

論文の要約

氏名 石川 昇平

論文題目

関節軟骨再生を志向した足場材料設計：シリカ不織布と機能性患部注入型ゲル

関節軟骨組織の損傷により疾患する変形性膝関節症は、我が国において2000万人を超える重大疾患の一つである。その治療のため現在では、生体外で軟骨細胞を増殖させその細胞を用いて欠陥組織に足場材料を生体内に直接注入し軟骨組織の代替を形成する低侵襲な組織再生手法が主に行われている。本研究では第一に生体外における軟骨細胞源確立のため、シリカファイバー(Silica nonwoven fabrics; SNFs, Cellbed®) 中における間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC) からの軟骨細胞分化を行った(第2章)。そして第二に移植材料設計のため、欠陥組織に直接注入可能な患部注入型(インジェクタブル)ゲルの設計を行った(第3章、第4章、第5章)。これら2通りの戦略を組み合わせ低侵襲な関節軟骨再生の実現を目的とした。

本論文は全6章により構成される。第1章では、軟骨組織再生に係る生体外、及び生体内での組織再生技術について提示すると共に、現時点での課題と組織工学的用途のため必須となる検討事項を論じ、本論文の目的について述べた。

第2章では、生体外における足場材料の一つとして注目を集めつつあり、今後の技術展開に有望なSNFsを用い、MSCからの軟骨分化挙動を追跡することで、関節軟骨細胞採取のための細胞源を確保することを目的とした。SNFsは、生体内のextracellular matrix (ECM)に模倣したファイバーの相互侵入構造により、培養する細胞のタンパク質産生向上、遺伝子発現向上など、生化学的シグナルを活性化するため、組織工学への有効性が実証されている。本章においては、SNFsの物性とMSCからの軟骨分化挙動を調査することで、SNFsの軟骨細胞源としての有効性を検討した。FITC-dextranを用いた物質透過性試験により、SNFsの物質透過性は高かったことから、軟骨分化培地に含まれるTGF- β などの成長因子もSNFs中を自由に透過可能であることが示唆された。この優れた物質透過性はSNFsの高い空隙率(95%以上)にあり、scanning electron microscope (SEM)観察においても均一なファイバー構造が観察されたことから、培養する細胞の三次元的な細胞伸展が可能である。実際に、MSCをSNFsに播種し培養すると、MSCは二次元培養平面で観察される増殖阻

害を伴うことなく、細胞が深さ方向に伸展し増殖したことから、この挙動に基づき MSC の軟骨細胞分化を促進すると予想される。期待通り MSC の軟骨細胞分化は、スフェロイド培養やアテロコラーゲン培養と比較し、関節軟骨の主細胞である硝子軟骨細胞への選択的な細胞分化が確認された。この挙動は、生体内 ECM 構造との高い類似性、かつその硬さにより、MSC からの軟骨細胞分化を促進したと考えられる。以上より、SNFs 中における MSC からの軟骨細胞分化は、生体外における有効な軟骨細胞回収手段であり、その細胞供給源としての利用可能性が示唆された。

第 3 章では、欠損部に直接足場材料を作成可能な低侵襲性の分解性インジェクタブルゲルの作成を目的とした。ゲルを作成する材料として、生体適合性に優れたバイオマテリアルとして多様な carboxymethyl chitosan (CH) を主骨格とする高分子と、人工合成材料の poly(ethylene glycol) (PEG) と poly(DL-lactide) (PLA) から構成されるトリブロック型高分子の末端を NHS で機能化した分解性架橋剤 NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を選択し、これら二成分を生理条件下で混合するだけで作成可能なインジェクタブルゲルの設計を着想した。分解性架橋剤 NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS は、2-tetrahydropyranyl (THP) で片末端保護した THP-PEG-OH を開始剤とする DL-lactide の開環重合と adipoyl chloride との縮合反応により THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP を合成し、引き続き THP の脱保護と NHS の末端機能化による最終生成物として合成した。合成した NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS と CH を混合すると、アミド結合の形成に基づき化学架橋を介したインジェクタブルゲルの形成が観察され、形成したゲルは、PLA のエステル加水分解に基づき緩やかに分解した。同時に、分解に伴い網目密度は時間経過毎に減少したことから、包埋する細胞に由来する ECM 蓄積増加などの組織再生を促す特性付与に成功したことも明確にした。軟骨細胞を包埋し培養後の細胞機能は、ECM 蓄積量も非分解性ゲルと比較し分解性ゲルにおいて向上し、さらに、関節軟骨組織に主に観察される II 型コラーゲン遺伝子の発現量も向上したことから、分解性ゲルの関節軟骨組織再生足場としての有効性を実証した。

