urethane (PAU).<sup>7</sup>

## Materials and Methods

### Animals and hepatocytes

Mini pigs (male, 4–16 weeks) were purchased from Japan Farm LTD. (Kagoshima, Japan). Hepatocytes were isolated from the liver lobes (70–90 g) and used for a 2D monolayer culture experiment at the National Cardiovascular Center Research Institute (Osaka, Japan). The Animal Subjects Committee of the National Cardiovascular Center (Osaka, Japan) had reviewed and approved the experimental protocol.

A slaughtered pig (male, 7 weeks) was purchased from Kitakyushu Prefecture Edible Meat Center (Fukuoka, Japan). Hepatocytes were isolated from a liver lobe (103.4 g) and used for 3D BAL experiments at the Kyushu Institute of Technology (Fukuoka, Japan). The animal experiment was conducted in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Science, approved by the Physiological Society of Japan.

Hepatocytes were isolated using the collagenase perfusion technique with modifications.<sup>30,31</sup> The liver was perfused with 1000 mL of calcium-free ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer solution (0.15 M sodium chloride (NaCl), 5.63 mM calcium chloride (KCl), 0.02 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.02 M sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), and 0.99 mM EDTA disodium salt (EDTA-2Na; Wako, Ltd., Osaka, Japan), pH 7.4) at 80 mL/min and 37°C to remove the blood and then perfused with 500 mL of calcium-free buffer solution to rinse the ED-

TA-2Na, because EDTA-2Na reduces collagenase activity. After that, 500 mL of dispase solution (0.15 M NaCl, 5.63 mM KCl, 0.02 M HEPES, and  $6.0 \times 10^3$  U Dispase; Gibco Co, Grand Island, NY) and then 500 mL of collagenase solution (0.15 M NaCl, 5.63 mM KCl, 0.02 M HEPES, 0.02 M NaHCO<sub>3</sub>, 3.74 mM calcium chloride dihydrate (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O), and  $6.5 \times 10^4$  U collagenase (Wako, Ltd., Lot no. 06032W)) were perfused. The perfused liver was carefully minced with a scalpel blade, and the resulting crude homogenate was shaken in the presence of the last perfusate. The resulting cell suspension was filtered through nylon mesh with a 200- $\mu$ m pore size and centrifuged at 600 rpm at 4°C for 2 min. The hepatocytes were washed with washing buffer with DNase (0.12 M NaCl, 6.2 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.49 mM magnesium chloride hexahydrate (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), 6H<sub>2</sub>O, 0.41 mM magnesium sulfate heptahydrate (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 10 mM HEPES, 1.0 g/L of bovine serum albumin (Wako, Ltd.), and 10 mg/L of DNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Lot 13738000)) and with washing buffer (0.12 M NaCl, 6.2 mM KCl, 1.77 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02 M HEPES, and 1.0 g/L of bovine serum albumin (Wako, Ltd.)) twice.

Isolated hepatocytes were cultured in William's E medium with L-glutamate (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Inc., Lot no. 043K83032), 100 IU/L penicillin-streptomycin,  $1.0 \times 10^{-7}$  M insulin (Wako, Ltd.),  $1.0 \times 10^{-6}$  M dexamethasone (Wako, Ltd.), 25  $\mu$ g/L epidermal growth factor (Sigma-Aldrich Inc.), and 1.5 mM L-ascorbic acid phosphate magnesium salt *n*-hydrate (Wako, Ltd.).

### Cell culture

Static culture. Hepatocytes ( $1.0 \times 10^6$ ) were initially seeded on a 60-mm collagen type I-coated dish (Iwaki, Asahi

