

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

腹腔内視鏡に搭載可能な組織吸引MEMSデバイスを用いた
低侵襲かつ安全な新規核酸送達法の難治性腎臓・心臓疾患治療への応用

研究代表者 清水 一憲 大阪大学大学院基礎工学研究科 助教

本研究の目的は、吸引圧法を腎・心臓疾患治療への応用へと展開することである。本年度は、初年度に開発した吸引圧制御システムを用いて、吸引圧法の基本的特性を明らかにした。肝臓に対して、様々な条件で吸引圧法を行い、特に肝障害性について詳細に検討した。さらに吸引デバイスの形状を変えて吸引圧法を行い、吸引圧法では組織変形量が重要であることを明らかにした。また心臓への吸引圧法の最適化を進めた。圧力波形や最少到達圧力の違いによる、核酸導入量の違いを調べた。さらに心臓疾患モデルマウスの心臓に対して、吸引圧法が適用可能であることを明らかにした。

川上茂

長崎大学大学院医歯薬総合研究科 教授

木下秀之

京都大学大学院医学研究科 医員

A. 研究目的

本年度（2年目）は、吸引圧法の最適化をさらに進めるとともに、分担者と協力し、疾患モデル動物の治療へと研究展開することを目的とした。

まず、吸引圧法の基本的特性を明らかにするために、肝臓を対象とした吸引圧法を行った。特に、吸引圧法の肝障害性への影響を詳細に検討した。また心臓に対する吸引圧法の最適化を進め、波形や最少到達圧力の影響を調べた。さらに疾患モデルマウスの心臓に対して吸引圧法を行った。

B. 研究方法

B-1. 吸引デバイスの製作

吸引デバイスは三次元プリンターを用いて作製した型を鋳型として、ポリジ

メチルシロキサン（PDMS）を成型することで作製した。三次元プリンターで作製した型は、PDMSを硬化させるため、その表面に厚さ10 μmのパリレンを蒸着した後に使用した。

B-2. 肝臓への吸引圧法

マウス（ICR、雌、4週齢）に麻酔を行い、開腹し、肝臓を必要最小限露出させた。尾静脈からCMVプロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAを100 μg含む生理食塩水を200 μl投与し、その直後に、肝臓の標的とする部位に軽くデバイスを接触させ、吸引圧制御システムを作動させた。ただちに閉腹し、6時間経過後、マウスを安楽死させて肝臓を取り出し、標的部位中のルシフェラーゼの発現量をルミノメーターで測定した。

肝臓に対して用いた吸引デバイスの基本形状は、内径3 mm、外径5 mm、高さ3 mmである。

B-3. 肝障害性の評価

血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）量、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）量を測定した。吸引圧法を行い、0、6、24、48

時間後に血清をサンプリングした。測定には、トランスアミナーゼCII-テストワコー（和光純薬）を用いた。

B-4. 肝臓への吸引圧法により核酸導入される細胞種の評価

肝臓に対して、ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAを用いて吸引圧法を行った。6時間後に、コラゲナーゼ灌流法により肝組織から細胞を分離した。回収した細胞懸濁液を遠心し、肝実質細胞と非実質細胞に分け、それぞれの細胞のルシフェラーゼ量を測定した。

B-5. 心臓への吸引圧法

麻酔を施したマウスの呼吸を人工呼吸器で管理し、左第4番肋骨と第5番肋骨の間から開胸した。200 μ lのプラスミドDNA溶液を尾静脈から投与し、直後に、吸引デバイスを標的部位に接触させ、圧力制御システムを作動させた。用いたデバイスの基本形状は、内径1.5 mm、外径3 mm、高さ3 mmである。

B-6. 心筋梗塞モデルの作製と吸引圧法

麻酔下で、挿管・人工呼吸管理下に、左第4番肋骨と第5番肋骨の間から開胸し、前下行枝を7-0縫合糸を用いて結紮した。結紮ののち、ただちに閉胸した。心筋梗塞モデル作製の3日後に、麻酔下で、挿管・人工呼吸管理下にて開胸し、B-5と同様の手順で虚血部位に対して吸引圧法を適用した。なお、虚血部位は目視により確認した。吸引波形は1-3-1、圧力は-75 kPa、デバイスの形状は1.5-3-3である。

