

# 学位申請論文

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

2020 年 3 月

東京理科大学  
理学研究科化学専攻  
石川 昇平

目次	1
<b>第1章 序論</b>	5
1.1 研究背景	6
1.1.1 組織工学とバイオマテリアル	6
1.1.2 軟骨組織再生	7
1.1.3 間葉系幹細胞	8
1.1.4 三次元培養手法とインジェクタブルハイドロゲル	9
1.1.5 分解性ゲル	12
1.1.6 自己組織化ペプチドゲル	13
1.1.7 相互侵入高分子網目ゲル	15
1.2 本研究の目的	16
1.3 本論文の構成	18
第1章 参考文献	19
<b>第2章 シリカ不織布中における間葉系幹細胞の軟骨分化挙動解析</b>	28
2.1 緒言	29
2.2 実験	30
2.2.1 試薬、溶媒	30
2.2.2 SNFs の内部構造評価	31
2.2.3 SNFs の物質透過性評価	31
2.2.4 SNFs 中での MSC 培養と軟骨細胞分化	31
2.2.5 SNFs に対する MSC の細胞接着性評価	32
2.2.6 SNFs 中での MSC 形態観察	33
2.2.7 MSC の軟骨細胞分化挙動評価	33
2.3 結果と考察	35
2.3.1 SNFs の内部構造評価、透過性評価	35
2.3.2 SNFs 中における MSC 培養	36
2.3.3 SNFs 中における軟骨細胞分化	39
2.4 結論	41
第2章 参考文献	42
<b>第3章 分解性高分子架橋剤の作成と分解性インジェクタブルゲル中での軟骨細胞機能評価</b>	45
3.1 緒言	46
3.2 実験	47
3.2.1 試薬、溶媒	47
3.2.2 両末端反応性分解性架橋剤の合成	48

3. 2. 2. 1 THP-PEG- <i>b</i> -PLA-OH の合成	48
3. 2. 2. 2 THP-PEG- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -PEG-THP の合成	49
3. 2. 2. 3 OH-PEG- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -PEG-OH の合成	49
3. 2. 2. 4 NHS-PEG- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -PEG-NHS の合成	50
3. 2. 2. 5 NHS-PEG-NHS の合成	50
3. 2. 3 ゲル形成評価	51
3. 2. 4 ゲル化ダイナミクス解析	51
3. 2. 5 ゲルの力学強度、膨潤度評価	51
3. 2. 6 理論ゲル化含量評価	52
3. 2. 7 ゲルの分解挙動評価	52
3. 2. 8 ゲルの内部構造評価	53
3. 2. 9 ウシ膝軟骨細胞包埋型ゲルの作成	53
3. 2. 10 細胞形態観察	54
3. 2. 11 細胞生死観察	54
3. 2. 12 細胞数評価	55
3. 2. 13 sGAG 定量	55
3. 2. 14 COL 定量	55
3. 2. 15 代謝活性評価	56
3. 2. 16 H&E 染色、AB 染色	57
3. 2. 17 遺伝子発現評価	57
3. 3 結果と考察	58
3. 3. 1 両末端反応性分解性架橋剤の合成	58
3. 3. 2 ゲル化メカニズム及びゲル化速度評価	62
3. 3. 3 ゲルの分解挙動評価	66
3. 3. 4 ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価	67
3. 4 結論	75
第 3 章 参考文献	76
<b>第 4 章 インジェクタブル IPN ゲルの作成と軟骨細胞機能評価</b>	<b>78</b>
4. 1 緒言	79
4. 2 実験	80
4. 2. 1 試薬、溶媒	80
4. 2. 2 NHS-PEG-NHS の合成	80
4. 2. 3 RADA16 のゲル化評価	81
4. 2. 4 CH/PEG のゲル化評価	81
4. 2. 5 ゲル化ダイナミクス解析	81
4. 2. 6 $\beta$ -sheet 構造のゲル内形成評価	82
4. 2. 7 IPN ゲルのその他物性評価	82

4.2.8	ウシ膝軟骨細胞包埋型 IPN ゲルの作成	82
4.2.9	ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価	83
4.3	結果と考察	84
4.3.1	IPN ゲル形成評価	84
4.3.2	IPN 性に基づくゲル物性評価	87
4.3.3	ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価	90
4.4	結論	96
第4章	参考文献	97
第4章	補足	99
<b>第5章</b>	<b>分解性インジェクタブル IPN ゲルの作成と軟骨細胞機能評価</b>	100
5.1	緒言	101
5.2	実験	102
5.2.1	試薬、溶媒	102
5.2.2	ゲル物性測定	102
5.2.3	ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価	102
5.3	結果と考察	103
5.3.1	IPN ゲル形成評価	103
5.3.2	IPN 性に基づくゲル物性評価	105
5.3.3	ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価	109
5.4	結論	114
第5章	参考文献	115
<b>第6章</b>	<b>総括</b>	117
6.1	本論文の総括	118
6.2	今後の展望	120
	研究業績	121
	謝辞	128

## 略語一覽

AB: Alcian blue

CD: Circular dichroism

CH: Carboxymethyl chitosan

CLSM: Confocal lessor scanning microscope

COL: Collagen

DMAP: 4-(dimethylamino)pyridine

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMMB: Dimethylmethylene blue

DSC: *N,N'*-disuccinimidyl carbonate

ECM: Extracellular matrix

FBS: Fetal bovine serum

FDA: Food and drug administration

GPC: Gel permeation chromatography

H&E: Hematoxylin and eosin

IPN: Interpenetrating polymer network

MSC: Mesenchymal stem cell

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NHS: *N*-hydroxysuccinimide

PEG: Poly(ethylene glycol)

PLA: Poly(DL-lactide)

PNIPAM: Poly(*N*-isopropylacrylamide)

PPTS: Pyridinium *p*-toluenesulfonate

PS: Penicillin-streptomycin

PVA: Poly(vinyl alcohol)

QOL: Quality of life

SEM: Scanning electron microscope

sGAG: Sulfated glycosaminoglycan

SNFs: Silica nonwoven fabrics

TCPS: Tissue culture-treated polystyrene

TEA: Triethylamine

THP: Tetrahydropyranyl

ThT: Thioflavin T

# 第 1 章

## 序論

# 1.1 研究背景

## 1.1.1 組織工学とバイオマテリアル

近年、難治性の病や治療不可能な疾患を患う患者が急増し、機能不全の組織と代替組織を置換する試みが広く行われている。1990年代初頭から再生医療に関する研究が活発に行われ始め、Lange や Vacanti により組織を再生するためには培養する細胞、細胞を支える足場材料、細胞を培養する成長因子の3つの要素が再生医療に不可欠であると提唱された(図 1-1)。<sup>1</sup> 特に、足場材料は細胞と直接接触するためその物性は細胞機能に大きく影響を与え、結果として足場材料中での組織再生能力を決定することから、細胞や移植部位に毒性を与えない生体適合性に優れた足場材料の開発が急務である。<sup>2-6</sup> しかし、効率的に組織を再生可能な足場材料の開発は、未だ検討段階にあることが現状の課題である。

生体適合性に優れた代表的な足場材料として、バイオマテリアルが注目されている。バイオマテリアルとは、「生命を持たず医療器具に用いられ、生体との相互作用を意図された材料」のことを指し、我々生体組織に適用可能な素材(金属、セラミック、合成高分子、生体由来材料など)から構成される。<sup>7-11</sup> これらの材料は特に、多種多様な化学的、生物学的反応を介在する我々生体組織から着想を得、pH、還元反応、酵素反応、温度、光、機械的刺激などの物理的、化学的、生物学的なファクターに応答する特性を自在に付与可能なことから、これら物性を駆使し細胞機能を改善することを主目的とする組織工学への適用が望ましいと考えられる(図 1-2)。<sup>12-17</sup> しかし、バイオマテリアルを用いた医療適用への課題は様々存在し、最も、材料と細胞、そして組織間に作用する相互作用性の根本的な理解不足の解消が、バイオマテリアルを設計するための主課題である。従って、現代においても細胞挙動をコントロール可能な材料設計は大きな難題を抱えており、その開発、及び機構の提案は組織工学の進歩となる。

組織工学に対する近年の進歩は、刺激に応答するスマートマテリアルの開発である。<sup>18-20</sup> スマートマテリアル設計のための一つのアプローチはバイオマテリアルへ機能性ユニットを導入することであり、これにより、細胞接着、伸展、遊走などの、細胞機能制御が可能となる。<sup>14,21,22</sup> つまり、足場材料への物理的、化学的、生物学的特性の付与は細胞挙動を決定するため、スマートマテリアルの適用組織に応じた物性制御が不可欠である。例えば、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)などの多分化能を有する細胞は、材料の機械強度に応じた分化性を有し、かつその挙動は、細胞接着性を有する RGD 配列や生理活性物質などの生化学的ユニットの導入によっても影響を受ける。<sup>23</sup> また、軟骨組織などの生体内部組織再生のためには、生体外部から組織代替物を作成可能な患部注入型(インジェクタブル)の治療法が、近年最も簡便な治療法として着目されているため、適用組織、並びにその細胞に合わせたバイオマテリアル設計が必要である。



図 1-1. 組織工学の三要素.

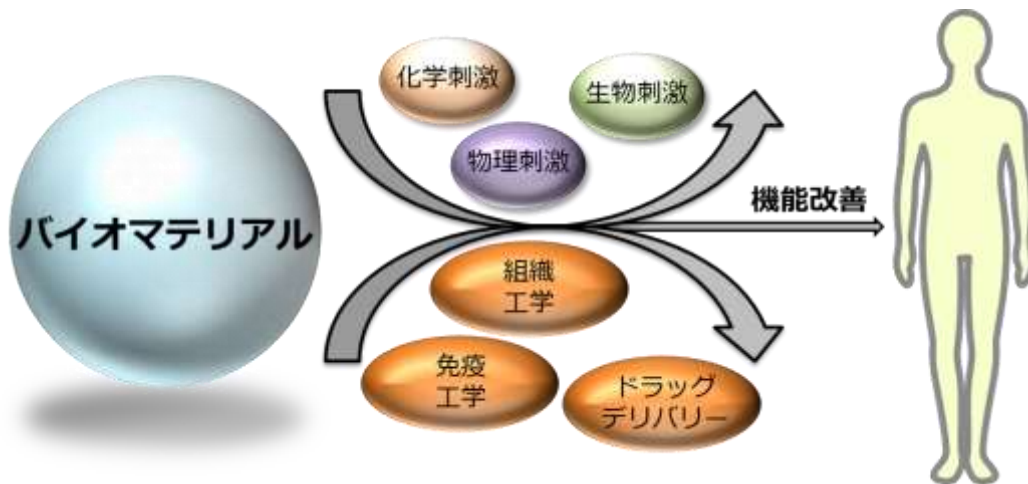


図 1-2. バイオマテリアルとその利用法.

### 1.1.2 軟骨組織再生

我々の生活を支持するための重要な組織として、関節軟骨組織が挙げられる。関節軟骨組織は粘弾性的な結合組織であり、骨同士の摩擦抑制、荷重に耐えうる柔軟性、さらに結合組織間の自由な移動を与える。<sup>24-27</sup> このような軟骨組織を形成する成分は主に、水、軟骨細胞(Chondrocyte)、さらに硬さや柔軟性に寄与するコラーゲン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス(Extracellular matrix: ECM) である(図 1-3)。しかし、軟骨組織が変形性膝関節症などの疾患に罹り損傷すると、軟骨組織の細胞密度の低さと低増殖性、無血管系が起因し、軟骨組織は自己修復的に再生することは不可能である。<sup>26,27</sup> 1950 年代から軟骨組織を代替する技術として、Pridie と Ficat らが軟骨の創面切除(Debridement) や軟骨下骨(Subchondral bone) の掘削(Drilling) などの新手法を開発した。<sup>28,29</sup> しかしこの手法は、機械強度に乏しい繊維性の軟骨を結果的に再生してしまうため、荷重に耐えうる



関節軟骨を再生することができない。後に出現した軟骨下骨から細胞を採取しその細胞を用いて組織を再生する微小破壊法(Microfracture)も同様に、患者自身の外科手術による高侵襲的な治療を伴い、かつ1年近い治療期間を要するため理想的な治療法とは言えない。<sup>30,31</sup>そこで現在では、軟骨組織を低侵襲的に再生する戦略として、生体内で軟骨組織を再生、または代替するような直接的な手法である組織再生技術、または生体外で準軟骨組織を作成しその後欠陥組織に移植するような間接的手法である組織工学技術の二通りの戦略が試みられている。代表的な組織工学的な手法であるセラミックなどを用いた無機金属代替法は、簡便に欠陥軟骨組織に埋め込むだけで軟骨組織の代替を作成できるが、耐用年数が5-10年と短く、金属の摩耗により痛みを伴うことから活発に動く我々にとっては通常生活の適用に相応しいとは言えない。<sup>32,33</sup>そこで、近年最も注目されている手法がインジェクタブル治療法である。この治療法は、患者自身の細胞と、高分子などの足場となる材料を懸濁させ、欠陥患部に注入するだけで軟骨組織の代替を作成可能な足場作成技術である。<sup>34,35</sup>この際、前述した物理的、化学的、または生物学的な刺激により高分子が自己組織化するような部位を導入しておけば生体内環境にตอบสนองし固形化するため、患者自身のQuality of life (QOL)を損なうことなく、低侵襲に軟骨組織の材代替を作成可能であり、さらには包埋する細胞に由来し軟骨組織の再生も可能である。

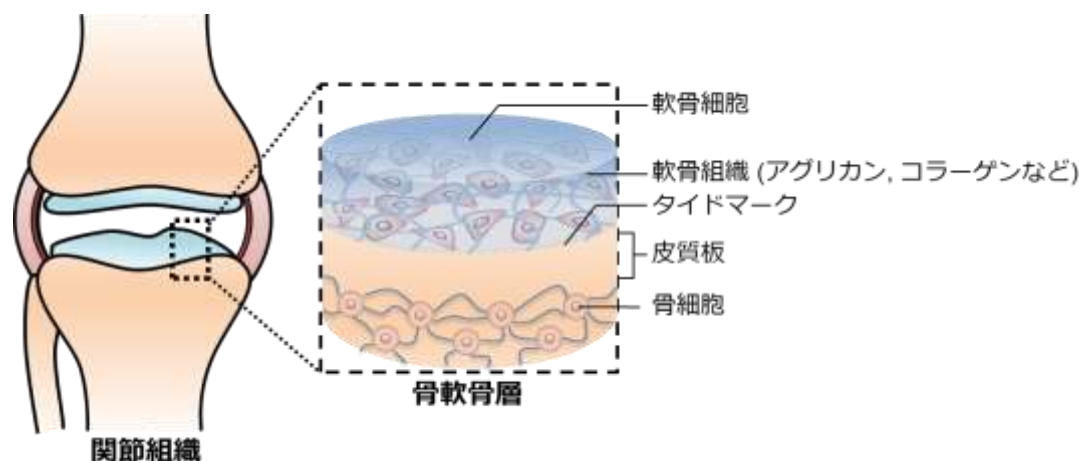


図 1-3. 軟骨組織概要図。

### 1.1.3 間葉系幹細胞

近年、幹細胞を用いた組織工学的応用に関する研究が広く行われている。<sup>36-38</sup>幹細胞とは様々な細胞への分化能を有する細胞の事を指し、現在では胚性幹細胞(Embryonic stem cells : ES 細胞)<sup>39,40</sup>や人工多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cell : iPS 細胞)<sup>41,42</sup>が再生医療のための研究題材として頻繁に使用されつつある。しかしながら、ES 細胞は受精卵の使用に伴う倫理上の問題があり、iPS 細胞は癌化の原因を完全に排除できていないため、再生医療へ安全に適用できるとは言い難い。そこで現在では、これらの課題を回避可能な MSC が注目されつつある。<sup>43-45</sup>MSC は、細胞源も骨髄や脂肪組織といった簡便に回収可能な組織であり、その使用も安全性が高く、脂肪細胞(Adipocyte)、筋細胞(Myoblast)、軟骨細胞(Chondrocyte)、骨芽細胞(Osteoblast)、線維芽細胞(Fibroblast)、間質細胞

(Stromal cell) など、様々な細胞への分化実績も十分なため、今後の再生医療への適用が期待されている(図 1-4)。<sup>46-51</sup>

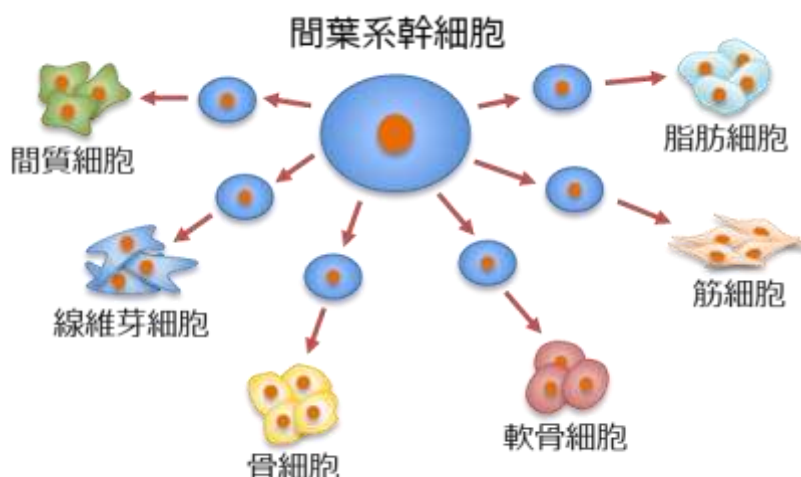


図 1-4. 間葉系幹細胞の分化.