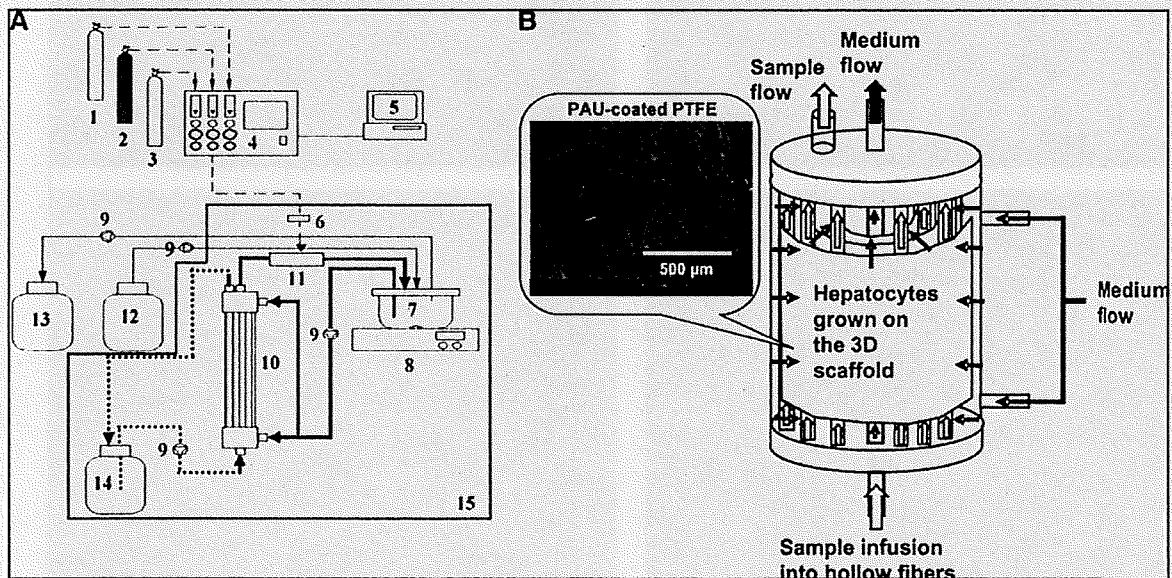


FIG. 1. (A) A schematic diagram of a bioartificial liver (BAL) (1) carbon dioxide cylinder, (2) oxygen cylinder, (3) air cylinder, (4) gas control equipment, (5) computer, (6) membrane filter, (7) conditioning vessel, (8) stirrer, (9) peristaltic pump, (10) radial flow bioreactor module, (11) silicone oxygenator module, (12) fresh medium tank, (13) spent medium tank, (14) plasma bottle, and (15) incubator.  $\rightarrow$ : medium flow for hepatocytes culture.  $\cdots\rightarrow$ : Sample flow for ammonium metabolism evaluation. (B). Radial flow bioreactor module.

Glass Co., LTD, Tokyo, Japan) and incubated in a 5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>)/air atmosphere at 37°C for 6 days. We started monitoring the hepatocyte functions on day 3 and continued for 4 more days (pre-preservation). After that, to preserve the hepatocytes, the given concentrations of EGCG (0, 0.25, 0.025, and 0.0025 mg/mL) were added to the culture medium and kept at room temperature for 4 days. CO<sub>2</sub> was not supplied during the preservation period. The preserved cells were properly washed with culture medium four times and cultured for 6 days in the normal medium (post-preservation). The medium was changed every 24 h.