（倫理面への配慮）

動物実験を行うのにあたり、京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会の承認を受けるとともに、実験遂行時にはプロトコルを遵守した。DNAを取り扱う実験を行うにあたり、同様に承認を受け、環境問題および実験者の安全に十分に配慮して実験を行った。

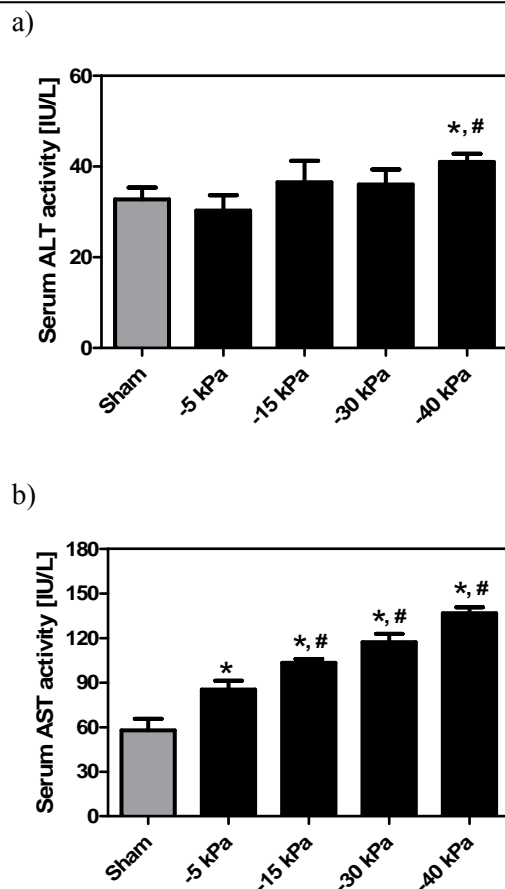


図 1 最少到達圧力の大きさが肝障害性に与える影響

肝臓への吸引圧法を行った後、6 時間経過後の ALT 値 (a) と AST 値 (b)

C. 研究結果

C-1. 肝障害性に対する最少到達圧力の影響

初年度に吸引圧制御システムを開発し、肝臓への吸引圧法を実施することで、最少到達圧力が導入プラスミドDNAの発現量に影響することを見出した。そこで本年度は、まず、最少到達圧力の違いが、肝障害性に影響するかどうかを調べた。最少到達圧力を-5、-15、-30、-40 kPa、波形を1-3-3に設定し、肝臓への吸引圧法を行った。

その結果、吸引圧法を実施して6時間後において、ALT値は、-5、-15、-30 kPaはShamと同等であったが、-40 kPaは有意に高い値となった(図1a)。AST値は、最少到達圧力が小さくなるほど、高い値となり、-5 kPaにおいても、Shamよりも

有意に高い値となった(図1b)。しかし図2に示すように、ALT値、AST値ともにその上昇は一過性のものであり、24時間後以降では何も処置を行っていないコントロールマウスと同等のレベルとなった。

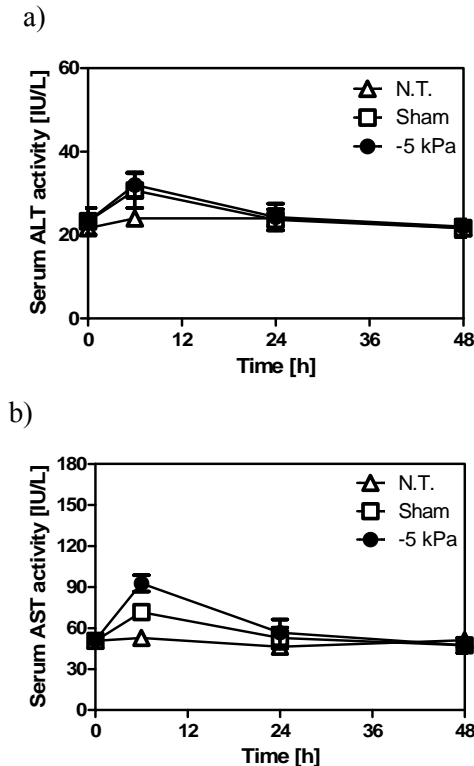


図 2 肝臓への吸引圧法による肝障害性の経時変化

肝臓への吸引圧法を行った後、0、6、24、48時間経過後のALT値(a)とAST値(b)