### 1.1.4 三次元培養手法とインジェクタブルハイドロゲル

細胞の三次元培養手法は多様化しており、用途に応じた材料・技術選択が不可欠である。無機材料や有機材料の工学的手法により作成されるファイバー<sup>53-57</sup>や多孔体<sup>58-60</sup>は、成形加工を含むため生体外での組織再生に限定される一方、成形自由度の高いハイドロゲル<sup>61-69</sup>は、生体外のみならず生体内においてもその柔軟性のため、双方での応用に適合する。つまり、前者はその三次元構造を利用し、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など、様々な細胞への分化能を有する安全性の高い MSC などの多分化細胞を培養し生体外で分化させ分化細胞を取得しそれを組織再生用の細胞として用いる利用法に優れており、後者は患者自身の細胞を用い生体内に直接、足場材料成分と共に注入しゲルを形成させその場での軟骨組織再生に取り組む利用法が、好ましい使用用途の区別と言える。

これら材料の中で特に、親水性高分子の架橋により三次元ネットワークを形成し、多くの水を含むハイドロゲルは、生体適合性材料として組織再生のため最も広く用いられている。<sup>61-69</sup> ハイドロゲルはその三次元構造のため二次元材料とは異なる特徴を有しており、さらには生体適合性や物質透過性など、生体内環境を再現可能な物性を付与可能のため足場材料のみならず、DDS キャリア、癒着防止剤など多種多様な応用に有用なバイオマテリアルである(図 1-5)。ハイドロゲルへの機能性ユニットの導入は、物理的、化学的、生物学的な特性の制御と、外部環境に応答する材料の創製を可能とし、酵素、細胞、他の刺激と相互作用すると独特な機能や物理的・化学的变化を誘発可能な材料へと発展する。<sup>70,71</sup>

近年では、天然、または合成材料により設計されたインジェクタブルハイドロゲル(Injectable hydrogel) が、軟骨組織再生のため最も研究されている材料である(表 1-1)。<sup>72-77</sup> 本技術は、低侵襲に生体組織の代替を作成可能な足場材料となり得、軟骨組織再生に係る高侵襲性、または繊維軟骨誘導性など複雑な課題を解決可能な材料である(図 1-6)。<sup>72-77</sup> さらに、注入の前段階として細胞や生理活性物質をゲル前駆体に導入することにより、内包する物質の均一な分散を保持しつつ、ゲル内

への包埋も可能なことから、高侵襲手術をすることなく軟骨細胞の欠陥組織への包埋と固定を実現する(図 1-6)。インジェクタブルゲル作成のための材料として、キトサン(Chitosan)<sup>78,79</sup>、コラーゲン(Collagen)<sup>80,81</sup>、ゼラチン(Gelatin)<sup>82,83</sup>、アルギン酸(Alginate)<sup>84</sup>、ヒアルロン酸(Hyaluronic acid)<sup>85</sup>、ヘパリン(Heparin)<sup>86,87</sup>、コンドロイチン硫酸(Chondroitin sulphate)<sup>88,89</sup>、シルクフィブロイン(Silk fibroin)<sup>90,91</sup>、ポリエチレングリコール(Poly(ethylene glycol) (PEG))<sup>92,93</sup>、ポリビニルアルコール(Poly(vinyl alcohol) (PVA))<sup>94</sup>、ポリナイパム(Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM))<sup>95,96</sup>などの生体適合性と生分解性、さらに ECM 類似性を有する天然材料、または修飾官能基の種類や数に依存し力学強度や分解性を制御可能な合成材料が使用されており、これらの材料を物理的、または化学的な手法を駆使することで機能性インジェクタブルゲルの作成が可能である。物理的な手法で調製されたインジェクタブルゲルは、迅速にゲルを形成する一方、化学的な手法で調製されたゲルは一般的に共有結合に基づき緩やかにゲル化する。<sup>97,98</sup> これらインジェクタブルゲル作成の具体的な手法として、酵素架橋<sup>99,100</sup>、光架橋<sup>101,102</sup>、シッフ塩基架橋<sup>103,104</sup>、マイケル付加架橋<sup>105,106</sup>、クリック架橋<sup>107,108</sup>、イオン架橋<sup>109,110</sup>、pH 架橋<sup>111,112</sup>、温度架橋<sup>113,114</sup>が挙げられる(図 1-7)。このように、多種多様な材料やゲル化手法が軟骨組織再生のため利用されているが、物理的、化学的手法を組み合わせ生体環境に近い材料を、ネットワーク形成システムを制御することで調製し、複雑な軟骨組織再生に取り組むことこそが効率的に組織を再生するための近道だと言える。しかしながら、物理的、化学的手法を駆使しても、生体外または生体内においてゲルに包埋した細胞に対し、組織再生に対するシグナル伝達に乏しいことが現状の課題の一つである。

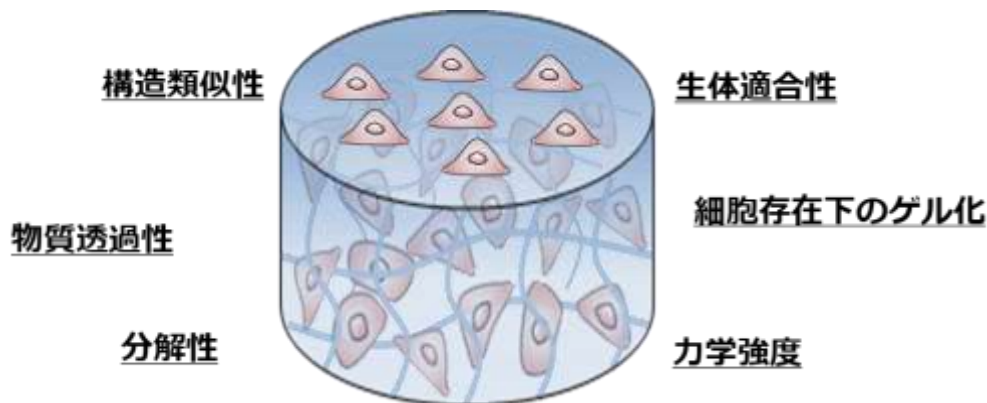


図 1-5. ハイドロゲルとその特性.

表 1-1. ゲルを作成可能な天然材料、または合成材料.

高分子	利点
コラーゲン	細胞外マトリックスの構成成分, 骨分化性, 高吸収性
ゼラチン	安価, コラーゲンと比較し低免疫性, 高生体適合性, 容易な機能化
キトサン	グリコサミノグリカンとの構造類似性, 抗菌特性
ヒアルロン酸	細胞外マトリックスの構成成分, 高い水和性, 優れた細胞包埋性, 血管新生促進
ヘパリン	容易な機能化, 抗凝固性, 非炎症性
アルギン酸	容易な機能化, キレート特性, pH 応答性
シルクフィブロイン	生体適合性, 高吸収性, 低免疫性, 高強度, 容易な機能化
コンドロイチン硫酸	細胞外マトリックスの構成成分, 非炎症性, 細胞認識性
PLGA	生分解性, 低免疫性, FDA 承認化合物
PEG/PEO	高い生体適合性, 容易な機能化, 非タンパク質吸着性, FDA 承認化合物
PVA	高水溶性, 高強度
PNIPAM	温度応答性, 容易な機能化

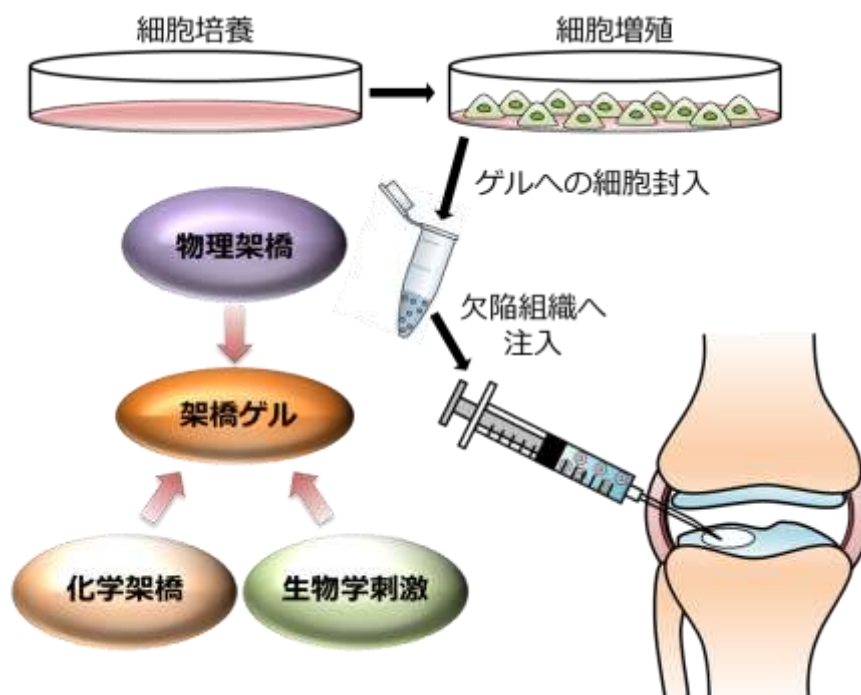


図 1-6. インジェクタブルゲルを用いた軟骨組織再生.

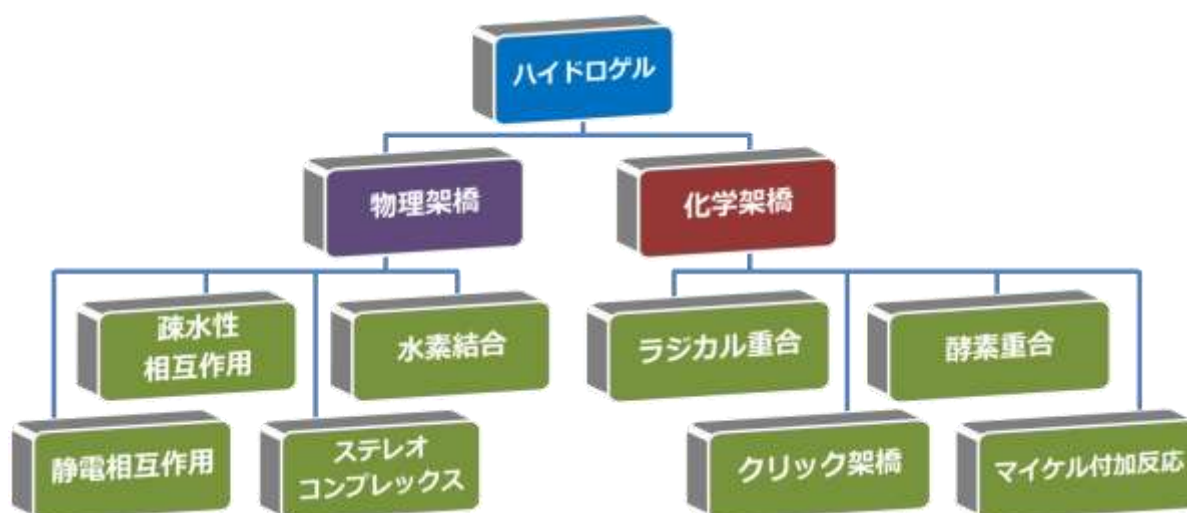


図 1-7. ゲルの架橋形式.

### 1.1.5 分解性ゲル

インジェクタブルゲルを介し作成した足場材料は、欠陥組織にて組織再生後、異物認識となり炎症反応を引き起こす可能性があるため分解され完全に代謝される必要がある。<sup>115-117</sup> 分解の駆動力は、エステル加水分解<sup>118,119</sup>、酵素加水分解<sup>120,121</sup>、光分解<sup>122,123</sup> など、物理化学的、生化学的な要素が含まれ、各々の用途に合わせた望ましい分解性が求められる。組織工学用途においてゲル分解性は、包埋する足場材料内での増殖や遊走するための空間を与え、生体内の ECM 環境を模倣するためタンパク質の産生増加を誘発することから、効率的に組織を再生するには足場材料に分解特性を付与

することが不可欠である(図 1-8)。<sup>124,125</sup> その分解を誘発する分子として、アメリカ食品医薬局(Food and drug administration: FDA) にも承認されている分子である DL-lactide が最も安全な分解性分子として注目されている。DL-lactide の高分子化により生成する poly(DL-lactide) (PLA) は、生分解性プラスチックの一種であり、水分により加水分解を受け低分子化し、最終的に二酸化炭素と水に分解される低毒性な高分子のため、産業的用途のみならず組織工学的用途にまで応用の幅を広げ利用されている。<sup>126-130</sup> Peng らは、PLA の共重合体を用いハイドロゲルを作成し、ゲル分解性の有無により包埋する細胞の軟骨組織再生効率を調査したところ、分解性ゲルにおいて非分解性ゲルと比較し、包埋する細胞のタンパク産生量が向上し遺伝子発現量も顕著に向上したこと、かつゲル中の ECM 蓄積量まで向上したことから、分解性ゲル中での軟骨組織再生効率向上を提案している。<sup>131</sup> このようにゲルへの分解性付与は、低侵襲性の獲得のみならず、包埋する細胞に対し組織再生効率を向上させるため、分解性を付与したインジェクタブルゲルの開発が求められる。

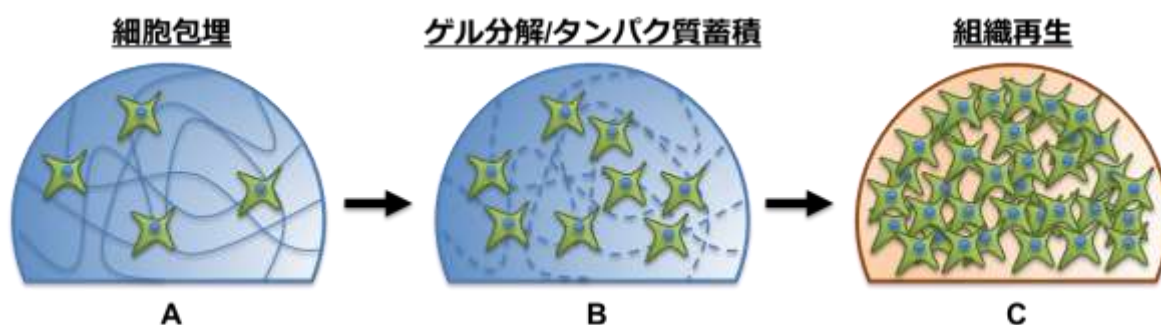


図 1-8. 分解性ゲル.

### 1.1.6 自己組織化ペプチドゲル

ペプチドはその生体適合性のため、医療用途への応用を志向とし自己組織化構造を構築可能な万能な材料として注目されている。<sup>132-136</sup>  $\beta$ -sheet 構造を形成するペプチドは、分子内の水素結合を介し一次元的に集合し、その一次構造同士が相互作用することで三次元ネットワークを形成するため、インジェクタブルゲルとして用いられる材料の一つである。<sup>132-136</sup> これらのペプチドは、分子内に疎水性と親水性セグメントが両局在しているため、分子内、または分子間で相補鎖として機能する。結果として形成される疎水性と親水性を有するペプチドの二次構造の疎水側はファイバーの内側に、親水側はファイバーの外側を構成することで水分子と相互作用し、その結果、多量の水を含むハイドロゲルを形成する。このように自己組織化ペプチドは、含水性に優れた親水性の三次元構造を形成するため、組織再生足場として有用である。

代表的な自己組織化ペプチドとして RADA16 (PuraMatrix™) が注目されている。<sup>137-141</sup> RADA16 は、アルギニン(R)、アラニン(A)、アスパラギン酸(D)、アラニン(A) の繰り返し構造を有する 16 残基のアミノ酸配列からなり、上記のように水中で  $\beta$ -sheet 構造を形成し即座に三次元足場材料となる(図 1-9)。この迅速な自己組織化は中性 pH、またはミリモラーの塩を含む水溶液中にて生じるため、注射器などにより RADA16 を注入することが可能であり、注入後は物理的相互作用に基づ

き自己組織化する。ペプチドの電荷は、正、負、正、負のように交互に配列しており、正電荷をもつアルギニンと負電荷をもつアスパラギン酸との静電的な相互作用によりペプチド分子同士が近づき、中性アミノ酸であるアラニンの側鎖間で疎水結合が形成されること、そして隣り合う分子の相対的な位置を正負の電荷が分布制御することでゲル化する。一般的にゲル化の条件は、電荷や疎水性のバランス、ペプチド鎖の長さによって決定される。これらの観点から RADA16 は、アルギニン(R) とアスパラギン酸(D) の pKa は水中においてそれぞれ 12.5、3.9 と相補鎖として働きやすく、その間にアラニン(A) を組み込んだ 16 残基のアミノ酸で構成されているため、安定化エネルギーが高く安定なゲルを形成する。具体的な自己組織化挙動を図 1-9 に示す。水中において RADA16 は分散状態にあり、生理条件下に暴露されると水素結合、疎水性相互作用、イオン結合などの多様な相互作用を介しペプチド同士が逆  $\beta$ -sheet 構造を形成し一時的に配列し、それらが疎水性相互作用により疎水部を内側に親水部を外側に配向した構造を形成した後、ファイバー構造が構築されることで三次元的な網目構造を形成する。形成するネットワークの長さは 1000 nm、ポアサイズ 10-20 nm 程度の生体内環境を模倣したネットワーク構造を有するため、その構造が包埋する細胞の組織再生効率を向上させる。しかしながら、形成するゲルの硬さは、約 50 Pa 程度であり、単独の RADA16 ゲルでは力学強度に乏しく細胞包埋用の足場として応用することは難しい。<sup>137, 138</sup>

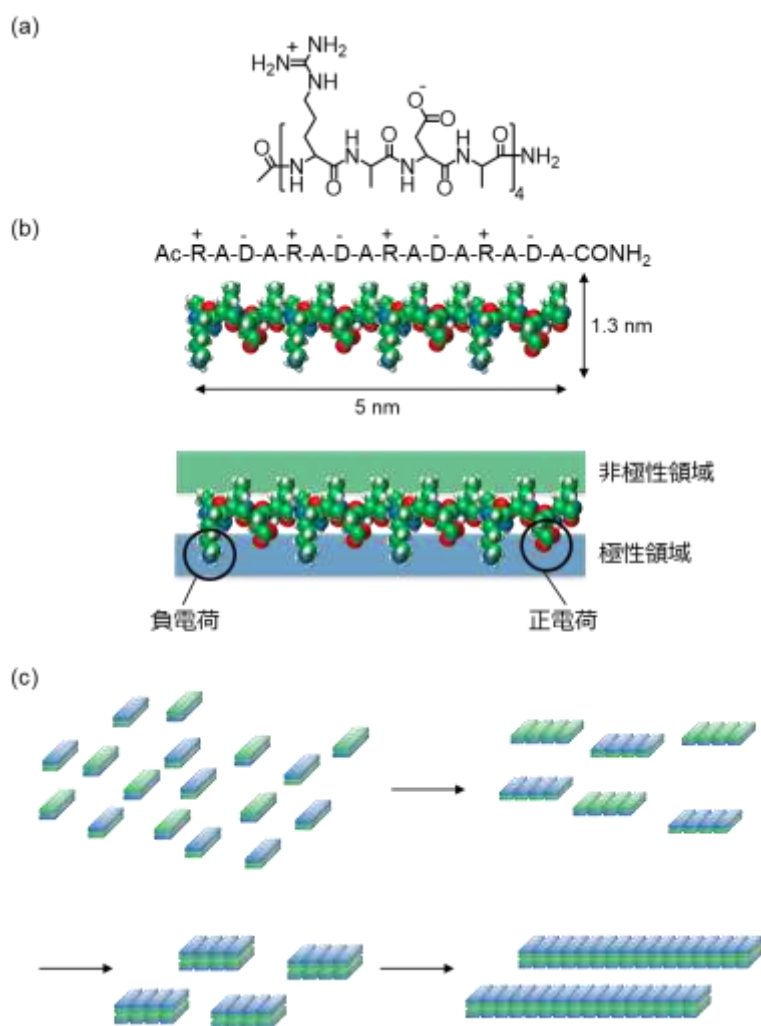


図 1-9. RADA16 (PuraMatrix™) の(a) 構造式, (b) 分子構造, (c) 自己組織化挙動.

### 1.1.7 相互侵入高分子網目ゲル

近年の報告では、ハイドロゲルから成る生体内の ECM 環境を模倣した再生医療材料の開発が広く行われている。<sup>65-69</sup> 我々の ECM は、細胞の周囲に非等方的かつ階層的なネットワーク構造を形成しているため、細胞や周辺組織との機械的かつ生物学的な相互作用を可能としている。それら構造は、高分子量の生理活性分子で架橋された相互侵襲高分子網目(Interpenetrating polymer network: IPN)構造を形成し、生体由来の組織構造の維持、または生理活性を維持している。IPN 構造とは、二種、またはそれ以上の高分子ネットワークから構成される複合ネットワークを指し、それらのポリマーは互いに物理的・化学的相互作用無く独立なネットワーク構造を有している(図 1-10)。<sup>142-146</sup> この IPN 構造を有するゲルは、その材料特有の機能を持つ生体高分子、または合成高分子から構成されると、多機能なゲルが構築されるため新たな技術として近年注目されている。現在提唱されている IPN ゲルの合成方法として、(i) IPN を構成する材料を同時に混合し形成させる方法、(ii) 一つのネットワークを形成させたゲルを構築した後、モノマー溶液に浸漬させもう一方のネットワークを形成させる方法の二通りに大別される。これらのゲルは二種ネットワークの複合化により単一のネットワークよりも力学強度が増強しゲル安定性に優れる一方、通常の合成法では光開始剤などの使用に伴うラジカルの発生により細胞毒性を伴う事、さらには温度や pH などの外部刺激によるゲル合成法は、IPN 形成のため長時間を伴う(~2 h) 事など、組織再生用途には適さない。<sup>147-149</sup> IPN ゲルを作成するための材料として、上記に挙げた PEG や PVA などの合成材料、agarose、chitosan、gelatin、fibrin、hyaluronic acid などの天然材料が用いられてきた。<sup>142-146</sup> 組織再生に優れるが力学強度に乏しい天然材料を、強度の担保が可能な合成材料で補填するこの戦略は、強度に乏しい材料でも網目複合化により力学強度を向上させ、長期的間、構造を保持可能な特性を付与可能なものの(図 1-10)、未だに光照射に依存した合成法が多く、低侵襲で足場材料を作成可能な IPN ゲルの作成法は未だ確立されていない。そこで、組織再生に優れた IPN ゲルを *in-situ* で作成出来れば、新規な合成技術となり優れた組織再生を促す足場の作成が期待される。

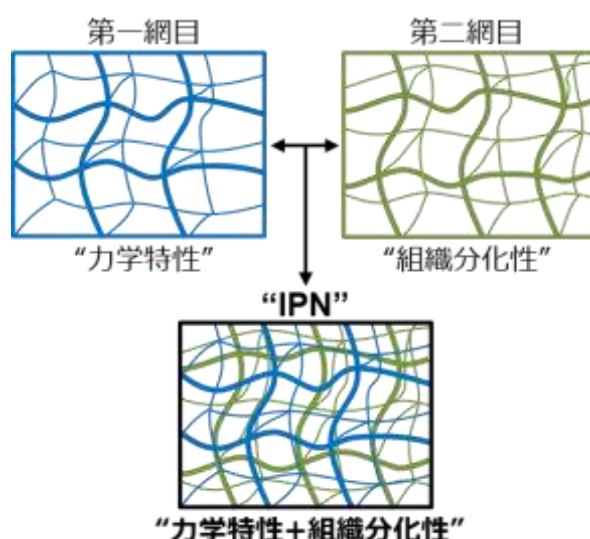


図 1-10. IPN ゲルの特徴.