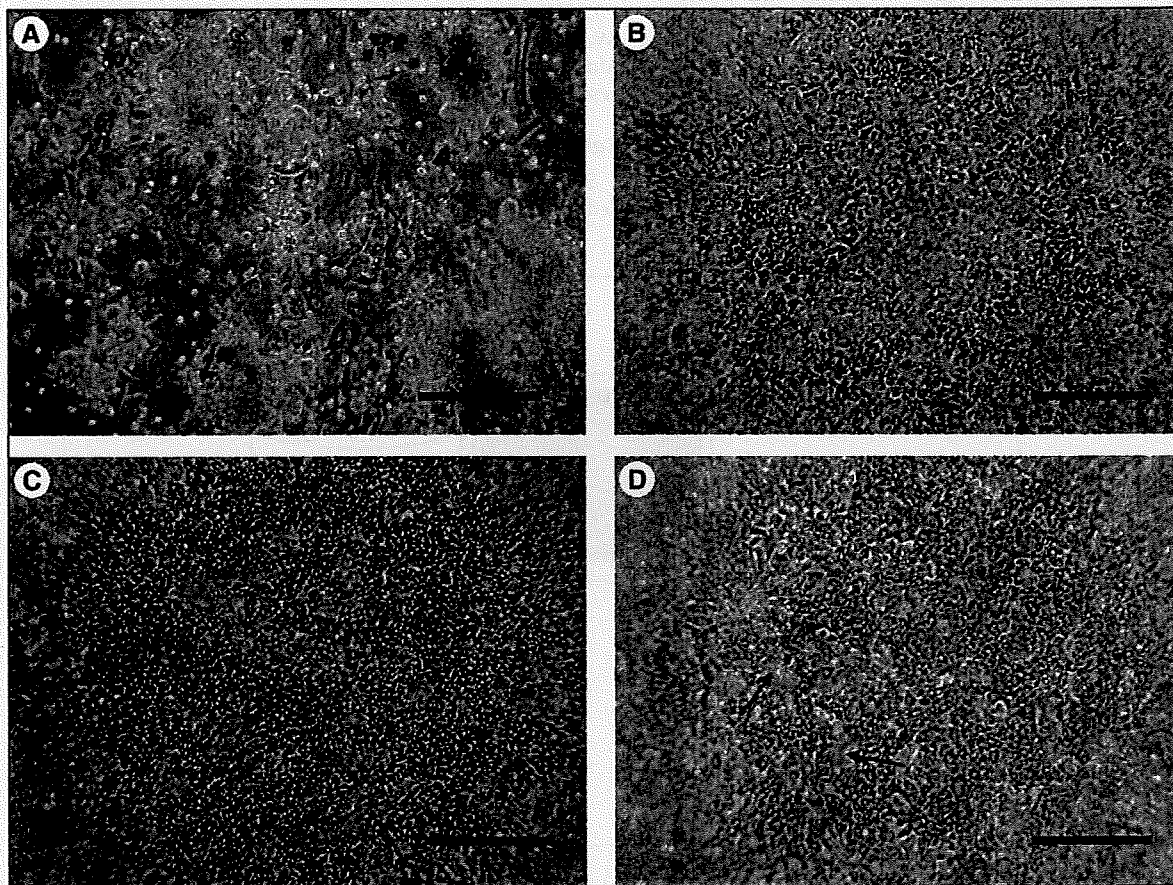
The cell morphologies were observed at 3 days pre-preservation, on day 3 of the preservation period, and on 6 days in post-preservation using a Nikon TMS phase-contrast light microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were taken using a Nikon CoolPix 990 digital camera (Nikon). The hepatocytes adhered in 2 days after seeding. Because of the high density of the seeded cells, the cells were in the confluent stage and do not proliferate.

**Perfusion culture.** Perfusion culture was performed in the radial flow bioreactor system that we reported previ-

ously.<sup>7</sup> In brief, hepatocyte suspension ( $2.0 \times 10^9$  cells in 50 mL) was inoculated into a conditioning vessel (Fig. 1A(7)) and perfused to a bioreactor module composed of a 3D scaffold made of PAU-coated PTFE non-woven fabric at the flow rate of 17 mL/min for 10 min. The suspension in the conditioning vessel was turbid because of the high density of inoculated cells before use (Supplementary data 1A). After 10 min of perfusion at 17 mL/min and 2 h of perfusion at 84.2 mL/min, the suspension became clear (Supplementary data 1B), and no cells were detected in the medium, indicating that the cell seeding efficiency was high and that almost all inoculated cells were adhered onto or entrapped in the non-woven scaffold.

The pH and oxygen concentration of the medium were fixed at 7.3 and 313  $\mu$ M, respectively, using the pH and oxygen sensors of the conditioning vessel (Fig. 1A(7)). The gas controller equipment (Fig. 1A(4)) controlled air flow and carbon dioxide flow at 10 mL/min to control the pH. Meanwhile, the controller controlled oxygen at 50 mL/min to maintain the diluted oxygen rate.

We started monitoring the hepatocyte functions 24 h after inoculating the cells and continued for 4 days. The best



**FIG. 2.** Light microscopic images of porcine hepatocytes preserved for 3 days in (A) epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-free medium or in EGCG-containing medium at the concentration of (B) 0.25-, (C) 0.025-, and (D) 0.0025-mg/mL EGCG. The arrows show the cells detaching from the dish. Bars represent 200  $\mu$ m.

concentration of EGCG fixed in the monolayer culture system was applied to the 3D culture system and preserved at room temperature for 4 days. The medium perfusion and oxygen, air, and CO<sub>2</sub> supplies were stopped during the preservation period. The preserved cells were properly washed with 3 L of culture medium and cultured for 5 days in the normal medium. Medium exchange was performed every 24 h throughout the culture period.