C-2. 肝障害性に対する吸引デバイスの硬さの影響

次に吸引デバイスの硬さの違いが、肝障害性に与える影響を明らかにした。同じ形状で硬さの異なる吸引デバイスを製作し、それをを用いて肝臓への吸引圧法を行った。PDMSの混合比を変えることで、硬さの異なるデバイスを製作した。用いた混合比は、主剤:硬化剤=20:1と10:1であり、20:1をsoft、10:1をhardとした。吸引圧制御システムを用いて、肝臓への吸引圧法を、それぞれのデバイスで行い、6時間後にALTとAST値を測定した。その結果、ALT値は-40 kPaで、AST値は-15、-30、-40 kPaにおいて、softで有意に低いという結果が得られた(図3)。

また-40 kPaでは、hardにおいて、肝臓の吸引した部位が断裂し、出血することが明らかになった。ルシフェラーゼ発現量は、softとhardの間で違いは見られなかった。これらの結果より、吸引デバイスの硬さは、組織障害性に影響することが分かった。

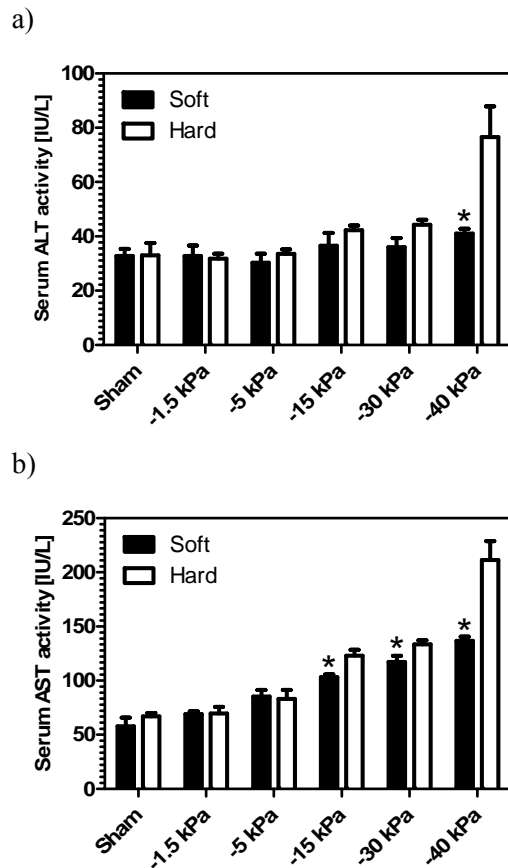


図 3 吸引デバイスの硬さと肝障害性の関係

硬さの異なる吸引デバイスで吸引圧法を行った後、6時間経過後のALT値(a)とAST値(b)

C-3. 吸引圧法における導入核酸の発現量と組織変形量の関係

前年度の研究から、最少到達圧力が、導入したプラスミドDNAの発現量に大きく影響することが明らかになっていた。しかしながら、なぜ最少到達圧力の違いにより発現量が変化するのが明らかになっていなかった。

我々は、最少到達圧力が違うことで、組織の変形量が異なり、変形量が異なることで発現量がことなると考えた。まず、最少到達圧力を変化させた時の組織変

形量を調べたところ、-3 kPaと-5 kPaの間に違いがあることが明らかになった（図4）。すなわち、発現量と組織変形量に相関があることが示唆される結果を得た。

そこで、それらの関係を、より詳細に検討した。図5aに示すように、穴の数が違うが穴面積の和が同じ吸引デバイスを4種作製し、同じ最少到達圧力で吸引圧法を行った際の、発現量と組織変形量の関係を調べた。組織変形量は、-5 kPaの圧力を負荷した際に、デバイスの穴の中に吸引された肝組織量を測定することで求めた。

その結果、発現量がデバイス(i)において最も高く、デバイス(ii)で2番目に高いという結果が得られた（図5b）。一方、組織変形量もデバイス(i)において最も大きく、デバイス(ii)で2番目に高いという結果が得られた（図5c）。これらの結果から、吸引圧法における導入核酸発現量は、組織変形量に大きく依存することが分かった。