## 1.2 本研究の目的

本研究では、関節軟骨組織再生に不可欠な軟骨細胞注入型の低侵襲性治療法に焦点を当て、軟骨細胞を大量に確保するための細胞源の選定と、軟骨細胞と共に欠陥患部に注入し軟骨組織の代替を直接作成可能な足場材料の設計を目的とした。

まず、生体外での関節軟骨再生用の細胞取得に焦点を当て、スクリーニングや組織再生などの三次元足場材料として商用されているシリカファイバー(Silica Nonwoven fabrics; SNFs, Cellbed<sup>®</sup>)を用い、様々な細胞へ分化能を有する MSC からの軟骨分化機能を評価した。SNFs は相互侵入する独自のファイバーネットワーク構造を有し、その構造が生体内の微細な ECM 構造と類似しているため、ECM を模倣した優れた培養環境を有している。このような三次元環境を有する SNFs に MSC を播種し、TGF- $\beta$  やアスコルビン酸などの軟骨細胞への分化因子を含む培地で培養すると、SNFs 独自のファイバーネットワーク構造が MSC の軟骨分化を促進すると予想した。使用の際極めて安全性の高い MSC の生体外での軟骨細胞分化を達成することで、本国において需要の高い関節軟骨組織再生への細胞供給源の確保が期待され、他家細胞の使用による炎症性などの副作用の心配なく、一つの細胞源から複数人の軟骨組織の再生を可能とする。また、現在臨床的に軟骨組織再生のため応用されているアテロコラーゲンゲルは、動物由来の天然材料であるため炎症反応を惹起する可能性を含み、かつその収縮性も懸念されている。<sup>150,151</sup> 一方で、SNFs は人工の無機材料であるため毒性の懸念無くかつ、構造的に安定なことから、SNFs 中での MSC の軟骨細胞への分化は、安全性に優れ実行されると期待した。

次に、生体内で軟骨組織の代替を作成可能な手法に焦点を当て、*in-situ* 型のインジェクタブルゲルの作成を着想した。このゲルを構成する成分として、軟骨組織に含まれるグリコサミノグリカンとの構造類似性のため軟骨再生への相性に優れた CH を主骨格として用い、三次元ネットワークを形成するよう加水分解性高分子を架橋剤として用いた、二成分混合型の分解性インジェクタブルゲルを設計することで、生体内に直接軟骨組織の代替を作成可能な足場材料の確立を期待した。その分解性架橋剤として、PEG と PLA からなるトリブロック型共重合体の末端を *N*-hydroxysuccinimide (NHS) で機能化した NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を設計し、引き続き CH との混合がアミド結合形成を介するインジェクタブル性の確保に寄与する。このゲル化システムにより、CH 溶液とウシ膝軟骨細胞を懸濁させ外部刺激なく、簡便にウシ膝軟骨細胞をゲル中に包埋可能なため、生体内に直接注入可能な足場材料の作成を期待した。さらに、PLA 部位の導入に基づくゲルへの分解性付与は、生体内におけるゲル形成後の加水分解を促し、切開を介する高侵襲手術をすることなくゲルを回収可能なため、低侵襲な軟骨組織再生を実現する。この実現のみならずゲル分解性は、包埋する細胞の機能を向上させることが広く周知のため、分解性による組織再生効率向上も期待した。

次に、本ゲル化システムを用い組織再生効率を向上させるため、形成する微細ネットワークにより細胞機能を向上可能な RADA16 との複合化を着想し、CH ネットワークとの複合化に基づくインジェクタブル IPN ゲルの合成を検討した。本戦略では、光照射などの外部刺激を伴わない物理架橋に基づく RADA16 の自己組織化原理と、CH と PEG 架橋剤(NHS-PEG-NHS) の化学架橋に基づく縮合原理を組み合わせた、ゲル化メカニズムとゲル化速度の相違の利用が、従来 IPN 合成法では叶わない *in-situ* で生体内に直接軟骨組織の代替を形成可能と期待した。本システムは、細胞無

毒なゲルへの包埋かつ生体内へのゲル移植が可能のため、生体内応用に向け効率的な組織再生を実現する足場としての利用が期待される。

最後に、組織再生効率をより一層高めるため、前述の分解性架橋剤と IPN 形成システムを駆使した分解性インジェクタブル IPN ゲルの合成を検討した。ゲルへの分解性付与と IPN 形成システムの組み合わせは、低侵襲性治療の実現のみならず、組織再生効率をより一層向上させると期待した。

以上の段階的な戦略を適用し、関節軟骨細胞源の確保と生体内で直接軟骨組織の代替を作成可能な再生医療技術を設計することで、本国において需要の高い関節軟骨組織再生のため、新たな基盤技術の導入を目的とした。

## 1.3 本論文の構成

本論文は全6章で構成されている。

第1章では、組織工学や組織再生の進展に伴う概念や材料の変遷を解説し、関節軟骨組織再生のための三次元足場材料の有効性について述べた。

第2章では、生体外での関節軟骨細胞源の確保を目的とし、SNFs 中での MSC からの軟骨分化挙動について解説する。SNFs の内部構造や物質透過性などの材料物性を評価し、MSC を SNFs に播種し軟骨分化培地にて培養した後、軟骨分化に関する遺伝子の定量により SNFs の軟骨細胞回収源としての足場材料の有効性を検討する。

第3章では、生体内で直接軟骨組織を形成可能な技術の確立を目的とし、*in-situ* 型分解性インジェクタブルゲルの作成について解説する。材料設計指針として、バイオマテリアルとして利用実績豊富な CH に対し、合成した分解性架橋剤を適用することで、二成分混合型のインジェクタブルゲルを作成する。分解性架橋剤は、生体適合性に優れた PEG と PLA から成るトリブロック型架橋剤であり、合成手法も新規である。その架橋剤を用い CH を主骨格とする分解性インジェクタブルゲルを作成した後、力学強度、ゲル分解性などのゲル物性を評価する。最後に、分解性 CH ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能を生化学的な評価法を用いることで、軟骨 ECM 特有なタンパク質である硫酸グリコサミノグリカンとコラーゲンの産生量を定量し、さらに遺伝子発現に関して評価する。

第4章では、CH を主骨格とするゲルと RADA16 ゲルとのネットワーク複合化により達成される IPN ゲルの合成について解説する。ゲル化メカニズムとゲル化速度の相違に基づく IPN 形成実証のため、CH、PEG 型架橋剤、RADA16 を同時混合した際のゲル化を確認し、形成するゲルの力学強度、ペプチド安定性など、IPN を形成した際の基本的な物性を評価する。さらに、IPN ゲルにウシ膝軟骨細胞を包埋し培養した際の細胞機能を評価することで、ペプチドネットワークとの IPN 化について実証し、本戦略の有効性を検討する。

第5章では、第3章、第4章で確立した戦略と材料を組み合わせ、分解性インジェクタブル IPN ゲルの合成について解説する。適用する戦略はゲル化メカニズムとゲル化速度の相違に基づく IPN 形成原理を適用し、分解性付与には PLA 導入型 PEG 架橋剤を用いる。同様に IPN ゲルを形成しゲル物性を評価した後、ウシ膝軟骨細胞を包埋し培養した際の細胞機能を評価することで、本システムと分解性により細胞機能に与える相乗効果を実証し、低侵襲かつ効率的に軟骨組織を再生可能な再生医療材料の確立を目的とした。

第6章では、これらの総括と将来への展望を述べ、本論文をまとめる。

## 参考文献

1. Langer, R.; Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **1993**, *260*, 920-926.
2. Hollister, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 518-524.
3. Stevens, M. M.; George, J. H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* **2005**, *310*, 1135-1138.
4. Yang, S.; Leong, K. F.; Du, Z.; Chua, C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 679-689.
5. Huang, B. J.; Hu, J. C.; Athanasiou, K. A. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* **2016**, *98*, 1-22.
6. Loh, Q. L.; Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2013**, *19*, 485-502.
7. Lv, S.; Dudek, D. M.; Cao, Y.; Balamurali, M. M.; Gosline, J.; Li, H. Designed biomaterials to mimic the mechanical properties of muscles. *Nature* **2010**, *465*, 69-73.
8. Franz, S.; Rammelt, S.; Scharnweber, D.; Simon, J. C. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6692-6709.
9. Witte, F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1680-1692.
10. Burg, K. J.; Porter, S.; Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2347-2359.
11. Subramanian, A.; Krishnan, U. M.; Sethuraman, S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 108.
12. Liu, M.; Zeng, X.; Ma, C.; Yi, H.; Ali, Z.; Mou, X.; Li, S.; Deng, Y.; He, N. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res.* **2017**, *5*, 17014.
13. Montgomery, M.; Ahadian, S.; Davenport Huyer, L.; Lo Rito, M.; Civitarese, R. A.; Vanderlaan, R. D.; Wu, J.; Reis, L. A.; Momen, A.; Akbari, S.; Pahnke, A.; Li, R.; Caldarone, C. A.; Radisic, M. Flexible shape-memory scaffold for minimally invasive delivery of functional tissues. *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 1038-1046.
14. Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A. Advances in engineering hydrogels. *Science* **2017**, *356*, eaaf3627.
15. Saravanakumar, G.; Kim, J.; Kim, W. J. Reactive-oxygen-species-responsive drug delivery systems: promises and challenges. *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600124.
16. Liu, J.; Pang, Y.; Zhang, S.; Cleveland, C.; Yin, X.; Booth, L.; Lin, J.; Lee, Y.-A. L.; Mazdiyasni, H.; Saxton, S. Triggerable tough hydrogels for gastric resident dosage forms. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 124.
17. Tang, L.; Zheng, Y.; Melo, M. B.; Mabardi, L.; Castano, A. P.; Xie, Y. Q.; Li, N.; Kudchodkar, S. B.; Wong, H. C.; Jeng, E. K.; Maus, M. V.; Irvine, D. J. Enhancing T Cell therapy through TCR-signaling-responsive nanoparticle drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 707-716.
18. Tibbitt, M. W.; Langer, R. Living biomaterials. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 508-513.
19. Fenton, O. S.; Olafson, K. N.; Pillai, P. S.; Mitchell, M. J.; Langer, R. Advances in biomaterials for drug delivery. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1705328.

20. Holzapfel, B. M.; Reichert, J. C.; Schantz, J. T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Noth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Hutmacher, D. W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 581-603.
21. Aguado, B. A.; Grim, J. C.; Rosales, A. M.; Watson-Capps, J. J.; Anseth, K. S. Engineering precision biomaterials for personalized medicine. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, eaam8645.
22. Kaczmarek, J. C.; Kowalski, P. S.; Anderson, D. G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med.* **2017**, *9*, 60.
23. Ruskowitz, E. R.; DeForest, C. A. Photoresponsive biomaterials for targeted drug delivery and 4D cell culture. *Nat. Rev. Mater.* **2018**, *3*, 17087.
24. Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Chichester, C. O.; Pittenger, M. F. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* **1998**, *4*, 415-428.
25. Armiento, A. R.; Stoddart, M. J.; Alini, M.; Eglin, D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: learning from biology. *Acta Biomater.* **2018**, *65*, 1-20.
26. Balakrishnan, B.; Banerjee, R. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev.* **2011**, *111*, 4453-4474.
27. Mödinger, Y.; Löffler, B.; Huber-Lang, M.; Ignatius, A. Complement involvement in bone homeostasis and bone disorders. *Semin. Immunol.* **2018**, *37*, 53-65.
28. Pridie, K. H.; Gordon, G. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J. Bone Joint Surg. Br.*, **1959**, *41*, 618-619.
29. Ficat, R. P.; Ficat, C.; Gedeon, P. J.; Toussaint, B. Spongialization: a new treatment for diseased patellae. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **1979**, *144*, 74-83.
30. Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; Briggs, K. K.; Rodrigo, J. J. The microfracture procedure: rationale, technique, and clinical observations for treatment of articular cartilage defects. *J. Sports Traumatol. Relat. Res.* **1998**, *20*, 61-70.
31. Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; Singleton, S. B.; Briggs, K. K. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Oper. Tech. Orthop.* **1997**, *7*, 300-304.
32. Kay, S.; Thapa, A.; Haberstroh, K. M.; Webster, T. J. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. *Tissue Eng.* **2002**, *8*, 753-761.
33. Jiang, J.; Tang, A.; Ateshian, G. A.; Guo, X. E.; Hung, C. T.; Lu, H. H. Bioactive stratified polymer ceramic-hydrogel scaffold for integrative osteochondral repair. *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 2183-2196.
34. Zhang, X.; Zhang, W.; Yang, M. Application of hydrogels in cartilage tissue engineering. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2018**, *13*, 497-516.
35. Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K. A.; Marra, K. G. Injectable *in situ* forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2499-2506.
36. Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell Physiol.* **2007**, *213*, 341-347.
37. Lutolf, M. P.; Gilbert, P. M.; Blau, H. M. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* **2009**, *462*, 433-441.

38. Tuan, R. S.; Boland, G.; Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* **2003**, *5*, 32-45.
39. Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145-1147.
40. Boyer, L. A.; Lee, T. I.; Cole, M. F.; Johnstone, S. E.; Levine, S. S.; Zucker, J. P.; Guenther, M. G.; Kumar, R. M.; Murray, H. L.; Jenner, R. G.; Gifford, D. K.; Melton, D. A.; Jaenisch, R.; Young, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **2005**, *122*, 947-956.
41. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663-676.
42. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861-872.
43. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, *284*, 143-147.
44. Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L.; Schwartz, R. E.; Keene, C. D.; Ortiz-Gonzalez, X. R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W. C.; Largaespada, D. A.; Verfaillie, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **2002**, *418*, 41-49.
45. Méndez-Ferrer, S.; Michurina, T. V.; Ferraro, F.; Mazloom, A. R.; Macarthur, B. D.; Lira, S. A.; Scadden, D. T.; Ma'ayan, A.; Enikolopov, G. N.; Frenette, P. S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **2010**, *466*, 829-834.
46. Richardson, S. M.; Kalamegam, G.; Pushparaj, P. N.; Matta, C.; Memic, A.; Khademhosseini, A.; Mobasher, R.; Poletti, F. L.; Hoyland, J. A.; Mobasher, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods* **2016**, *99*, 69-80.
47. De Francesco, F.; Ricci, G.; D'Andrea, F.; Nicoletti, G. F.; Ferraro, G. A. Human adipose stem cells: From bench to bedside. *Tissue Eng., Part B* **2015**, *21*, 572-584.
48. Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E.; Caplan, A. I.; Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* **1997**, *64*, 295-312.
49. Nuttall, M. E.; Patton, A. J.; Olivera, D. L.; Nadeau, D. P.; Gowen, M. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: Implications for osteopenic disorders. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 371-382.
50. Wakitani, S.; Saito, T.; Caplan, A. I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **1995**, *18*, 1417-1426.
51. Makino, S.; Fukuda, K.; Miyoshi, S.; Konishi, F.; Kodama, H.; Pan, J.; Sano, M.; Takahashi, T.; Hori, S.; Abe, H.; Hata, J.-i.; Umezawa, A.; Ogawa, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 697-705.
52. Kon, E.; Filardo, G.; Roffi, A.; Di Martino, A.; Hamdan, M.; De Pasqual, L.; Merli, M. L.; Marcacci, M. Bone regeneration with mesenchymal stem cells. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2012**, *9*, 24-27.

53. Dalby, M. J.; Gadegaard, N.; Tare, R.; Andar, A.; Riehle, M. O.; Herzyk, P.; Wilkinson, C. D.; Oreffo, R. O. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 997-1003.
54. Yang, F.; Murugan, R.; Wang, S.; Ramakrishna, S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2603-2610.
55. Cheng, J.; Jun, Y.; Qin, J.; Lee, S. H. Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials* **2017**, *114*, 121-143.
56. Qasim, S. B.; Zafar, M. S.; Najeeb, S.; Khurshid, Z.; Shah, A. H.; Husain, S.; Rehman, I. U. Electrospinning of chitosan-based solutions for tissue engineering and regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, pii: E407.
57. Kennedy, K. M.; Bhaw-Luximon, A.; Jhurry, D. Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance. *Acta Biomater.* **2017**, *50*, 41-55.
58. Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474-5491.
59. Hollister, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 518-524.
60. Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *78*, 1246-1262.
61. Janik, H.; Marzec, M. A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2015**, *48*, 586-591.
62. Aslughter, B. V.; Khurshid, S. S.; Fisher, O. Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N. A. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater.* **2009**, *21*, 3307-3329.
63. Seliktar, D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science* **2012**, *336*, 1124-1128.
64. Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a Review. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1387-1408.
65. Dimatteo, R.; Darling, N. J.; Segura, T. *In situ* forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *127*, 167-184.
66. Radhakrishnan, J.; Subramanian, A.; Krishnan, U. M.; Sethuraman, S. Injectable and 3D bioprinted polysaccharide hydrogels: From cartilage to osteochondral tissue engineering. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1-26.
67. Yang, J.; Yang, X.; Wang, L.; Zhang, W.; Yu, W.; Wang, N.; Peng, B.; Zheng, W.; Yang, G.; Jiang, X. Biomimetic nanofibers can construct effective tissue-engineered intervertebral discs for therapeutic implantation. *Nanoscale* **2017**, *9*, 13095-13103.
68. Spang, M. T.; Christman, K. L. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. *Acta Biomater.* **2018**, *68*, 1-14.
69. Kundu, B.; Rajkhowa, R.; Kundu, S. C.; Wang, X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 457-470.