第 4 章では、軟骨細胞機能をより向上させるため、微細構造により細胞機能を向上可能な自己組織化ペプチド(RADA16) ネットワークとの複合化に基づく相互侵入高分子(Interpenetrating polymer network; IPN) ゲルの one-pot 合成について述べた。RADA16 は、生理条件下に暴露すると物理架橋形成に基づき、生体内 ECM を模倣した三次元ネットワーク構造を迅速に形成する。その構造が生体内 ECM と類似しているため組織再生効率を向上させることから、CH ネットワークと複合化することで生体内環境をより模倣した組織再生足場の構築が期待される。そこで本章では、RADA16、CH、NHS-PEG-NHS の同時混合が、ゲル化メカニズムとゲル化速度の相違に基づき、双方のネットワーク形成を阻害することなく one-pot で IPN を形成すると予想した。各々単独のネットワーク形成挙動を動的粘弾性測定により詳細に評価したところ、RADA16 は超純水中ではなく生理条件下(PBS 150 mM, pH 7.4) において初めて電荷中和を介し迅速に自己組織化ネットワークを形成する一方、CH と NHS-PEG-NHS を混合した CH/PEG においては、溶媒環境に依存せず二成分間

の縮合反応を介した緩やかなネットワーク形成が確認された。これら三成分を同時混合すると、各々のネットワーク形成を阻害することなく時限的なネットワーク形成が観察されたことから、双方ネットワークのゲル形成メカニズムと速度の相違が、本 IPN の one-pot 形成を誘発することが実証された。さらに RADA16 の自己組織化に由来し形成する β -sheet 構造はゲル中で安定に長期間保持され、IPN ゲルの力学強度も、単独の RADA16 ゲルでは強度に乏しく脆弱だが、IPN 化することで二ヶ月間安定に維持していたことから、本材料選択による IPN ゲルの形成を強く支持し、包埋する細胞は RADA16 の繊維構造に由来し組織再生効率を向上することが期待される。実際に CH 溶液に軟骨細胞を包埋し、上述と同様の手順で IPN ゲルを合成すると、細胞毒性無く IPN ゲルに軟骨細胞が均一に包埋され、40 日間培養後のその機能は、RADA16 を含まない CH/PEG よりも、IPN ゲル中に包埋した軟骨細胞から産生されるタンパク質産生量が向上し、さらに関節軟骨組織特有の遺伝子発現も観察されたことから、ペプチドの繊維ネットワークに起因し本 IPN ゲルは軟骨組織再生に向け有用な足場となることが実証された。以上の結果より、本戦略を用いた IPN ゲル合成法は、通常的光照射を伴う多段階な IPN 形成手法とは異なり、低侵襲に軟骨組織の代替を作成可能な足場材料作成技術となることが示唆された。

第 5 章では、第 3 章で合成した分解性架橋剤と第 4 章で確立した IPN ゲルの合成法とを融合した分解性インジェクタブル IPN ゲルの one-pot 合成について述べた。分解性 IPN ゲルの合成も三成分を同時混合することにより達成され、第 4 章と同様に、多段階なネットワーク形成プロセスを介し IPN ゲルが形成され、さらに形成したゲルは非分解性ゲルと比較しても遜色無い IPN 形成挙動を有していたことから、ゲル化メカニズムと速度が異なれば IPN 形成を阻害することなく形成可能なことを示唆する。さらに形成した分解性 IPN ゲルは、生理条件下において徐々に分解し、分解と同時に網目密度も減少したことから、PLA のエステル加水分解に基づき分解する IPN ゲルの one-pot 合成を実証した。分解性 IPN ゲルに軟骨細胞を包埋し細胞機能を評価すると、軟骨由来のタンパク質産生量と遺伝子発現量が非分解性 IPN ゲルと比較し顕著に向上したことから、当初の目論見通り、IPN ゲルに分解性を付与することで軟骨細胞機能をより効率的に向上させ、低侵襲な次世代材料として本分解性 IPN ゲルは機能することを実証した。

第 6 章では第 2 章から第 5 章の内容の総括と今後の展望について述べた。第一に生体外での応用を志向とし SNFs 中での MSC の軟骨細胞分化挙動を評価することで軟骨細胞回収源としての足場材料有効性を実証し、第二に生体内での応用を志向とし、ゲル化メカニズムとゲル化速度に焦点を当て分解性インジェクタブル IPN ゲルを作成するという戦略は、組織再生に向け新たな足場作成技術を提供すると期待する。