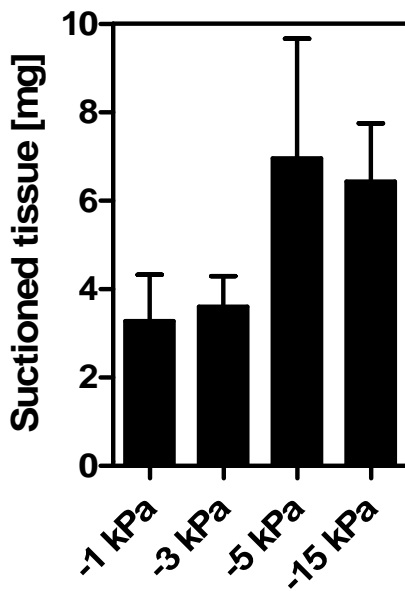


図 4 最少到達圧力と組織変形量の関係

肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力-5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

C-4. 複数の吸引口を持つ吸引デバイスの開発とその効果

続いて、吸引圧法による疾患モデル動物

治療に向けた検討を行った。まずは肝臓を対象とした。初めに、肝臓あたりの核酸導入量を増加させるために、吸引デバイスの改良を行った。

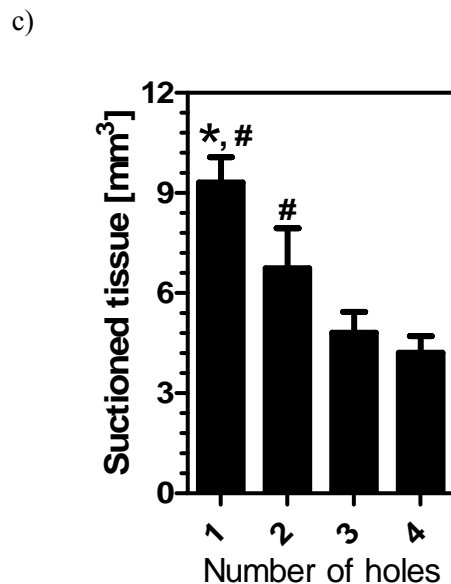
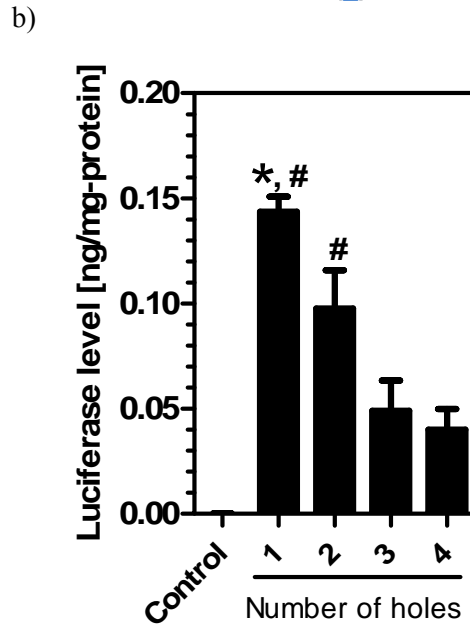
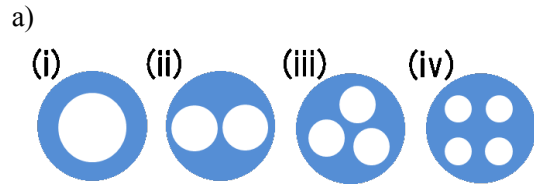


図 5 吸引圧法における導入核酸発現量と組織変形量の関係

用いた吸引デバイスの穴形状の断面 (a) それぞれのデバイスを用いた際の発現量の違い (b) それぞれのデバイスを用いた際の組織変形量の違い (c)。肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力-5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

図6aに示すように、これまで用いてきたデバイス（device #1）を基本構造とし、それを2、3、4個配置したものを作製した（device #2-4）。

それぞれのデバイスを用いて肝臓への吸引圧法を行った結果を図6bに示す。その結果、想定した通り、吸引口の数が最も多い、device #4において最も高い発現量が得られた。またdevice #4による発現量はdevice #1の4倍以上（約8.9倍）であった。