70. Morgese, G.; Cavalli, E.; Müller, M.; Zenobi-Wong, M.; Benetti, E. M. Nanoassemblies of tissue-reactive, polyoxazoline graft-copolymers restore the lubrication properties of degraded cartilage. *ACS Nano* **2017**, *11*, 2794-2804.
71. Alarcon, C. d. I. H.; Pennadam, S.; Alexander, C. Stimuli responsive polymers for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 276-285.
72. Lim, H. L.; Hwang, Y.; Kar, M.; Varghese, S. Smart hydrogels as functional biomimetic systems. *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 603-618.
73. Gungor-Ozkerim, P. S.; Inci, I.; Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A.; Dokmeci, M. R. Bioinks for 3D bioprinting: An overview. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 915-946.
74. Valot, L.; Martinez, J.; Mehdi, A.; Subra, G. Chemical insights into bioinks for 3D printing. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 4049-4086.
75. Ma, H.; Feng, C.; Chang, J.; Wu, C. 3D-printed bioceramic scaffolds: from bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomater.* **2018**, *79*, 37-59.
76. Xu, J.; Feng, Q.; Lin, S.; Yuan, W.; Li, R.; Li, J.; Wei, K.; Chen, X.; Zhang, K.; Yang, Y.; Wu, T.; Wang, B.; Zhu, M.; Guo, R.; Li, G.; Bian, L. Injectable Stem Cell-laden Supramolecular Hydrogels Enhance *in Situ* Osteochondral Regeneration via the Sustained Co-delivery of Hydrophilic and Hydrophobic Chondrogenic Molecules. *Biomaterials* **2019**, *210*, 51-61.
77. Patel, M.; Lee, H. J.; Park, S.; Kim, Y.; Jeong, B. Injectable Thermogel for 3D Culture of Stem Cells. *Biomaterials* **2018**, *159*, 91-107.
78. Yan, S.; Wang, T.; Feng, L.; Zhu, J.; Zhang, K.; Chen, X.; Cui, L.; Yin, J. Injectable *in situ* Self-cross-linking Hydrogels based on Poly(L-glutamic acid) and Alginate for Cartilage Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4495-4508.
79. Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2848-2857.
80. Bhardwaj, N.; Nguyen, Q. T.; Chen, A. C.; Kaplan, D. L.; Sah, R. L.; Kundu, S. C. Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for *in vitro* cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **2011**, *32*, 5773-5781.
81. Glowacki, J.; Mizuno, S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* **2008**, *89*, 338-344.
82. Dong C.; Lv, Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*, **2016**, *8*, 42.
83. Yue, K.; Trujillo-deSantiago, G.; Alvarez, M. M.; Tamayol, A.; Annabi, N.; Khademhosseini, A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **2015**, *73*, 254-271.
84. Sun, J.; Tan, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials* **2013**, *6*, 1285-1309.
85. Hemmati-Sadeghi, S.; Ringe, J.; Dehne, T.; Haag, R.; Sittinger, M. Pathophysiological Mechanisms of Chronic Venous Disease and Implications for Venoactive Drug Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1519.



86. van Bilsen, P. H.; Krenning, G.; Billy, D.; Duval, J. L.; Huurdeman-Vincent, J.; van Luyn, M. J. Heparin coating of poly(ethylene terephthalate) decreases hydrophobicity, monocyte/leukocyte interaction and tissue interaction. *Colloids Surf. B* **2008**, *67*, 46-53.
87. Ramamurthi, A.; Vesely, I. Ultraviolet light-induced modification of crosslinked hyaluronan gels. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *66*, 317-329.
88. Wang, D. A.; Varghese, S.; Sharma, B.; Strehin, I.; Fermanian, S.; Gorham, J.; Fairbrother, D. H.; Cascio, B.; Elisseeff, J. H. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 385-392.
89. Steinmetz, N. J.; Bryant, S. Chondroitin sulfate and dynamic loading alter chondrogenesis of human MSCs in PEG hydrogels. *J. Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2671-2682.
90. Vepari, C.; Kaplan, D. L. Silk as a Biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 991-1007.
91. Rockwood, D. N.; Preda, R. C.; Yu, T.; Wang, X.; Lovett, M. L.; Kaplan, D. L. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612-1631.
92. Zhu, J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4639-4656.
93. Martina, M.; Hutmacher, D. W. Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review. *Polym. Int.* **2007**, *56*, 145-157.
94. Baker, M. I.; Walsh, S. P.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2012**, *100*, 1451-1457.
95. Johnstone, B.; Alini, M.; Cucchiari, M.; Dodge, G. R.; Eglin, D.; Guilak, F.; Madry, H.; Mata, A.; Mauck, R. L.; Semino, C. E. Tissue engineering for articular cartilage repair-the state of the art. *Eur. Cells Mater.* **2013**, *25*, 248-267.
96. Nash, M. E.; Healy, D.; Carroll, W. M.; Elvira, C.; Rochev, Y. A. Cell and cell sheet recovery from pNIPAm coatings; motivation and history to present day approaches. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 19376-19389.
97. Jin, R.; Teixeira, L. M.; Dijkstra, P. J.; Van Blitterswijk, C.; Karperien, M.; Feijen, J. Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3103-3113.
98. Binetti, V. R.; Fussell, G. W.; Lowman, A. M. Evaluation of two chemical crosslinking methods of poly(vinyl alcohol) hydrogels for injectable nucleus pulposus replacement. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, 40843.
99. Jin, R.; Teixeira, L. M.; Dijkstra, P. J.; Karperien, M.; Van Blitterswijk, C.; Zhong, Z.; Feijen, J. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2544-2551.
100. Jin, R.; Moreira Teixeira, L. S.; Dijkstra, P. J.; Zhong, Z.; van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; Feijen, J. Enzymatically crosslinked dextran-tyramine hydrogels as injectable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng., Part A* **2010**, *16*, 2429-2440.
101. Wang, Z.; Jin, X.; Dai, R.; Holzman, J. F.; Kim, K. An ultrafast hydrogel photocrosslinking method for direct laser bioprinting. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 21099-21104.

102. Ifkovits, J. L.; Burdick, J. A. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 2369-2385.
103. Jia, Y.; Li, J. Molecular Assembly of Schiff Base Interactions: Construction and Application. *Chem. Rev.* **2014**, *115*, 1597-1621.
104. Cao, L.; Cao, B.; Lu, C.; Wang, G.; Yu, L.; Ding, J. An injectable hydrogel formed by *in situ* cross-linking of glycol chitosan and multi-benzaldehyde functionalized PEG analogues for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 1268-1280.
105. Censi, R.; Fieten, P. J.; di Martino, P.; Hennink, W. E.; Vermonden, T. *In Situ* Forming Hydrogels by Tandem Thermal Gelling and Michael Addition Reaction between Thermosensitive Triblock Copolymers and Thiolated Hyaluronan. *Macromolecules* **2010**, *43*, 5771-5778.
106. Jin, R.; Teixeira, L. M.; Krouwels, A.; Dijkstra, P. J.; Van Blitterswijk, C.; Karperien, M.; Feijen, J. Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1968-1977.
107. Yu, F.; Cao, X.; Zeng, L.; Zhang, Q.; Chen, X. An interpenetrating HA/G/CS biomimic hydrogel via Diels-Alder click chemistry for cartilage tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *97*, 188-195.
108. Roberts, J. J.; Bryant, S. J. Comparison of photopolymerizable thiol-ene PEG and acrylate-based PEG hydrogels for cartilage development. *Biomaterials* **2013**, *34*, 9969-9979.
109. Meka, V. S.; Sing, M. K.; Pichika, M. R.; Nali, S. R.; Kolapalli, V. R.; Kesharwani, P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 1697-1706.
110. Bidarra, S. J.; Barrias, C. C.; Granja, P. L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1646-1662.
111. Qiu, Y.; Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 321-339.
112. Elliott, J. E.; Macdonald, M.; Nie, J.; Bowman, C. N. *In situ* polymerized hyperbranched polymer reinforced poly(acrylic acid) hydrogels. *Polymer* **2004**, *45*, 1503-1510.
113. Ruel-Garie, E.; Leroux, J. C. *In situ*-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 409-426.
114. Lee, Y.; Chung, H. J.; Yeo, S.; Ahn, C. H.; Lee, H.; Messersmith, P. B.; Park, T. G. Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction. *Soft Matter* **2010**, *6*, 977-983.
115. Zustiak, S. P.; Leach, J. B. Hydrolytically Degradable Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Scaffolds with Tunable Degradation and Mechanical Properties. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1348-1357.
116. Kong, H. J.; Smith, M. K. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4023-4029.
117. Nicodemus, G. D.; Bryant, S. J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2008**, *14*, 149-165.
118. Zhang, Z.; Ni, J.; Chen, L.; Yu, L.; Xu, J.; Ding, J. Biodegradable and thermoreversible PCLA-PEG-PCLA hydrogel as a barrier for prevention of post-operative adhesion. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4725-4736.

119. Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345-1360.
120. Lee, F.; Chung, J. E.; Kurisawa, M. An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery. *J. Control. Release* **2009**, *134*, 186-193.
121. Ashton, R. S.; Banerjee, A.; Punyani, S.; Schaffer, D. V.; Kane, R. S. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5518-5525.
122. Kloxin, A. M.; Kasko, A. M.; Salinas, C. N.; Anseth, K. S. Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties. *Science* **2009**, *324*, 59-63.
123. Pasparakis, G.; Manouras, T.; Argitis, P.; Vamvakaki, M. Photodegradable polymers for biotechnological applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 183-198.
124. Kretlow, J. D.; Mikos, A. G. From material to tissue: Biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. *AIChE J.* **2008**, *54*, 3048-3067.
125. Novosel, E. C.; Kleinhaus, C.; Kluger, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 300-311.
126. Pan, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) Porous Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Interface Focus.* **2012**, *2*, 366-377.
127. Li, W. J.; Laurencin, C. T.; Cateson, E. J.; Tuan, R. S.; Ko, F. K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 613-621.
128. Lü, J. M.; Wang, X.; Marin-Muller, C.; Wang, H.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2009**, *9*, 325-41.
129. Wu, L.; Ding, J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5821-30.
130. Bettinger, C. J.; Bruggeman, J. P.; Borenstein, J. T.; Langer, R. S. Amino alcohol-based degradable poly(ester amide) elastomers. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2315-2325.
131. Peng, S.; Liu, H. X.; Ko, C. Y.; Yang, S. R.; Hung, W. L.; Chu, I. M. A hydrolytically-tunable photocrosslinked PLA-PEG-PLA/PCL-PEG-PCL dual-component hydrogel that enhances matrix deposition of encapsulated chondrocytes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *11*, 669-678.
132. Caplan, M.; Schwartzfarb, E.; Zhang, S.; Kamm, R. D.; Lauffenburger, D. A. Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence. *Biomaterials* **2002**, *23*, 219-227.
133. Holmes, T.; Delacalle, S.; Su, X.; Rich, A.; Zhang, S. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 6728-6733.
134. Kisiday, J.; Jin, M.; Kurz, B.; Hung, H.; Semino, C.; Zhang, S.; Grodzinsky, A. J. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9996-10001.
135. Zhang, S.; Altman, M. Peptide self-assembly in functional polymer science and engineering. *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 91-102.

136. Marini, D.; Hwang, W.; Lauffenburger, D.; Zhang, S.; Kamm, R. D. Left-Handed Helical Ribbon Intermediates in the Self-Assembly of a  $\beta$ -Sheet Peptide. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 295-299.
137. Yokoi, H.; Kinoshita, T.; Zhang, S. Dynamic Reassembly of Peptide RADA16 Nanofiber Scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, *102*, 8414-8419.
138. Gelain, F.; Bottai, D.; Vescovi, A.; Zhang, S. Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Cultures. *PLoS One* **2006**, *1*, e119.
139. Cormier, A. R.; Pang, X.; Zimmerman, M. I.; Zhou, H. X.; Paravastu, A. K. Molecular Structure of RADA16-I Designer Self-assembling Peptide Nanofibers. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7562-7572.
140. Wang, T. W.; Chang, K. C.; Chen, L. H.; Liao, S. Y.; Yeh, C. W.; Chuang, Y. J. Effects of An Injectable Functionalized Self-Assembling Nanopeptide Hydrogel on Angiogenesis and Neurogenesis for Regeneration of the Central Nervous System. *Nanoscale* **2017**, *9*, 16281-16292.
141. Yang, H.; Hong, N.; Liu, H.; Wang, J.; Li, Y.; Wu, S. Differentiated Adipose-Derived Stem Cell Cocultures for Bone Regeneration in RADA16-I in vitro. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 9458-9472.
142. Fares, M. M.; Shirzaei-Sani, E.; Portillo-Lara, R.; Oliveira, R. B.; Khademhosseini, A.; Annabi, N. Interpenetrating Network Gelatin Methacryloyl (GelMA) and Pectin-g-PCL Hydrogels with Tunable Properties for Tissue Engineering. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 2938-2950.
143. Park, S.; Edwards, S.; Hou, S.; Boudreau, R.; Yee, R.; Jeong, K. J. A Multi-Interpenetrating Network (IPN) Hydrogel with Gelatin and Silk Fibroin. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 1276-1280.
144. Naseri, N.; Deepa, B.; Mathew, A. P.; Oksman, K.; Girandon, L. Nanocellulose-Based Interpenetrating Polymer Network (IPN) Hydrogels for Cartilage Applications. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3714-3723.
145. Pescosolido, L.; Schuurman, W.; Malda, J.; Matricardi, P.; Alhaique, F.; Coviello, T.; van-Weeren, P. R.; Dhert, W. J.; Hennink, W. E.; Vermonden, T. Hyaluronic Acid and Dextran-based Semi-IPN Hydrogels as Biomaterials for Bioprinting. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1831-1838.
146. Choi, B.; Kim, S.; Lin, B.; Wu, B. M.; Lee, M. Cartilaginous Extracellular Matrix-Modified Chitosan Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 20110-20121.
147. Ingavle, G. C.; Dormer, N. H.; Gehrke, S. H.; Detamore, M. S. Using Chondroitin Sulfate to Improve the Viability and Biosynthesis of Chondrocytes Encapsulated in Interpenetrating Network (IPN) Hydrogels of Agarose and Poly(ethylene glycol) Diacrylate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 157-170.
148. de Lima, G. G.; Elter, J. K.; Chee, B. S.; Magalhães, W. L. E.; Devine, D. M.; Nugent, M. J. D.; de Sá, M. J. C. A Tough and Novel Dual-Response PAA/P(NiPAAM-co-PEGDMA) IPN Hydrogels with Ceramics by Photopolymerization for Consolidation of Bone Fragments Following Fracture. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*, 054101.
149. Wang, J.; Wei, J. Interpenetrating Network Hydrogels with High Strength and Transparency for Potential Use as External Dressings. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *80*, 460-467.
150. Nagai, N.; Mori, K.; Satoh, Y.; Takahashi, N.; Yunoki, S.; Tajima, K.; Munekata, M.; In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3201-3212.
151. Charriere, G.; Bejot, M.; Schnitzler, L.; Ville, G.; Hartmann, D. J. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. *J. Am. Acad. Dermatol* **1989**, *21*, 1203-1208.

## 第 2 章

# シリカ不織布中における 間葉系幹細胞の軟骨細胞分化挙動解析

## 2.1 緒言

第2章では、生体内のECM環境を模倣した材料の一つであるSNFs中におけるMSCの軟骨細胞分化に焦点を当て、SNFsの内部構造、物質透過性などの材料物性を解析し、その足場材料中でのMSCの軟骨細胞分化挙動を検討することで、関節軟骨再生のための軟骨細胞回収源の確立を行った。細胞を培養するための足場材料としてマイクロオーダーの網目サイズを有するSNFsは、日本バイリン(株)により開発された足場材料であり電界紡糸法により成形されたものである。<sup>13</sup>この成形手法は、3Dプリント技術などの現在急速に発展を遂げつつある新規な技術では叶わない、微細かつ均一なネットワーク構造を作成可能な技術であり、その技術により作成されたSNFsは先行研究にてがん細胞のスクリーニングや表面修飾によるファイバー機能化など、足場材料としての有効性を確立しつつある(表2-1)。<sup>2-7</sup>既存のファイバー材料と比較しSNFsの空隙率は95%と高く(表2-2)、かつ網目サイズも7.6 $\mu\text{m}$ と小さいため、<sup>8-12</sup>SNFs上部に細胞を播種しても細胞が抜け落ちることなく足場材の深部へと三次元状に伸展することで、SNFs中で生体内環境と類似した細胞の三次元構造の構築が期待できる。また、足場材料の網目サイズの大きさは細胞の増殖や遺伝子発現能力などの細胞機能に影響を与えることが周知であり、網目が小さいほどこれらの機能が向上するため、<sup>13</sup>SNFs中でのMSC軟骨細胞分化は、他の材料と比較し有意に進行すると推測した。細胞培養のための足場材料として、ファイバー材料に関する研究が多く報告されているが、<sup>8-12</sup>それら材料は有機材料、または合成材料が主体であるため、細胞培養中に加水分解や酵素分解によりファイバー構造が崩壊してしまう。<sup>14,15</sup>一方、無機ファイバーは有機材料や合成材料からなるファイバー特有の構造分解を誘起せず、細胞培養してもその均一なネットワーク構造は損なわれることはない。従って無機ファイバーは、長期的な細胞培養により多くの細胞確保が不可欠なMSCの細胞源として機能すると考えられる。

本章では、これまで既存研究で行って来られなかった無機ファイバーであるSNFs中でのMSCの関節軟骨細胞分化に挑戦する。無機ファイバー材料であるSNFs中でのMSCの関節軟骨細胞分化に関する新たな知見の獲得と、細胞分化のためのSNFs有効性の検討を目的とした。SNFsの三次元構造を確認するため、scanning electron microscope (SEM)により内部を観察し、さらに成長因子や栄養素などの培養に不可欠な因子の透過性を確認するため、蛍光標識したデキストラン(FITC-Dextran)を用いてSNFsの物質透過性を観察した。SNFsにMSCを播種し、TGF- $\beta$ などの軟骨分化因子含有の培地を用い4週間培養し、培養後の軟骨分化挙動をreal-time polymerase chain reaction (リアルタイムPCR)を用いることで軟骨細胞への分化の指標となるACAN、COL1A1、COL2A1、COL10A1、SOX9遺伝子に関して評価した。

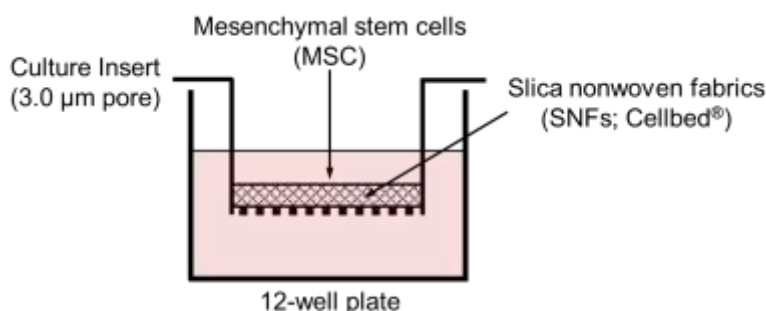


図 2-1. 本実験の培養システム.