#### Hepatocyte functions

**Albumin production rate.** One mL of medium was taken before and after the medium change in static and perfusion culture for measuring albumin production using enzyme-linked immunosorbent assay.<sup>32</sup> For the perfusion culture, the albumin concentration in the conditioning vessel and the plasma bottle were measured. Briefly, a 96-well plate was coated overnight with 1000-times-diluted goat anti-pig albumin antibody (Bethyl Lab, Inc., Montgomery, TX) at 4 °C. The plate was washed four times with 1% (v/v) Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS) (-), incubated with 0.01 g/mL block ace (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan) for 3 h at 37 °C to block unspecific binding, and washed four times. Samples were added to the plate, incubated for 3 h at 37 °C, and washed with 1% (v/v) Tween 20 in PBS (-) five times. The peroxidase-conjugated goat anti-pig albumin (Bethyl Lab, Inc., 15,000 times diluted) was added to each well and incubated for 2 h at 37 °C. Afterward, the plate was washed, and the o-phenylenediamine (Wako, Ltd.) solution in 0.01% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 mg/mL) was added. The color reaction was stopped by adding 50 µL of 1.0M sulfuric acid, and the ultraviolet absorbance was measured using a microplate reader at 490 nm. The albumin secretion is indicated as the amount in a dish and in a reactor per day (µg/dish per day, mg/reactor per day).

#### Ammonium metabolism rate

**Static culture.** To assess the ammonium metabolism of the hepatocytes, 1 mM ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) was added to the medium, and the ammonium concentration was measured after 0, 3, and 6 h using the Amicheck meter (Arkray Factory Inc., Shiga, Japan). Ammonium metabolism rate defined as amount of decreased ammonium in a dish per hour (µmol/dish per h).

**Perfusion culture.** The plasma bottle (Fig. 1A(14)) of the 3D bioreactor system was filled with 300 mL of 1 mM NH<sub>4</sub>Cl-containing medium, and the hepatocytes grown on the 3D scaffold (Fig. 1B) were perfused with this medium. The ammonium concentrations in the conditioning vessel and plasma bottle were measured after 0, 3, and 6 h using the Amicheck meter (Arkray Factory Inc.). The ammonium metabolism rate was expressed as µmol/reactor per hour.

#### Scanning electron microscopy

Hepatocytes attached to the scaffold in the bioreactor were fixed with 2.5% glutaraldehyde, dehydrated with graded ethanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 99.5%), and dried with tert-butyl alcohol (t-BuOH) freeze-drying (t-BuOH freeze dryer VFD-21; Vacuum Devices Co., Ltd., Ibaraki, Japan). The specimens were coated with palladium by sputtering (E-1030, Hitachi Co., Tokyo, Japan) and then observed using scanning electron microscopy (SEM; S-3000N, Hitachi Co.).

#### Histological study

The transverse section (2 µm thick) was taken from the construct in the bioreactor. The section was stained with hematoxylin and eosin (H&E) and azan to demonstrate

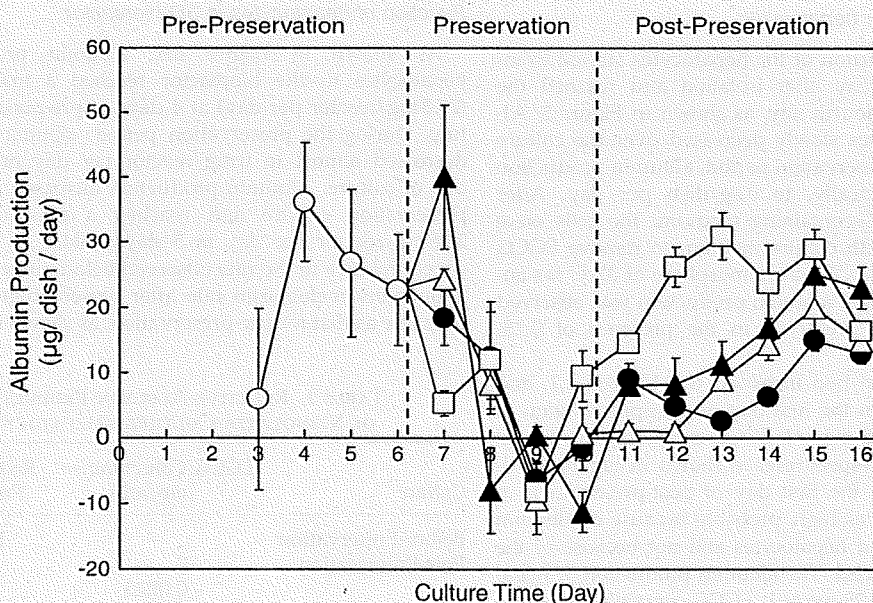


FIG. 3. Albumin production of monolayer-cultured hepatocytes during pre-preservation (○); preservation in epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-free medium (●) and in 0.0025- (△), 0.025- (▲), and 0.25-mg/mL EGCG-containing medium (□).