またALT値、AST値を調べたところ、吸引口が多くなるに従い、それらの値が大きくなる傾向が観察された（図7）。しかしながら、最も高い値が観察されたdevice #4においても48時間以内にそれぞれの値がコントロールマウス（無処置）と同等になることが分かった（図8）。このことから、device #4による肝臓への吸引圧法は、発現量を向上させるが、肝臓に対して、深刻な障害を与えないことが分かった。

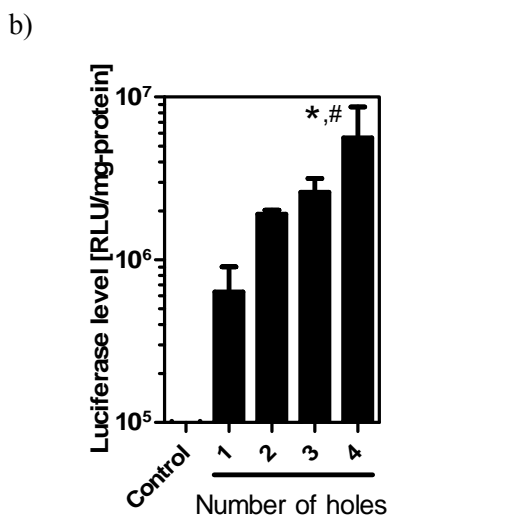
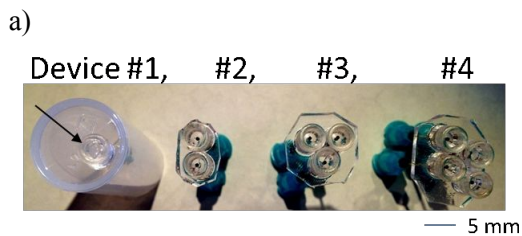


図 6 複数の吸引口をもつデバイスの開発とそれを用いた吸引圧法

開発した吸引デバイス（a）それぞれのデバイスを用いた際の発現量の違い（b）、肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力-5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

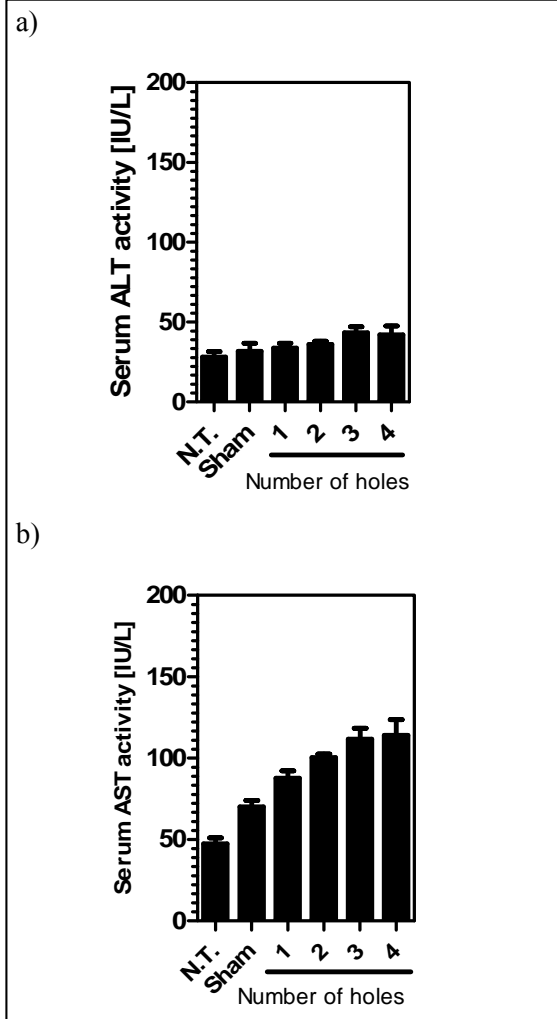


図 7 複数の吸引口をもつデバイスを用いた吸引圧法による肝障害性

開発した吸引デバイス#1 から#4 を用いて、肝臓への吸引圧法を行い、6 時間後の血清中の ALT 値（a）、AST 値（b）を調べた。肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力-5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