表 2-1. SNFs の応用例

応用例	参照
ヒト骨芽細胞株の分化	Sakai <i>et al.</i> (2012) <sup>2</sup>
新規抗がん剤評価系の確立	Yamaguchi <i>et al.</i> (2013) <sup>3</sup>
肝細胞と線維芽細胞の非接触系共培養方法	Otsuka <i>et al.</i> (2014) <sup>4</sup>
がん細胞の多剤耐性能の獲得	Mizutami <i>et al.</i> (2017) <sup>5</sup>
舌がん細胞の浸潤に対するリン酸化酵素の関与	Noi <i>et al.</i> (2017) <sup>6</sup>
間葉系幹細胞の骨分化	Iijima <i>et al.</i> (2018) <sup>7</sup>

表 2-2. MSC 分化のために用いられるファイバー材料

	材料	網目サイズ	空隙率	参照
合成材料	Poly( $\epsilon$ -caprolactone)	25 $\mu\text{m}$	70%	Li <i>et al.</i> (2005) <sup>8</sup>
	Poly(ethylene terephthalate)	62 $\mu\text{m}$	50%	Cao <i>et al.</i> (2010) <sup>9</sup>
	Poly-L-lactide	50 $\mu\text{m}$	65%	Ardeshirylajimi <i>et al.</i> (2015) <sup>10</sup>
	Poly(ethersulfone)	25 $\mu\text{m}$	70%	Pournaqi <i>et al.</i> (2017) <sup>11</sup>
有機材料	Chitosan	30 $\mu\text{m}$	75%	Yang <i>et al.</i> (2012) <sup>12</sup>

## 2.2 実験

### 2.2.1 試薬、溶媒

第 2 章で用いる試薬、及び溶媒は表 2-3 の通りである。本章で用いる試薬、溶媒に関しては、それ以上の精製をすることなく使用した。

表 2-3. 試薬、溶媒

試薬名	購入先
3% atelocollagen	KOKEN Co. Ltd. (Tokyo, Japan)
Cell counting kit-8	Dojindo Laboratories, Co. Ltd. (Kumamoto, Japan)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Fetal bovine serum (FBS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
FITC-dextran	Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)
Mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation medium (PromoCell GmbH)	Takara Bio Inc. (Shiga, Japan)
Penicillin-streptomycin (PS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Silica nonwoven fabrics (SNFs, Cellbed®) <sup>*1</sup>	Japan Vilene Co. Ltd. (Ibaraki, Japan)

※1 本章で用いる SNFs (Cellbed®) は日本バイリン(株) より提供されたものである。簡潔な作成手順としては、金属化合物として tetraethoxysilane、溶媒としてエタノール、加水分解剤として水、

触媒として 1N HCl<sub>aq</sub> を、1:5:2:0.003 のモル比で混合し、78 °C で 10 時間攪拌した後、溶媒を除去することでゾル溶液を調製し、電界紡糸により成形する。本 SNFs は、同社の川部雅章氏と佐々木皓平氏によりご提供いただいたものである。

## 2.2.2 SNFs の内部構造評価

日本バイリン(株) により提供された SNFs の内部構造を、SEM (S-4800, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) を用い以下の前処理を行い観察した。まず SNFs を 10, 50, 60, 70, 80, 90, 100% エタノールに対し各 20 分浸漬させ脱水処理した後、エタノールと *t*-ブチルアルコールの混合溶液(1:1)、100% *t*-ブチルアルコールに対し各 20 分浸漬させることで *t*-ブチルアルコール置換を行った。8 時間凍結乾燥させた後、剃刀を用い SNFs を裁断し、断面を SEM を用いて観察した。

## 2.2.3 SNFs の物質透過性評価

SNFs の物質透過性を、蛍光標識した FITC-dextran (Mn=20,000) を用い観察した。Cell culture insert (Falcon® Permeable Support for 12-well Plate with 3.0 μm Transparent PET Membranepore, Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) 上部に落とし込んだ SNFs を 12-well plate (Becton, Dickinson and Co.) に設置し、2.9 mL の DMEM (10% FBS, 2% PS 含有) を加えた後、1.5 mM FITC-dextran 0.1 mL を insert 上部に加え全量を 3.0 mL とした。所定時間経過後、insert 下部から 0.1 mL のサンプルを回収し、新鮮な DMEM を新たに 0.1 mL 添加した。回収したサンプルの蛍光強度( $\lambda_{ex}$  = 494 nm,  $\lambda_{em}$  = 518 nm) を microplate reader (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用い評価し、様々な濃度の FITC-dextran 溶液の蛍光強度から作成した検量線に外挿することで透過した FITC-dextran の濃度を定量した。

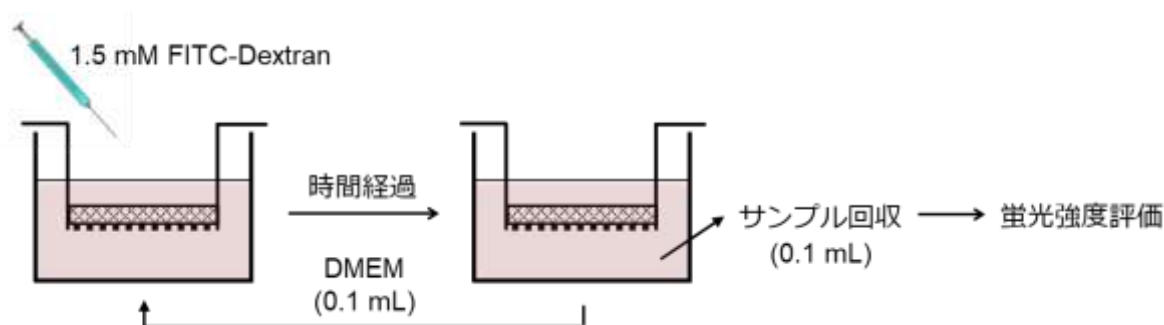


図 2-2. 透過性評価の概要図.

## 2.2.4 SNFs 中での MSC 培養と軟骨細胞分化

MSC ( $3.0 \times 10^5$  cells) を SNFs 上に播種し、12-well plate に 1.5 mL、insert 上に 0.5 mL の通常培地<sup>※1</sup> を添加し、3 日間培養した。培養後、培地を全回収し、軟骨細胞分化培地<sup>※2</sup> と置換することで MSC の軟骨細胞分化を行った。対象実験として、以下 2 通りの実験を行った。



- ① アテロコラーゲンゲル内培養 ; 25  $\mu\text{L}$  の 1.0% アテロコラーゲンに懸濁させた MSC ( $1.0 \times 10^7$  cells/mL,  $5.0 \times 10^5$  cells) を 1.5 mL サンプリングチューブに添加し、当量の PBS を添加した後、37  $^{\circ}\text{C}$  で 4 時間インキュベートすることで MSC を包埋した 0.5% アテロコラーゲンゲルを作成した。500  $\mu\text{L}$  の通常培地 を加え 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  下で 3 日間培養した後、軟骨細胞分化培地と置換することで軟骨細胞分化を行った。
- ② 96-well U-bottom 培養 ; 100  $\mu\text{L}$  の通常培地に懸濁させた MSC ( $1.0 \times 10^5$  cells) を 96-well U-bottom (Becton, Dickinson and Co.) に添加し、37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  下で 3 日間培養した後、軟骨細胞分化培地と置換することで軟骨細胞分化を行った。

これらの培養は通常培地と軟骨細胞分化培地で行い、3 日毎に培地を全て新鮮な培地と交換し、4 週間の培養を行った。

※1 通常培地

DMEM (10% FBS, 2% PS)

※2 軟骨細胞分化培地

DMEM (PromoCell GmbH) (10% ITS+Premix Tissue Culture Supplement,  $10^{-7}$  M dexamethasone, 1  $\mu\text{M}$  ascorbate-2-phosphate, 1% sodium pyruvate, and 10 ng/mL TGF- $\beta$ )

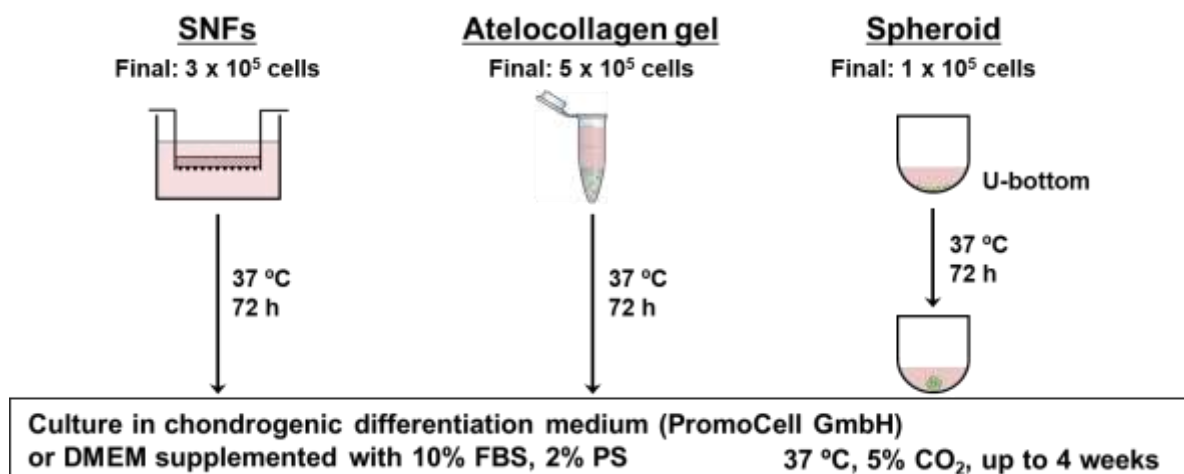


図 2-3. 本実験の概要図.

## 2.2.5 SNFs に対する MSC の接着性評価

96-well plate 上の SNFs、または tissue culture-treated polystyrene (TCPS) に対し、100  $\mu\text{L}$  の通常培地に懸濁させた 1, 5,  $10 \times 10^4$  cells の MSC を播種し、37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  下で培養することで SNFs に対する MSC の細胞接着性を観察した。培養 1, 4, 7, 9, 11, 14 日培養後、20  $\mu\text{L}$  WST-8 溶液と 180  $\mu\text{L}$  通常培地を混合し 96-well plate に添加し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。450 nm における吸光度を microplate reader を用い観察した。様々な MSC 細胞数の吸光度により作成した検量線により接着細胞数を算出し、以下の式に倣い細胞増殖率(Relative cell number) を算出した。

$$\text{Relative cell number (\%)} = N_g/N_i \times 100$$

$N_g$  : 計測細胞数

$N_i$  : 24 時間培養後の接着細胞数

## 2.2.6 SNFs 中での MSC 形態観察

分化の有無における MSC の SNFs 中における細胞形態を観察するため、培養 2, 4 週間後における断面画像を共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal laser scanning microscope; CLSM, LSM-710, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) により取得した。所定期間培養後、SNFs を 12-well plate に移し、500  $\mu$ L の 5  $\mu$ g/mL hoechst 33342 溶液 (通常培地, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を SNFs 上部に添加し暗所で 1 時間インキュベートした。次に、4% paraformaldehyde 溶液 (PBS, FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp., Osaka, Japan) で SNFs 内の細胞を 20 分間固定化し、さらに 500  $\mu$ L の 0.5% Triton X-100 水溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp.) で 5 分間インキュベートした後、1% alexa fluor™ 594 phalloidin 溶液 (Thermo Fisher Scientific Inc.) で 6 時間インキュベートした。これらの染色過程は全て 37°C、暗所で行い、各ステップ間に PBS を用いて 3 回洗浄操作を行った。細胞の SNFs 中への伸展挙動を観察するため、z 次元でそれぞれ厚さ 8  $\mu$ m のスライス画像を取得し、150  $\mu$ m 区間におけるスタック画像を取得した。

## 2.2.7 MSC の軟骨細胞分化挙動評価

上記三種の足場材料中で培養した MSC の総 RNA を、RNeasy® ミニキット (Qiagen Inc., Hilden, Germany) と Trizol® (Thermo Fisher Scientific Inc.) を組み合わせ回収し、軟骨分化の際に不可欠となる遺伝子の発現を評価した。4 週間培養後、PBS を用いて足場材料を 3 回洗浄し、Powermasher (Nippi Inc., Tokyo, Japan)、及び biomasher II (Nippi Inc.) を使用し Trizol® 中でホモジナイズし、製造元のプロトコールに従い RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて cDNA を生成させ、Thunderbird® SYBR® qPCRMix (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いてリアルタイム PCR (ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)) を行った。 $\Delta$ Ct 法を介し遺伝子発現量を算出し、内標準遺伝子 *GAPDH* との相対的な遺伝子発現量を算出した。 $\Delta$ Ct 法を以下に示す。

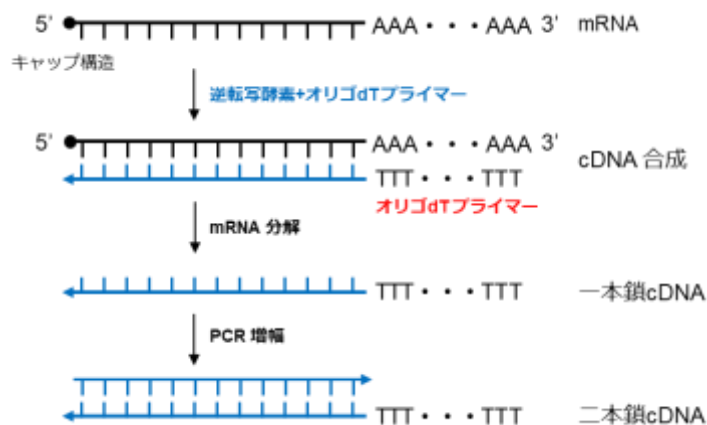
$$\text{遺伝子発現量(GAPDH との相対値)} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{測定遺伝子}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

尚、Ct は各遺伝子の増幅曲線に対し threshold line : 0.2 におけるサイクル数を示している。

本実験にて使用したプライマー情報を以下に示す。*COL1A1* (5'-gtcggaggccaagcaag-3' (sense) and 5'-cagatcagctcatcgcaaac-3' (antisense)),<sup>16</sup> *COL2A1* (5'-ggcaatagcaggttcacgtaca-3' (sense) and 5'-cgataacagtctgtcccactta-3' (antisense)),<sup>17</sup> *COL10A1* (5'-gtctgtctttactgttattctctcaaaa-3' (sense) and 5'-tgctgttgctgttatacaaaattt-3' (antisense)),<sup>18</sup> *ACAN* (5'-agcctgcgctccaatgact-3' (sense) and 5'-taatggaacacgatgccttca-3' (antisense)),<sup>19</sup> *SOX9* (5'-ttccgcgacgtggacat-3' (sense) and 5'-

tcaaactcgttgacatcgaaggt-3' (antisense)), and *GAPDH* (5'-agcaagagcacaagaggaagaga-3' (sense) and 5'-gaggggagattcagtggtg-3' (antisense)).<sup>20</sup> これら遺伝子の増幅効率、各種遺伝子の cDNA 濃度に依存した Ct 値を用いて検量線を作成し、その傾きの絶対値の逆数から増幅効率を算出している。尚、全てのプライマーにおいて、変性温度：95 °C (60 s)、アニーリング温度：60 °C (45 s)、伸長温度：72 °C (45 s)、サイクル数：45 の条件で遺伝子の増幅を行った。本実験は国立成育医療研究センター・小児・血液腫瘍研究部の清河信敬部長、及び同研究部の飯島一智共同研究員((現) 横浜国立大学工学研究院 准教授、(前) 東京理科大学 工学部 工業化学科 助教) にご指導いただき、同研究センターにて実験を行った。



スキーム 2-1. PCR 概要図. mRNA を抽出し cDNA を合成した後、増幅させることで二本鎖 cDNA を合成する。

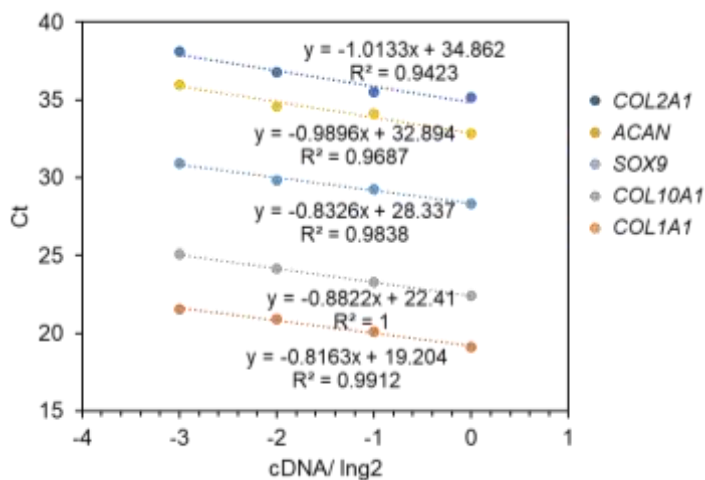


図 2-4. 各種遺伝子の検量線.

表 2-4. 各種遺伝子の増幅効率.

	<i>COL2A1</i>	<i>COL1A1</i>	<i>COL10A1</i>	<i>ACAN</i>	<i>SOX9</i>
傾き	-1.013	-0.816	-0.882	-0.990	-0.833
増幅効率	98.69	122.50	113.35	101.05	120.10

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 SNFs の内部構造評価、透過性評価

SEM 観察により SNFs のポアサイズは  $7.6\ \mu\text{m}$ 、ファイバーの直径は  $704\ \text{nm}$  であり、この異方的な三次元ネットワーク構造は細胞の増殖や遺伝子発現を促進することが期待される(図 2-5)。

次に、SNFs の物質透過性を FITC-dextran を用い評価した(図 2-6)。初期(0-140 s) の SNFs における FITC-dextran の透過は、culture insert と比較し僅かに低下したが、この結果は SNFs が物理的に透過を阻害しているためと考えられる。一方、後期(140-500 s) の透過は双方において同程度の傾きのため、平衡状態に達した際には同程度に FITC-dextran が透過していることが示唆される。従って SNFs の物質透過は、長期間の細胞培養において酸素や栄養素などの細胞増殖に不可欠な因子の透過を阻害せず、成長因子の縦横が可能な足場材料であることが示唆された。

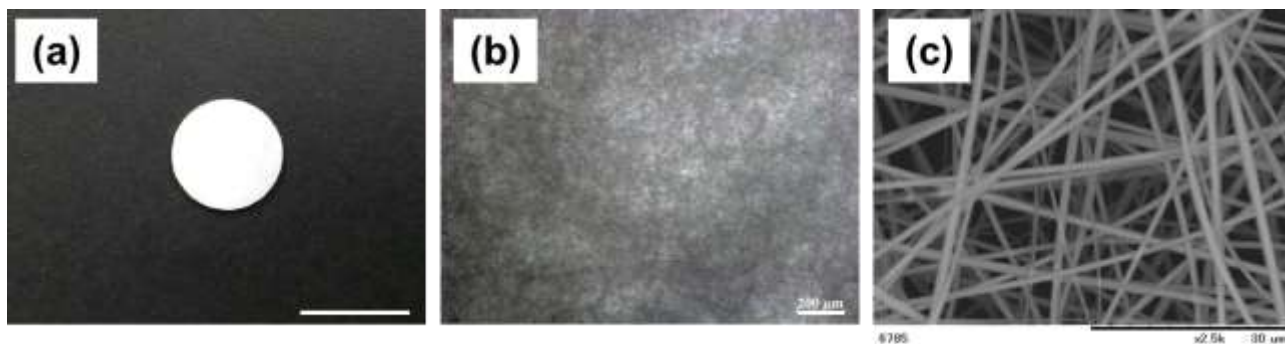


図 2-5. SNFs の構造. (a) マクロ画像. (b) 位相差顕微鏡画像. (c) SEM 画像. Scale bar: (a) 10 mm, (b) 200  $\mu\text{m}$  and (c) 30  $\mu\text{m}$ .

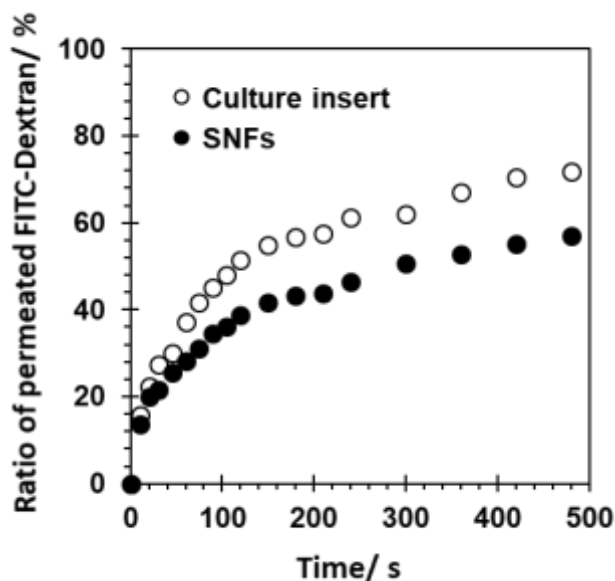


図 2-6. FITC-dextran (Mn: 20,000) を用いた SNFs の透過挙動. ○; culture insert, ●; SNFs の透過挙動.

### 2.3.2 SNFs 中における MSC 培養

二次元材料と三次元材料での細胞増殖挙動を比較するため、cell counting kit-8 を用い、tissue culture-treated polystyrene (TCPS) と SNFs 上に MSC を播種し培養した際の増殖挙動を比較した(図 2-7)。24 時間培養後の SNFs 細胞数は、三種の播種条件において TCPS よりも低くなったが、この挙動は播種直後においては二次元平面の方が細胞接着性に優れることを示唆する(図 2-6a)。一方、24 時間培養以降に関しては、TCPS 上における MSC の細胞数は直線的に増加し、SNFs においては指数関数的な細胞増殖が観察された(図 2-7b,c)。 $1.0 \times 10^4$  cells で TCPS に播種した MSC に関しては、過増殖により TCPS 表面から剥離してしまっていたが、同細胞数の SNFs においては剥離することなく細胞の増殖が観察された。ここで 24 時間培養後の細胞数を基準とした、各培養日数における細胞増殖挙動を示す(図 2-7d,e)。同播種細胞数で双方の増殖挙動を比較すると、2 週間培養後における SNFs の増殖は、TCPS と比較し約 2 倍優れていた。SNFs の方が初期接着細胞数が少ないが、2 週間培養後においても TCPS と比較し SNFs の方が傾きが大きいため、SNFs 深部への MSC の伸展を示唆する。また、双方の総細胞数は 2 週間培養後において同等だが、SNFs の指数関数的な増殖を鑑みると、2 週間以上の長期培養下においては SNFs においてより多くの細胞の確保が期待される。これらの結果より SNFs は、二次元平面培養で観察される接触阻害シグナルを併発しない足場材料であり、長期培養することでより多くの細胞の獲得を目的とする細胞源として、SNFs は機能すると考えられる。

上述した SNFs 深部への細胞伸展を観察するため、共焦点レーザー顕微鏡を用い分化の有無における細胞形態の違いを評価した(図 2-8)。培養 2 週間後における MSC は、SNFs 上面から約 48  $\mu\text{m}$  の位置にまで進展し、分化因子の有無における双方の顕著な違いは観察されなかった。一方、培養 4 週間後においては、2 週間培養後よりも深部に伸展していたことから、MSC の細胞分化に依らず、SNFs 深部に MSC が伸展することが示唆された。また、軟骨細胞分化培地を用い培養した MSC の、未分化 MSC と比較し深い伸展(約 73  $\mu\text{m}$ ) が観察され、未分化の MSC は SNFs の表面近傍に集積している挙動が観察された(図 2-8)。この挙動は細胞数の違いに起因すると考えられる。実際に、培養 4 週間後において分化の有無における MSC の細胞数を評価すると、軟骨細胞分化培地を用いた際に細胞数が低くなっていた(図 2-9)。TGF- $\beta$  は細胞の増殖を抑制することが知られている。<sup>21-23</sup> 従って、軟骨細胞分化因子である TGF- $\beta$  などの成長因子の機能は少なからず保持されており、SNFs 中での MSC の軟骨細胞分化は推進されることが示唆された。

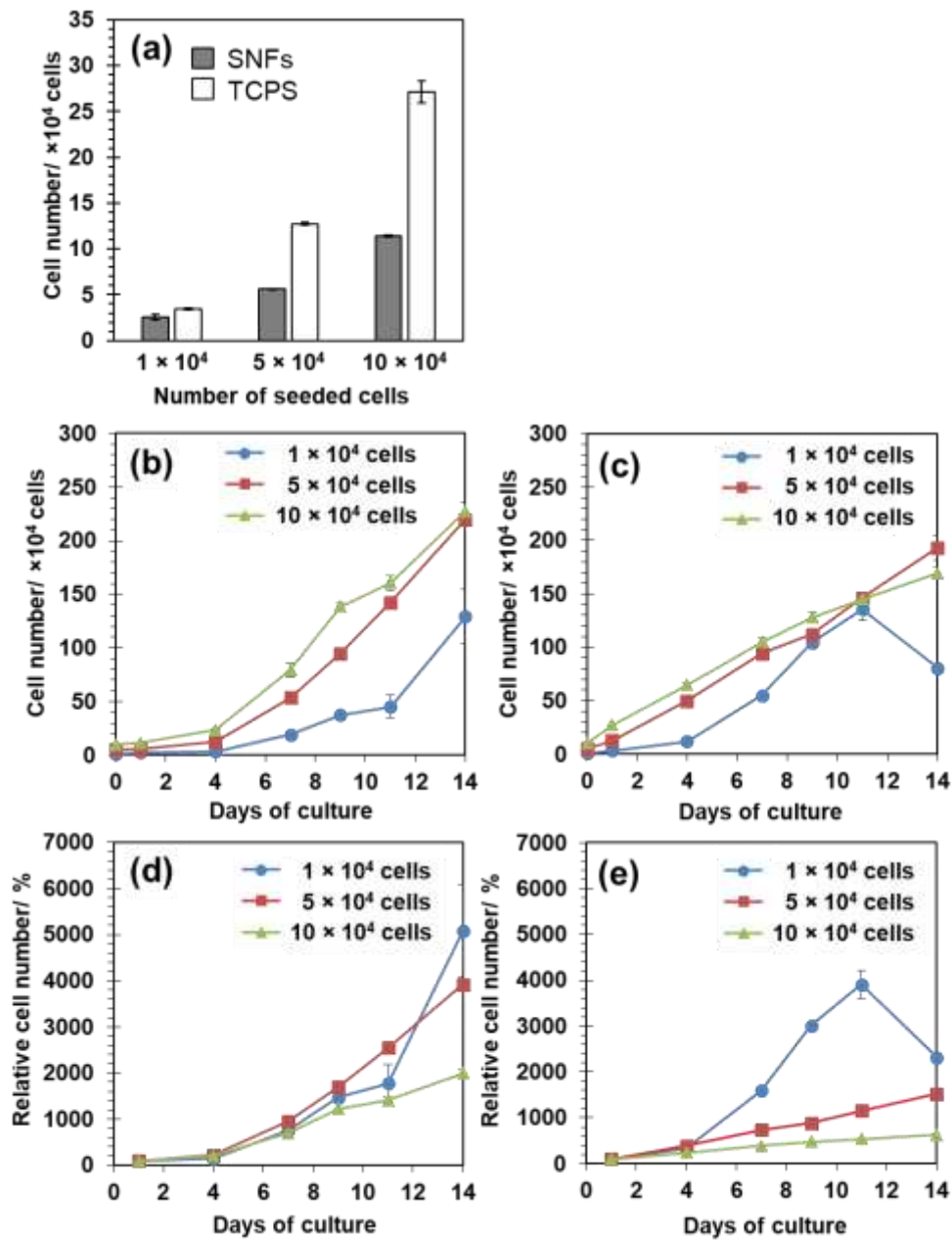


図 2-7. (a) 24 時間培養後における細胞数. (b) SNFs における接着細胞数. (c) TCPS における接着細胞数. (d) SNFs における細胞増殖率. (e) TCPS における細胞増殖率. 細胞増殖率は、経過時間毎の接着細胞数を 24 時間後における接着細胞数で割ったものである。(n=2)

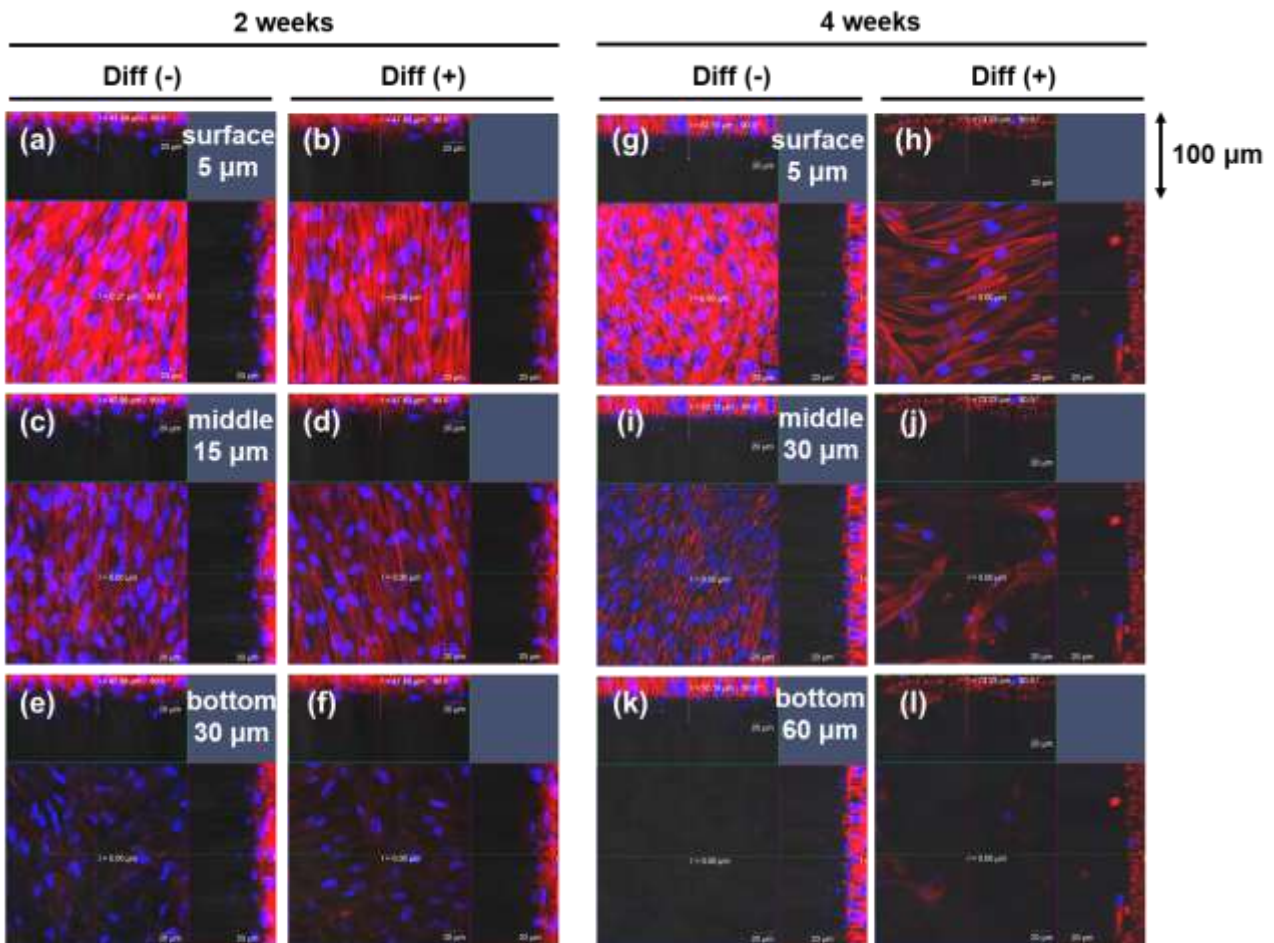


図 2-8. 2, 4 週間培養後における SNFs 中の MSC 形態. Diff (-), Diff (+) は分化因子の有無を示す。数字は SNFs 上面からの距離を示し、核を hoechst33342 (青)/f-actin を alexa fluor™ 594 phalloidin (赤) を用いて染色した。Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ 。

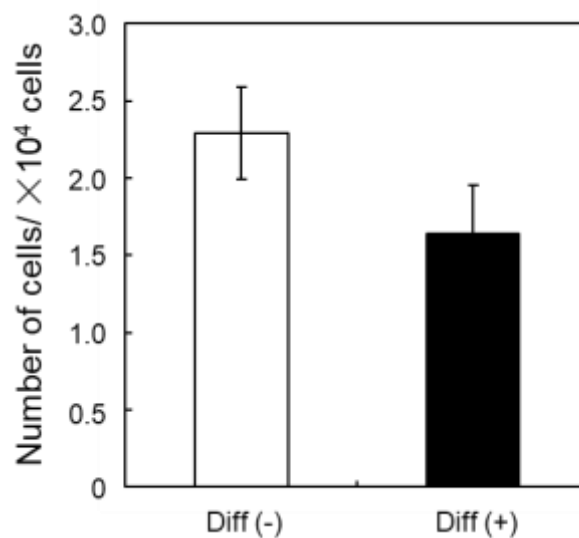


図 2-9. 4 週間培養後における SNFs 中の細胞数. Diff (-), Diff (+) は分化因子の有無を示す。(n=2)

### 2.3.3 SNFs 中における軟骨細胞分化

MSC の軟骨細胞分化挙動を評価するため、リアルタイム PCR を用い計 5 種の軟骨形成遺伝子の発現を評価した(図 2-10)。尚、本評価におけるコントロール実験として、三次元培養間での比較を行うため臨床的に応用されているアテロコラーゲンゲル内培養、及び足場材料の有無における分化挙動を比較するため MSC 分化の際に一般的なスフェロイド培養を行った。MSC の軟骨細胞分化に関して様々な形態の細胞へと分化することが知られており、足場材料や添加因子の違いにより肥大軟骨細胞、硝子軟骨細胞、繊維軟骨細胞へと分化する。<sup>24</sup> 未分化の MSC が、分化因子により軟骨細胞への分化シグナルを受け取ると、初期軟骨分化遺伝子である *SOX9* の発現が亢進するため、本遺伝子の発現は軟骨系細胞への分化に不可欠である。<sup>24-26</sup> また、各種細胞において特に発現する遺伝子も様々であり、軟骨の石灰化に関与する肥大軟骨細胞においては後期軟骨遺伝子の 10 型コラーゲン遺伝子(*COL10A1*)、<sup>25,26</sup> 関節軟骨の構成成分である硝子軟骨細胞においては 2 型コラーゲン(*COL2A1*)、<sup>24,27,28</sup> 繊維軟骨の構成成分である繊維軟骨細胞においては 1 型コラーゲン(*COL1A1*) 遺伝子がそれぞれ顕著に発現している。<sup>27,28</sup> これらの軟骨細胞においては、軟骨組織に存在するタンパク質であるアグリカンの遺伝子(*ACAN*) も同様に発現している。<sup>24</sup> 従って、関節軟骨再生のための細胞として、MSC を硝子軟骨細胞へと分化させることが必須でありこの際、*SOX9* と *COL2A1* の高発現、*COL10A1* と *COL1A1* の低発現が、関節軟骨細胞用の細胞源として機能するための MSC 分化条件であると考えられる。

軟骨細胞系への分化に必須となる *SOX9* の発現は通常培地では観察されなかった一方、分化培地を用いることで全培養系において同程度の *SOX9* の発現が観察されたことから、軟骨系の細胞へと MSC が分化していることが示唆された。さらに、肥大軟骨遺伝子である *COL10A1* に関しては、分化培地を用いることでスフェロイド培養、アテロコラーゲン培養、SNFs 培養の順で高くなったことから、スフェロイド培養においては最も肥大軟骨細胞へと分化しやすいことが推察される。一方、*COL2A1* に関しては、スフェロイド培養、SNFs 培養の順で向上し、*COL1A1* に関しては、スフェロイド培養において最も向上したことから、スフェロイド培養は繊維軟骨細胞へも分化しやすいことが示唆された。*ACAN* に関しては、全ての軟骨細胞において発現する遺伝子であるため、肥大軟骨細胞や繊維軟骨細胞、関節軟骨細胞へも分化しているスフェロイド培養において、最も高い発現が観察された。以上の結果より、スフェロイド培養では、肥大軟骨細胞や繊維軟骨細胞、関節軟骨細胞への分化能があり、アテロコラーゲン培養では肥大軟骨細胞や関節軟骨細胞への分化能を有する一方、SNFs 培養では、関節軟骨細胞へ優先的に分化しているため、SNFs は MSC の関節軟骨細胞源として機能することが示唆される。これら SNFs 中での関節軟骨細胞分化に関する優位性は以下にあると考察する。SNFs の三次元構造は生体内 ECM 構造と類似しており、その構造が、軟骨分化に有意に働く生物学的に好ましいシグナル伝達を誘発し、かつそれらの相互侵入構造が細胞-細胞間、または細胞-ECM 間との相互作用に優れている。<sup>29,30</sup> もう一つの理由は、SNFs の弾性にある。MSC の軟骨分化特性は足場材料の硬さに影響することが知られており、その硬さが軟骨分化を誘発している。<sup>31-33</sup> 以上の理由により、SNFs 中で MSC の軟骨細胞分化が有意に促進されたと考えられる。無機材料である SNFs を用いた MSC の軟骨分化実験は、従来行われていなかった材料での試みであり、有機材料を中心とするファイバー材料では適わない特性を SNFs は保持しているため、MSC の軟骨細胞分化のため新たな材料設計指針を提供すると考えられる。このように、



がん細胞やドラッグクリーニング、表面修飾、線維芽細胞培養、細胞共培養など、様々な応用が試みられている SNFs に関する本実験結果は、SNFs の三次元足場材料としての有効性を推進するものである。

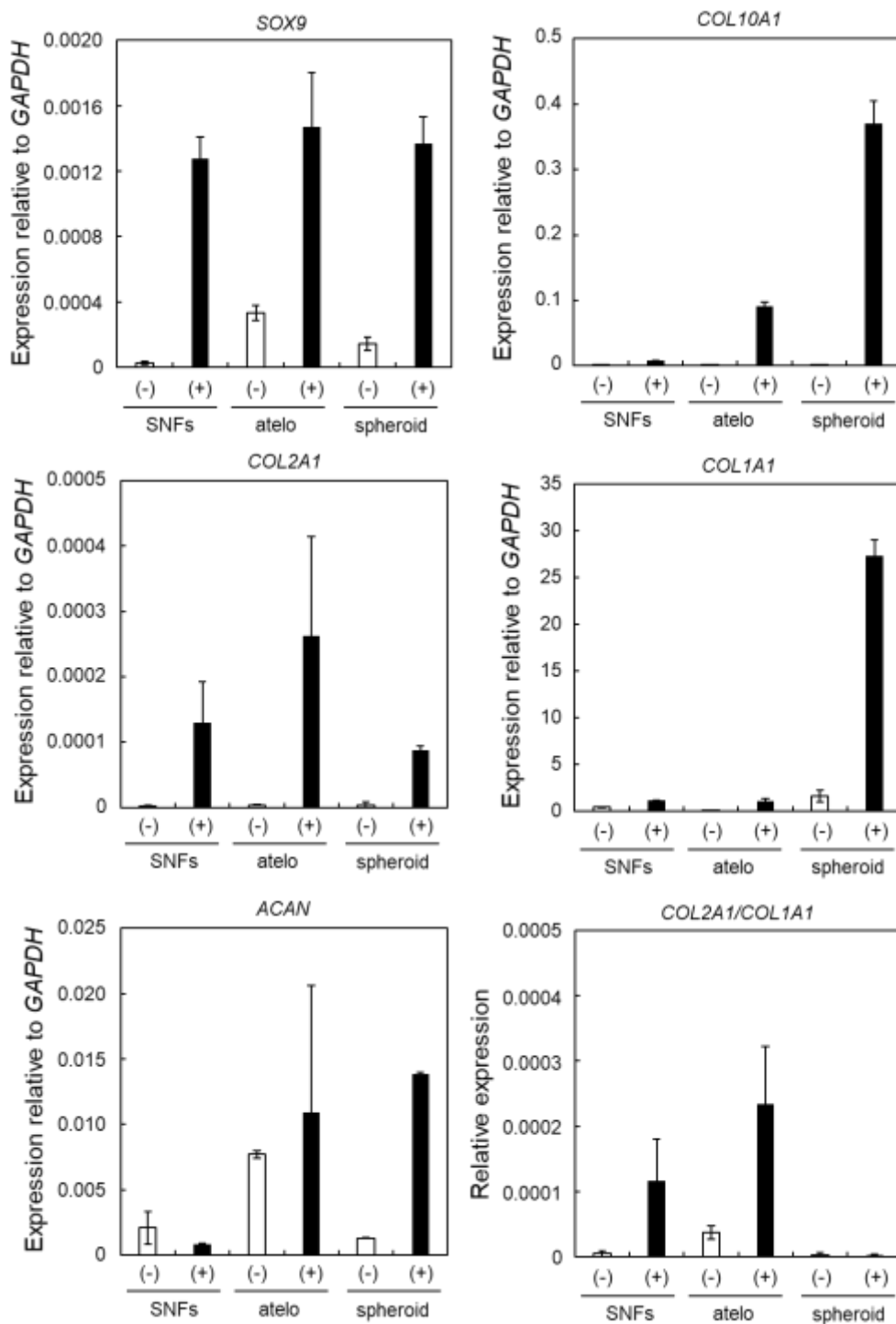


図 2-10. リアルタイム PCR を用いた mRNA 発現量評価. (-), (+) は分化因子の有無を示す。これらの値は *GAPDH* にて規格化している。(n=2)