C-5. 肝臓への吸引圧法により核酸導入される細胞種の検討

どの細胞種に対して核酸導入されるのかを明らかにすることは、疾患治療戦略を考える上で、非常に重要である。そこで、肝臓を対象に吸引圧法を行い、どの細胞種に核酸が導入されるのかを調べた。

その結果、細胞一個当たりの発現量が実質細胞において有意に高いことが分かった（約13.7倍）（図9）。このことから、肝臓への吸引圧法では、主に肝実質細胞に核酸が導入されていることが示唆された。

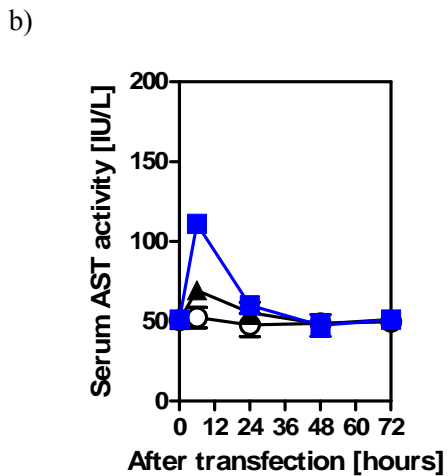
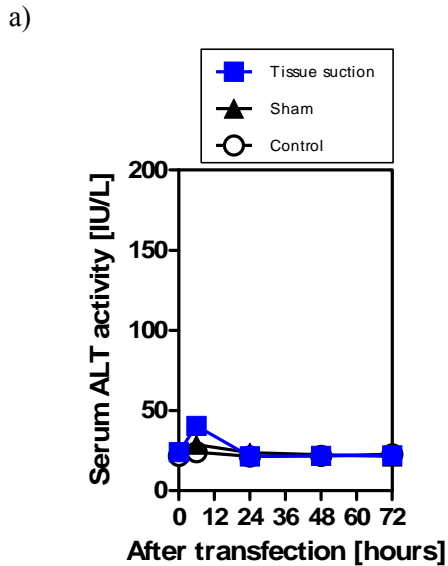


図 8 複数の吸引口をもつデバイスを用いた吸引圧法による肝障害性の経時変化

開発した吸引デバイス#4 を用いて、肝臓への吸引圧法を行い、0、6、24、48、72 時間後の血清中の ALT 値 (a) AST 値 (b) を調べた。肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力 -5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

C-6. 心臓への吸引圧法の最適化：吸引波形の影響

初年度に開発した吸引圧制御システムを用いて、心臓への吸引圧法における吸引波形の影響を調べた。ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAを用いて、2種類の波形の影響を調べた (1-3-1、1-1-1)。最少到達圧力は-75 kPaとした。その結果、検討した2条件では、発現量が変化らなかった (図10)。

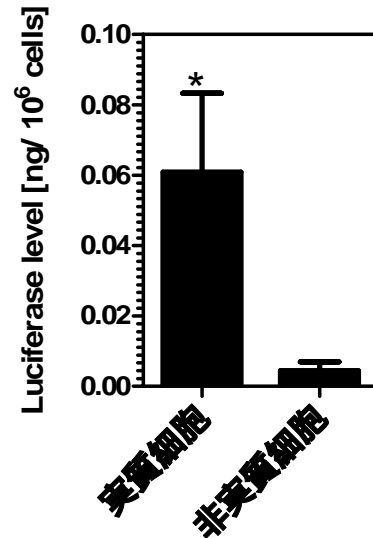


図 9 核酸導入される細胞種の検討

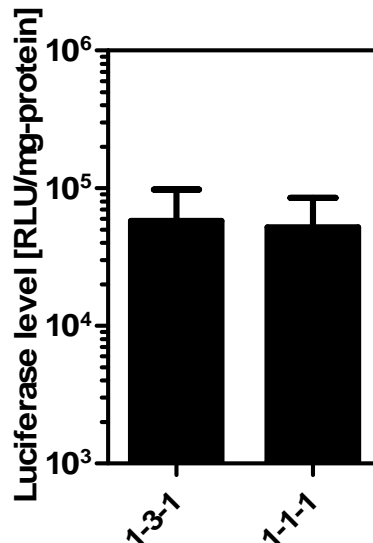


図 10 心臓への吸引圧法における圧力波形の発現量への影響

C-7. 心臓への吸引圧法の最適化：最少到達圧力の影響

次に心臓への吸引圧法において、発現量に対する最少到達圧力の影響を調べた。その結果、最少到達圧力が小さいほど、大きな発現量が得られ、-75 kPa以上では、その値がほぼ一定となることが分かった (図11)。