## 2.4 結論

本章では、MSC からの軟骨細胞分化に焦点を当て、三次元足場材料の一つである SNFs を用い MSC を関節軟骨細胞へと分化させることで関節軟骨再生用の細胞源を確保することを目的とした。FITC-dextran を用い SNFs の物質透過性を調査したところ、culture insert と遜色ない物質透過が観察されたことから、酸素や栄養素などの透過を阻害することなく、分化培地に含まれる成長因子なども自由に透過可能なことが示唆され、三次元足場としての有用性を見出した。MSC を SNFs 上に播種し細胞増殖挙動を観察すると、二次元平面上で観察される接触阻害を誘発することなく SNFs 中の細胞は指数関数的に増殖した。この結果は SNFs 深部への細胞伸展を示唆する。実際に、共焦点顕微鏡による細胞観察により、SNFs 中の MSC は分化因子の有無によらず SNFs 深部に伸展し、その細胞形態は生体内環境の細胞と類似していた。この SNFs 中で培養した MSC の軟骨分化挙動を詳細に調査するため、SNFs に MSC を播種し通常培地と分化培地を用いて 4 週間培養した後、リアルタイム PCR により軟骨分化遺伝子の発現量を評価すると、SNFs 培養において関節軟骨細胞への選択的な分化が観察された。一般的にアテロコラーゲンは臨床材料として応用されているが、アテロコラーゲンの炎症惹起性や構造維持性の観点を鑑みると、<sup>34,35</sup> 生体外で MSC を関節軟骨細胞へ分化させる際には、アテロコラーゲンの安全性と長期安定性に未だ課題が残っている。一方、生体内ネットワーク構造との類似性や無機材料に基づく低毒性や構造保持性を有する SNFs 中における MSC の関節軟骨細胞への分化は、長期的な足場材料の確保が不可欠な細胞源として、安全にかつ安定に達成されることが示唆される。SNFs 中で MSC を関節軟骨細胞へと分化させた後、細胞毒性を与えないトリプシン EDTA を用いて SNFs 中に接着した細胞を剥離することで、生体内に直接投与可能な足場材料への細胞包埋も簡便に達成可能である。以上の結果は、関節軟骨再生のための細胞供給源として SNFs の有用性を示すものであり、無機材料のファイバー材料を用いた MSC の軟骨細胞分化に関する新たな知見の獲得に資する。

## 参考文献

1. Yamaguchi, T.; Sakai, S.; Watanabe, R.; Tarao, T.; Kawakami, K. Heat treatment of electrospun silicate fiber substrates enhances cellular adhesion and proliferation. *J. Biosci. Bioengin.* **2010**, *109*, 304-306.
2. Sakai, S.; Yamaguchi, T.; Putra, R. A.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Taya, M.; Kawakami, K. Controlling apatite microparticles formation by calcining electrospun sol-gel derived ultrafine silica fibers. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2012**, *61*, 374-380.
3. Yamaguchi, Y.; Deng, D.; Sato, Y.; Hou, Y. T.; Watanabe, R.; Sasaki, K.; Kawabe, M.; Hirano, E.; Morinaga, T. Silicate fiber-based 3D cell culture system for anticancer drug screening. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 5301-5309.
4. Otsuka, H.; Sasaki, K.; Okimura, S.; Nagamura, M.; Watanabe, R.; Kawabe, M. Contribution of Fibroblasts Cultured on 3D Silica Nonwoven Fabrics to Cocultured Hepatocytes Function. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 343-345.
5. Mizutami, T.; Ohta, Y.; Nakamura, M.; Komizu, Y.; Iwasa, T. Induction of drug resistance in human hepatoma cells cultured on a silicate fiber-based 3D scaffold. *Adv. Biochem. Biotechnol.* **2017**, 112.
6. Noi, M.; Mukaisho, K.; Yoshida, S.; Murakami, S.; Koshinuma, S.; Adachi, T.; Machida, Y.; Yamori, M.; Nakayama, T.; Yamamoto, G.; Sugihara, H. ERK phosphorylation functions in invadopodia formation in tongue cancer cells in a novel silicate fibre-based 3D cell culture system. *Int. J. Oral. Sci.* **2018**, *10*, 30.
7. Iijima, K.; Ishikawa, S.; Sasaki, K.; Hashizume, M.; Kawabe, M.; Otsuka, H. Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Electrospun Silica Nonwoven Fabrics. *ACS Omega* **2018**, *3*, 10180-10187.
8. Li, W.-J.; Tuli, R.; Huang, X.; Laquerriere, P.; Tuan, R. S. Multilineage Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in a Three-dimensional Nanofibrous Scaffold. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5158-5166.
9. Cao, Y.; Li, D.; Shang, C.; Yang, S. T.; Wang, J.; Wang, X. Three-Dimensional Culture of Human Mesenchymal Stem Cells in a Polyethylene Terephthalate Matrix. *Biomed. Mater.* **2010**, *5*, 065013.
10. Ardeshiryajimi, A.; Mossahebi-Mohammadi, M.; Vakilian, S.; Langroudi, L.; Seyedjafari, E.; Atashi, A.; Soleimani, M. Comparison of Osteogenic Differentiation Potential of Human Adult Stem Cells Loaded on Bioceramic-Coated Electrospun Poly (L-lactide) Nanofibres. *Cell Prolif.* **2015**, *48*, 47-58.
11. Pournaqi, F.; Ghiaee, A.; Vakilian, S.; Ardeshiryajimi, A. Improved Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Polyaniline Compositd by Polyethersulfone Nanofibers. *Biologicals* **2017**, *45*, 78-84.
12. Yang, Z.; Wu, Y.; Li, C.; Zhang, T.; Zou, Y.; Hui, J. H.; Ge, Z.; Lee, E. H. Improved mesenchymal stem cells attachment and in vitro cartilage tissue formation on chitosan-modified poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. *Tissue Eng Part A* **2012**, *18*, 242-251.
13. Stevens, M. M.; George, J. H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* **2005**, *310*, 1135-1138.

14. Shin, H. J.; Lee, C. H.; Cho, I. H.; Kim, Y. J.; Lee, Y. J.; Park, K. D.; Yui, N.; Shin, J. W. Electrospun Hydroxyapatite Containing Polyvinyl Alcohol Nanofibers Doped with Nanogold for Bone Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 103-119.
15. Cui, W.; Li, X.; Xie, C.; Chen, J.; Zou, J.; Zou, S.; Weng, J. Controllable growth of hydroxyapatite on electrospun poly(dl-lactide) fibers grafted with chitosan as potential tissue engineering scaffolds. *Polymer* **2010**, *51*, 2320-2328.
16. Yamashita, A.; Morioka, M.; Yahara, Y.; Okada, M.; Kobayashi, T.; Kuriyama, S.; Matsuda, S.; Tsumaki, N. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports* **2015**, *4*, 404-418.
17. Chung, C.; Burdick, J. A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng. Part A.* **2009**, *15*, 243-254.
18. Xu, J.; Wang, W.; Ludeman, M.; Cheng, K.; Hayami, T.; Lotz, J. C.; Kapila, S. Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Alginate Gels. *Tissue Eng. Part A*, **2008**, *14*, 667-80.
19. Ko, C. Y.; Yang, C. Y.; Yang, S. R.; Ku, K. L.; Tsao, C. K.; Chuang, D. C. C.; Chu, I. M.; Cheng, M. H. Cartilage formation through alterations of amphiphilicity of poly(ethylene glycol)–poly(caprolactone) copolymer hydrogels. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 25769-25779.
20. Lin, H. Cheng, A. W. M.; Alexander, P. G.; Beck, A. M.; Tuan, R. S. Cartilage tissue engineering application of injectable gelatin hydrogel with *in situ* visible-light-activated gelation capability in both air and aqueous solution. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 2402-2411.
21. Huang, S. S.; Huang, J. S. TGF- $\beta$  control of cell proliferation. *J. Cell Biochem.* **2005**, *96*, 447-462.
22. Patil, A. S.; Sable, R. B.; Kothari, R. M. An update on transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 3094-3103.
23. Richardson, S. M.; Kalamegam, G.; Pushparaj, P. N.; Matta, C.; Memic, A.; Khademhosseini, A.; Mobasher, R.; Poletti, F. L.; Hoyland, J. A.; Mobasher, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods* **2016**, *99*, 69-80.
24. Somoza, R. A.; Welter, J. F.; Correa, D.; Caplan, A. I. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2014**, *20*, 596-608.
25. Martinez-Sanchez, A.; Dudek, K. A.; Murphy, C. L. Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 916-924.
26. Dy, P.; Wang, W.; Bhattaram, P.; Wang, Q.; Wang, L.; Ballock, R. T.; Lefebvre, V. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev. Cell* **2012**, *22*, 597-609.
27. Armiento, A. R.; Alini, M.; Stoddart, M. J. Articular Fibrocartilage - Why does Hyaline Cartilage Fail to Repair? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *146*, 289-305.
28. Shepherd, D. E.; Seedhom, B. B. The 'instantaneous' Compressive Modulus of Human Articular Cartilage in Joints of the Lower Limb. *Rheumatology* **1999**, *38*, 124-132.

29. Wang, X.; Song, W.; Kawazoe, N.; Chen, G. The Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Controlled Cell-Cell Interaction on Micropatterned Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 3388–3395.
30. Frith, J. E.; Mills, R. J.; Hudson, J. E.; Cooper-White, J. J. Tailored Integrin-Extracellular Matrix Interactions to Direct Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 2442–2456.
31. Shepherd, D. E.; Seedhom, B. B. The ‘instantaneous’ compressive modulus of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Rheumatology* **1998**, *38*, 124-132.
32. Shariati, S. R. P.; Moeinzadeh, S.; Jabbari, E. Nanofiber Based Matrices for Chondrogenic Differentiation of Stem Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*, 8966–8977.
33. Schlichting, K.; Schell, H.; Kleemann, R. U.; Schill, A.; Weiler, A.; Duda, G. N.; Epari, D. R. Influence of scaffold stiffness on subchondral bone and subsequent cartilage regeneration in an ovine model of osteochondral defect healing. *Am. J. Sports Med.* **2008**, *36*, 2379-2391.
34. Charriere, G.; Bejot, M.; Schnitzler, L.; Ville, G.; Hartmann, D. J. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. *J. Am. Acad. Dermatol* **1989**, *21*, 1203-1208.
35. Nagai, N.; Mori, K.; Satoh, Y.; Takahashi, N.; Yunoki, S.; Tajima, K.; Munekata, M.; In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3201-3212.

## 第3章

# 分解性高分子架橋剤の作成と 分解性インジェクタブルゲル中での軟骨細胞 機能評価

### 3.1 緒言

第3章では、生体内に投与するだけで足場材料を構築可能なインジェクタブルゲルの作成と、ウシ膝軟骨細胞を用いた関節軟骨組織再生に関して検討した。さらに材料設計として、インジェクタブル性の獲得のみならず、包埋するウシ膝軟骨細胞の機能を向上可能なゲル分解性を、インジェクタブルゲルに付与した *in-situ* 設計も試みた。その主骨格として、軟骨組織に存在するグリコサミノグリカンとの構造類似性を有する CH<sup>1-3</sup> を選択し、それを架橋する分解性高分子として、PEG と PLA からなり末端を NHS で機能化した NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を選択することで、二成分混合型の分解性インジェクタブルゲルの設計を着想した(図 3-1)。本章では、分解性インジェクタブルゲル作成のため分解性高分子 NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS の合成について述べ、引き続き CH を主骨格とし NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を架橋剤として用い作成したゲルの物性評価とゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能について評価した。

従来の分解性ゲル作成には、光重合や、高濃度なポリマー溶液の調製が不可欠なミセル形成による物理的なゲル化駆動力を介する作成手法が主な戦略であった。<sup>7,8</sup> しかし、光照射は細胞毒性を伴うこと、また物理架橋ゲルは細胞支持性に乏しいことから、これら戦略は組織再生用途に不向きであると考えられる。本研究では、選択的な化学架橋による二成分混合型のインジェクタブルゲル作成手法を採用し、細胞毒性を与えることなく低濃度で細胞支持性に優れたゲルを作成することを考えた。本研究においては、足場材料のみならず薬物送達キャリアなど多分野において分解性セグメント、並びに疎水性ユニットとして用いられる代表的な脂肪族ポリエステルの PLA を選択し、<sup>4,6</sup> そのエステル加水分解によって結合が開裂するユニットを架橋剤中心部に組み込んだ NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を合成した。疎水性である PLA を架橋剤末端に配置すると CH との反応が損なわれてしまうが、本分解性架橋剤は親水性 PEG を末端に配置するため、CH のアミノ基との水中での反応性を損なうことなく、二成分を混合するだけで分解性インジェクタブルゲルを作成可能である。本章においては、形成する分解性インジェクタブルゲルの、ゲル化速度、力学強度、ゲル分解性に関して評価し、さらに、それを用い作成したウシ膝軟骨細胞包埋型ゲルの軟骨由来タンパク産生量(硫酸グリコサミノグリカン(sGAG)、コラーゲン(COL))、遺伝子発現量(*ACAN*、*COL2A1*、*COL1A1*) など、軟骨組織再生に向けた代表的な足場材料機能評価について述べた。

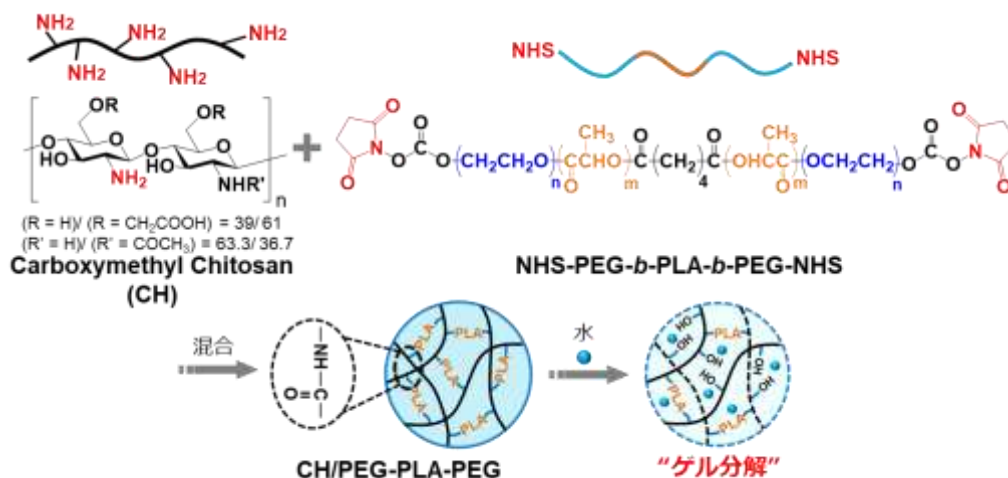


図 3-1. 本章における設計概要図。

## 3.2 実験

### 3.2.1 試薬、溶媒

第3章で用いる試薬、及び溶媒は表3-1の通りである。DL-lactide に関しては、再結晶操作を行い精製することで実験に使用した。THP-PEG-OH に関しては、独立行政法人国立高等専門学校機構・小山工業高等専門学校・飯島道弘教授にご指導いただき、同学校にて先行論文に倣い合成した。<sup>9</sup> 他の試薬、溶媒に関しては、それ以上の精製をすることなく使用した。

表 3-1. 試薬、溶媒

試薬名	購入先
Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN)	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Adipoyl chloride	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Benzene	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Carboxymethyl chitosan (CH) <sup>※1</sup>	Koyo Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Chloroform	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Dichloromethane	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Diethyl ether (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
<i>N,N'</i> -disuccinimidyl carbonate (DSC)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Ethyl acetate	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Fetal bovine serum (FBS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
DL-lactide	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Magnesium sulfate	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Penicillin-streptomycin (PS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Poly(ethylene glycol) (PEG) <sup>※2</sup>	Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)
Pyridine	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate (PPTS)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Tetrahydrofuran (THF)	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Tetrahydropyranyl-PEG (THP-PEG-OH) <sup>※3</sup>	
Tin(II) 2-ethylhexanoate (Sn(Oct)) <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)
Toluene	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Triethylamine (TEA)	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)

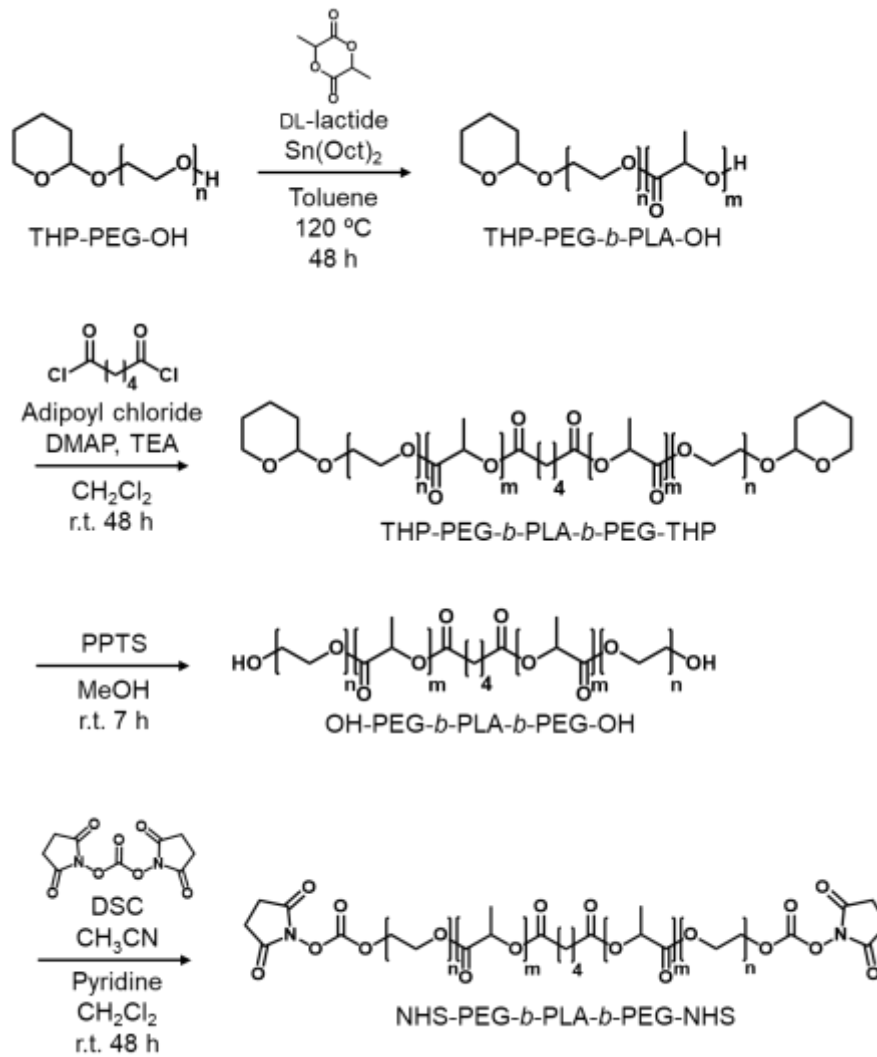
※1  $M_w=100000$ ,  $M_n=47000$ ,  $M_w/M_n=2.1$ , Deacetylation degree, 63.3%; Degree of substitution, 61%

※2  $M_n=4,583$

※3  $M_n=2,355$

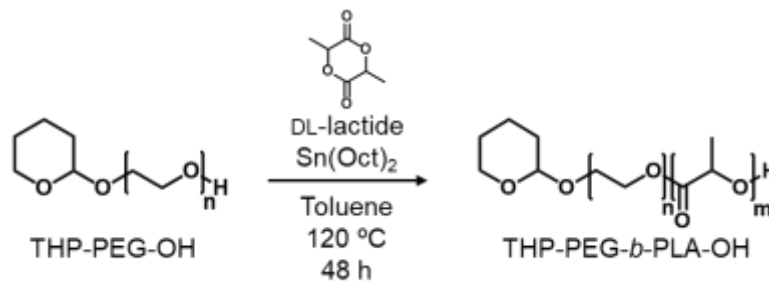


### 3.2.2 両末端反応性分解性架橋剤の合成



スキーム 3-1. 全体の合成スキーム.