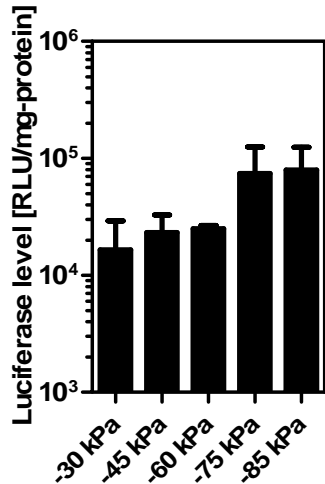


図 11 心臓の吸引圧法における最少到達圧力の影響

C-8. 心臓への吸引圧法の最適化：臓器特異性の検討

次に心臓への吸引圧法を行ったの臓器特異性を調べた。心臓への吸引圧法を行い、その6時間後に、心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を調べた。

結果を図12に示す。心臓においてのみ高いルシフェラーゼ発現量が得られた。これまでに吸引圧法の適用が可能であることが明らかになっている、脾臓、腎臓、肝臓においてはルシフェラーゼ発現がほぼ見られなかった。しかしながら、肺でわずかなルシフェラーゼ発現が検出された。

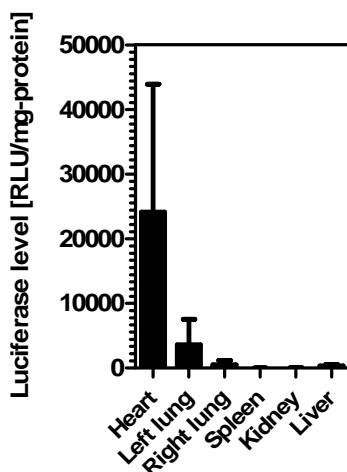


図 12 心臓の吸引圧法における臓器特異性の検討

吸引圧法の波形は、0.5-1-1で行った。

C-9. 心筋梗塞モデルマウスの心臓への吸引圧法

最後に、心筋梗塞モデルマウスの心臓に対して、吸引圧法を行い、梗塞部位周辺への核酸導入が可能であるかどうかを調べた。ルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを投与後、心筋梗塞モデルマウスの心臓の虚血部位を吸引デバイスで吸引した。その結果、ルシフェラーゼ発現量は、健常マウスを用いた場合と同等であった。このことから、吸引圧法は虚血部位を持つ心臓へも適用可能であることが明らかになった。

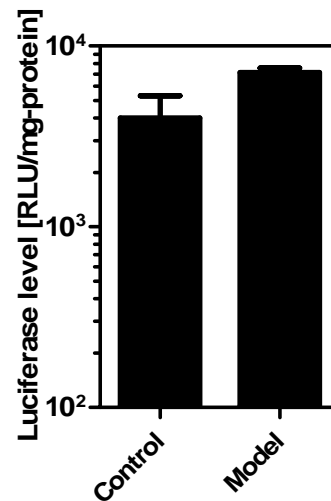


図 13 心筋梗塞モデルマウス心臓に対する吸引圧法

D. 考察

本研究では、初年度に完成させた吸引圧制御システムを用いて、肝臓への吸引圧法を行い、吸引圧法の基礎的な特性を明らかにした。初年度に、最少到達圧力が-5 kPaで十分な導入核酸発現量が得られることが明らかになっていたことから、本年度は同条件での肝障害性に対する検討も進め、-5 kPaでの肝組織吸引は深刻な肝障害性を与えないことをALT値、AST値の測定から明らかにした。また複数の吸引口を持つデバイスを製作し、同様に肝障害性を調べたが、いずれも-5 kPaの最小到達圧力において、深刻な肝障害性を与えなかった。このことから、

肝臓への吸引圧法は基本的に安全な手法であると考えられる。

最少到達圧力が導入核酸発現量の違いを生む大きな原因であることは明らかになったが、これが何に起因するのか、明らかになっていなかった。我々は、最少到達圧力が異なると、組織変形量が違うことに注目し実験を進めた。吸引口の面積は同じであるが、吸引口の数が異なるデバイスを作製して、それらを用いて同じ最少到達圧力で吸引圧法を行った。その結果、発現量の変化と組織変形量の変化に相関があることが明らかになった。このように我々は、吸引圧法において、組織変形が重要な因子であることを初めて示した。

またデバイスの硬さや形状を変化させることで、対象臓器に対して最適な吸引デバイスを開発可能なことを明らかにした。本研究では、2種の硬さの違うデバイスを用いたが、さらに硬さの違うデバイスを用いることで、それぞれの臓器に対して最適な硬さのデバイスを開発することができると思われる。

さらに本研究では、心臓への吸引圧法の最適化ならびに心疾患モデルマウスの治療への展開を進めた。心筋梗塞モデルの心臓への吸引圧法では、梗塞部位を中心に吸引したが、健常マウスの心臓への吸引圧法と同レベルの核酸導入量が得られ、疾患治療応用への可能性が見いだされた。

心臓への吸引圧法の際の臓器特異性を調べたところ、肺でわずかにルシフェラーゼ発現が確認された。左肺での発現量が右肺よりも大きいことから、心臓への吸引圧法を行う際に、意図せず、左肺を変形させてしまっていることが、非特異的な発現の原因であると考えられる。今後、心疾患の治療を考えた際は、心臓特異的に核酸導入するために手技の改良が必要である可能性がある。一方で、これまでに肺に吸引圧法が適用可能であることは報告されておらず、本研究により、吸引圧法の新たな適用可能臓器が見いだされた。

E. 結論

本年度は、マウス肝臓を対象に吸引圧法を行い、吸引圧法の特性を明らかに

した。また吸引圧法の安全性を肝臓を対象に調べ、最適条件での吸引圧法は肝臓に深刻な障害を与えないことを明らかにした。また吸引圧法では組織変形が重要因子であることを明らかにした。心臓への吸引圧法の最適化も進め、発現量を最大とする最少到達圧力を見出した(-75 kPa)。さらに心筋梗塞モデルマウスの心臓に対しても吸引圧法が適用可能であることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Shimizu, K., Zhang, G., Kawakami, S., Taniguchi, Y., Hayashi, K., Hashida, M., Konishi, S. *Liver suction-mediated transfection in mice using a pressure-controlled computer system.* Biological Pharmaceutical Bulletin, 37(4): 569-575 (2014)
Highlighted paper selected by Editor-in-Chief

学会発表

谷口陽太、川上茂、林昂司、清水一憲、小西聡、山下富義、橋田充：腎臓への吸引圧核酸導入法における吸引圧条件の最適化、遺伝子/デリバリー研究会 第13回シンポジウム、帝京大学、日本、2013年5月11日（土）

張光元、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：Hepatic suction-based site-specific transfection in mice : improving naked plasmid DNA transfer to the liver by optimization of suction conditions and device softness、日本薬学会 第28年会、愛知県産業労働センター、日本、2013年5月25日（土）

清水一憲、川上茂、張光元、谷口陽太、林昂司、木下秀之、桑原宏一郎、中尾一和、橋田充、小西聡：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法における吸引圧波形の検討、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、日本、2013年9月20日（金）

清水一憲、張光元、谷口陽太、小西聡、川上茂、橋田充：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法による疾患治療、化学工学会第79回年会、岐阜大学、日本、2014年3月18日（火）

依頼講演など

Kazunori Shimizu : Tissue Pressure-Mediated Delivery of Nucleic Acid-Based Drugs Using MEMS Devices、The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13)、Osaka International Convention Center、Japan、2013年7月5日（金）、口頭

清水一憲：In vivo遺伝子・核酸デリバリーのためのMEMSデバイスの開発、医療情報解析学セミナー、長崎大学、日本、2013年8月19日（月）、口頭

著書

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

特許取得

METHOD FOR OPERATING A DEVICE FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED, AND METHOD FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED

Inventor : Kazunori Shimizu, Satoshi Konishi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida

欧州出願：11835898.5

（出願日2013年5月21日）

実用新案登録

なし

その他

なし