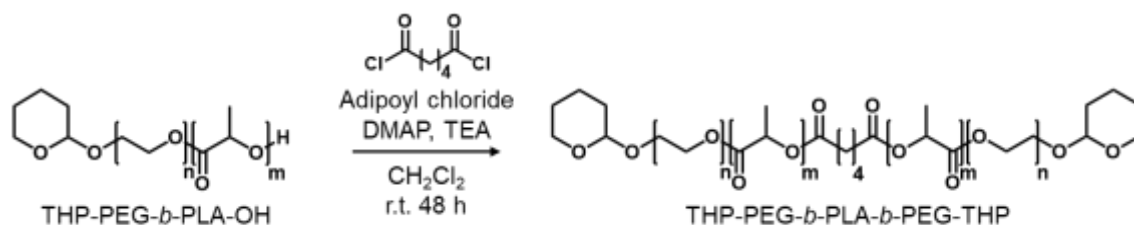
#### 3.2.2.1 THP-PEG-*b*-PLA-OH の合成



スキーム 3-2. THP-PEG-*b*-PLA-OH 合成スキーム.

窒素雰囲気下、THP-PEG-OH (2.0 g, 0.85 mmol), DL-lactide (980 mg, 6.8 mmol, 8 eq vs THP-PEG-OH)、および Sn(Oct)<sub>2</sub> (34 mg, 0.084 mmol, 0.1 eq vs THP-PEG-OH) を、toluene 100 mL に溶解した。混合溶液を 120 °C で 48 時間還流した後、減圧下で真空乾燥した。次に、サンプルを 10 mL の chloroform に溶解し、300 mL の diethyl ether に滴下することでサンプルを沈殿させた。この操作を 3 回繰り返した後、沈殿物を benzene 5 mL に溶解させ、凍結乾燥後、THP-PEG-*b*-PLA-OH を白色粉末として得た(収量: 1.5 g、収率: 74%)。得られた高分子を、TSKgel SuperMultiporeHZ-M カラム(Tosoh Corp., Tokyo, Japan) 付属のゲル浸透クロマトグラフィー(Gel permeation chromatography: GPC) システム(HLC-8320 GPC EcoSec, Tosoh Corp.) で分析した。THF を移動相として用い、0.35 mL/min の流量で高分子を分離し、RI 検出器で溶離液を分析した。さらに、高分子の分子量を、Chloroform-d (CDCl<sub>3</sub>, FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp., Osaka, Japan) を溶媒とした <sup>1</sup>H NMR 測定(Bruker Avance DPX-400 MHz) により計算した。尚、GPC 測定に関しては、独立行政法人国立高等専門学校機構・小山工業高等専門学校・飯島道弘教授にご協力いただき、同学校にて測定をしていただいた。

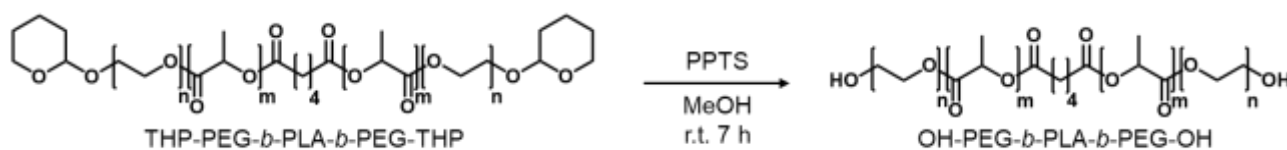
### 3. 2. 2. 2 THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP の合成



スキーム 3-3. THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP 合成スキーム.

窒素雰囲気下、THP-PEG-*b*-PLA-OH (2.0 g, 0.74 mmol)、DMAP (540 mg, 4.4 mmol, 6 eq vs THP-PEG-*b*-PLA-OH)、および TEA (410 μL, 2.9 mmol, 4 eq vs THP-PEG-*b*-PLA-OH) を dichloromethane 30 mL に溶解させ、氷水浴で 10 分間静置した。別途、adipoyl chloride (67 mg, 0.37 mmol, 0.5 eq vs THP-PEG-*b*-PLA-OH) を dichloromethane 20 mL に溶解させ、THP-PEG-*b*-PLA-OH 溶液にゆっくり滴下した。氷水浴を除き、室温で 48 時間攪拌後、反応溶液を 1 N HCl aq. 100 mL で 2 回、超純水 100 mL で 2 回洗浄し、magnesium sulfate を用いて反応溶液を脱水した。混合物を濾過し減圧下で濃縮した後、benzene を用いて凍結乾燥し THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP を白色粉末として得た(収量: 1.7 g、収率: 81%)。得られた高分子を CDCl<sub>3</sub> を溶媒とした <sup>1</sup>H NMR 測定、及び GPC 測定により評価した。

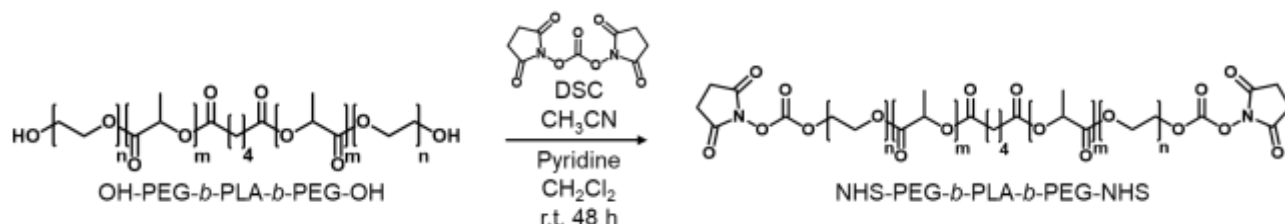
### 3. 2. 2. 3 OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH の合成



スキーム 3-4. OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH 合成スキーム.

窒素雰囲気下、THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP (1.5 g, 0.27 mmol)、PPTS (68 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq. vs THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP) を methanol 30 mL に溶解させ、室温で 7 時間攪拌した後、混合物を濾過し減圧下で濃縮した。サンプルを chloroform 10 mL に溶解させ、diethyl ether 300 mL に滴下することでサンプルを沈殿させた。この操作を 3 回繰り返した後、沈殿物を benzene 5 mL に溶解させ、凍結乾燥後、OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH を白色粉末として得た(収量：1.3 g、収率：91%)。得られた高分子を CDCl<sub>3</sub> を溶媒とした <sup>1</sup>H NMR 測定により評価した。

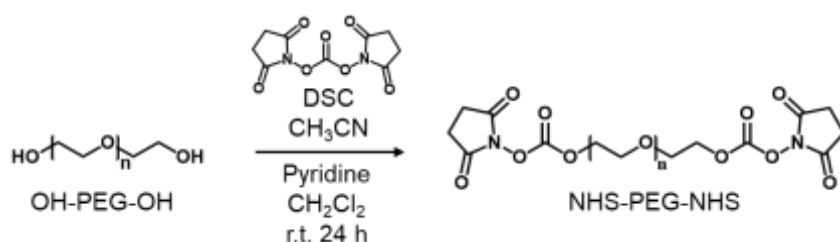
### 3. 2. 2. 4 NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS の合成



スキーム 3-5. NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS 合成スキーム.

窒素雰囲気下、OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH (1.2 g, 0.22 mmol) を dichlorometane 50 mL に溶解させ、室温で 10 分間攪拌した。別途、CH<sub>3</sub>CN 20 mL に DSC 0.28 g (1.1 mmol) を 50 °C で 30 分間溶解させた。DSC 溶液と PEG 溶液を混合した後、pyridine 200 μL を添加し、室温で 24 時間攪拌した。反応後、混合溶液を濾過し、減圧下で濃縮した後、サンプルを chloroform 10 mL に溶解させ、diethyl ether 300 mL に滴下することでサンプルを沈殿させた。この操作を 3 回繰り返した後、沈殿物を benzene 5 mL に溶解させ凍結乾燥後、NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を白色粉末として得た(収量：1.0 g、収率：90%)。得られた高分子を CDCl<sub>3</sub> を溶媒とした <sup>1</sup>H NMR 測定により評価した(NHS 置換度：99%)。

### 3. 2. 2. 5 NHS-PEG-NHS の合成



スキーム 3-6. NHS-PEG-NHS 合成スキーム.

窒素雰囲気下、PEG (2.0 g, 0.4 mmol) を dichlorometane 50 mL に溶解させ、室温で 10 分間攪拌した。別途、CH<sub>3</sub>CN 20 mL に DSC 0.51 g (2.0 mmol) を 50 °C で 30 分間溶解させた。DSC 溶液と PEG 溶液を混合した後、pyridine 200 μL を添加し、室温で 24 時間攪拌した。反応後、混合溶液を濾過し、減圧下で濃縮した後、サンプルを chloroform 10 mL に溶解させ、diethyl ether 300 mL に滴下す

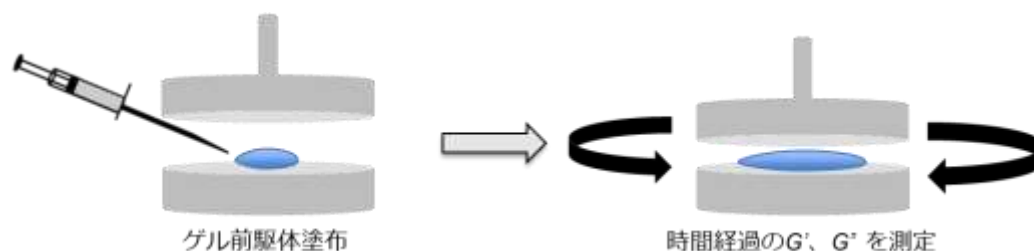
ることでサンプルを沈殿させた。この操作を 3 回繰り返した後、沈殿物を benzene 5 mL に溶解させ、凍結乾燥後、NHS-PEG-NHS を白色粉末として得た(収量：1.8 g、収率：90%)。得られた高分子を  $\text{CDCl}_3$  を溶媒とした  $^1\text{H NMR}$  測定により評価した(NHS 置換度：99%)。

### 3.2.3 ゲル形成評価

CH と NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS との混合によるゲル化は、バイアル傾斜試験によって評価した。様々な濃度の PBS で CH、及び NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を別々に調製し、CH 溶液に対し PEG 溶液を加えることで、ゲル形成に必要となる両者の添加濃度を調査した。300  $\mu\text{L}$  の 2.0/1.0 wt% CH/PEG-PLA-PEG の作成を一例に挙げて説明する。100  $\mu\text{L}$  の 6 wt% CH 溶液を PBS を用いて調製し、150  $\mu\text{L}$  の PBS を添加した。一方、50  $\mu\text{L}$  の 6 wt% NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS 溶液を PBS を用いて別の容器に調製しておき、直後に CH 溶液に添加し激しく攪拌した。室温で 30 分静置した後、バイアルを傾斜させ流動性を確認することで混合サンプルのゲル化を目視で確認した。

### 3.2.4 ゲル化ダイナミクス解析

CH/PEG-PLA-PEG のゲル化時間、及びゲル化ダイナミクスを解析するため、各溶液を混合した直後からの貯蔵弾性率( $G'$ ) と損失弾性率( $G''$ ) の経時的変化を動的粘弾性装置(HAAKE MARS Rotational Rheometer, Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) により評価した(ひずみ：1%、周波数：1 Hz)。2.0/1.0 wt% CH/PEG-PLA-PEG を作成する場合、100  $\mu\text{L}$  の 6 wt% CH 溶液と 200  $\mu\text{L}$  の PBS を装置の底板に置き、50  $\mu\text{L}$  の 6 wt% NHS-PEG-NHS 溶液を混合し測定を開始した。これら全ての測定は、平面型プレートを用い、20  $^{\circ}\text{C}$  で行った。

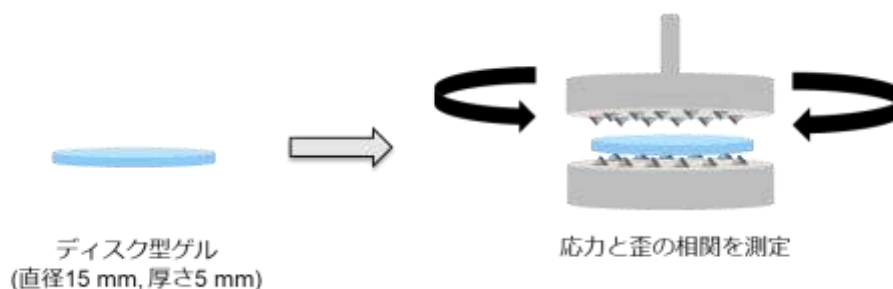


スキーム 3-7. ゲル化ダイナミクス測定概略図。

### 3.2.5 ゲルの力学強度、膨潤度評価

ゲルの力学特性を動的粘弾性装置(HAAKE MARS Rotational Rheometer) を用い、応力-ひずみ曲線を作成することで算出した。300  $\mu\text{L}$  のディスク型ゲル(直径 15 mm、厚さ 5 mm) を上記同様に作成し、PBS を 1 mL 添加し 20  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間浸漬させることでゲルを平衡膨潤に達させた。ゲル表面に付着した水を拭き取った後、ゲルを装置底板に置き荷重が 0.5 N に達するまでコーン型の上部プレートを近づけた。ひずみ速度 1 mm/min でハイドロゲルを歪ませ、その際の応力を計測することでゲルの応力-歪曲線を作成した。ゲルの力学強度は、0-10% の歪み範囲における応力-歪曲線の

初期勾配から算出した。経過時間毎の力学強度評価においては、上記同様に 300  $\mu\text{L}$  のディスク型ゲルを作成し、40 日間 3 mL の PBS に浸漬させた後、応力-ひずみ曲線を作成することで力学強度を算出した。この際、PBS は 2, 3 日毎に全て除去し、フレッシュな PBS を新たに 3 mL 添加した。



スキーム 3-8. 応力-歪曲線測定概要図.

次に、ゲルの膨潤度を、先行論文にて報告されたように算出した。<sup>7</sup> 1.5 mL のサンプリングチューブに対し、上記同様に 300  $\mu\text{L}$  のハイドロゲルを作成し表面の水を除去した後、ゲルの膨潤重量( $W_s$ ) を計測した。ゲルを凍結乾燥することで乾燥重量( $W_d$ ) を計測した後、膨潤率( $Q$ ) を以下の式により算出した。

$$Q = (W_s - W_d) / W_d$$

$W_s$  : 膨潤重量

$W_d$  : 乾燥重量

### 3.2.6 理論ゲル化含有量評価

300  $\mu\text{L}$  のゲルを上述の操作に従い作成した。作成したゲルを、PBS 1 mL に 4°C で 48 時間浸漬させた後、超純水 1 mL に 4°C で 48 時間さらに浸漬させた。6 時間毎に上澄みを交換し、ゲルから塩と非架橋高分子を除去した。ゲルを凍結乾燥し白色固体として回収し、乾燥重量( $W_{gel}$ ) を測定した。ゲル化含有率(*Gel cont.*) は  $W_{gel}$ 、及び理論ゲル化重量( $W_t$ ) から以下の式のように計算した。

$$Gel\ cont.\ (\%) = W_{gel} / W_t \times 100$$

$W_{gel}$  : 測定重量

$W_t$  : 理論ゲル化重量

### 3.2.7 ゲルの分解挙動評価

ゲルの分解挙動を観察するため、所定条件に暴露したゲルの経時的な乾燥重量( $W_d$ ) を測定することにより評価した。生理条件下におけるゲルの分解試験においては、300  $\mu\text{L}$  のゲルを上述のように作成した後、PBS 1 mL に浸漬させ 37°C に静置し、上澄みの PBS を 3 日毎に新しい PBS と交換した。0、2、4、7、14、21、28、40、50、60 日経過後、ゲルを凍結乾燥し乾燥重量( $W_x$ ) を測定し

た。ゲル作成直後の乾燥重量( $W_0$ ) を基準とし、以下の式のように重量損失割合(*Weight loss*) を算出することでゲルの分解挙動を観察した。

$$\text{Weight loss (\%)} = (W_0 - W_x) / W_0 \times 100$$

$W_0$  : 初期乾燥重量

$W_x$  : 経過乾燥重量

ゲルの分解に伴う力学挙動変化を測定するため、上述のように 300  $\mu\text{L}$  のディスク型ゲルを作成した後、PBS 3 mL に浸漬させ 37  $^{\circ}\text{C}$  に静置し 20、40、60 日後における力学挙動変化を動的粘弾性測定装置を用いて測定した。上澄みの PBS は 3 日毎に新しい PBS と交換した。

酸性条件下におけるゲルの分解挙動を観察するため、上述の操作と同様に、酢酸を用いた分解試験を行った。本実験においても初期の乾燥重量と経過時間毎の乾燥重量との重量損失割合を算出することでゲルの分解挙動を評価した。加え、分解性セグメント濃度に依存した分解挙動を観察するため、NHS-PEG-NHS と NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS との架橋剤混合割合を、NHS-PEG-NHS : NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS = 100 : 0、75 : 25、50 : 50、25 : 75、0 : 100 と様々変えた混合架橋剤を使用することでゲルを作成し、分解挙動を評価した。

### 3.2.8 ゲルの内部構造評価

ハイドロゲルを上記方法で作成した後、液体窒素によりゲルを凍結させた。凍結乾燥後、剃刀を用いてゲルを裁断し切断面を露出させた後、イオンスパッタ装置(MC1000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)を用いて Pt-Pd を蒸着させた。ハイドロゲルの内部構造を、SEM (S-4800, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) により測定した。

### 3.2.9 ウシ膝軟骨細胞包埋型ゲルの作成

ウシ膝軟骨細胞(Chondrocytes, P0,  $1.0 \times 10^6$  cells) を 10 cm ディッシュ(100 mm  $\times$  20 mm, Corning, NY, USA) に播種し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 5%  $\text{CO}_2$  条件下、10 mL の DMEM (10% FBS, 2% PS 含む) を用いて 2 週間培養した。ゲルへのウシ膝軟骨細胞の包埋には、CH 溶液にウシ膝軟骨細胞を分散させることを除き、上述と同様の方法で行った。ウシ膝軟骨細胞( $5.0 \times 10^5$  cells) を 25  $\mu\text{L}$  の 4 wt% CH 溶液に懸濁させ、12.5  $\mu\text{L}$  の 4 wt% NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS 溶液と 12.5  $\mu\text{L}$  の PBS を混合した。これらのゲル化は、1.5 mL サンプリングチューブ中で行い、ウシ膝軟骨細胞のゲル内最終密度を  $1.0 \times 10^7$  cells/mL になるよう調整した。ゲル中に包埋したウシ膝軟骨細胞を培養するため、500  $\mu\text{L}$  の DMEM をゲル上部に添加し、2 ヶ月間標準培養条件(37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) にてウシ膝軟骨細胞を培養した。培地中に放出されたタンパク質量を定量するため、2, 3 日毎に培地全量を回収し、新たな DMEM を 500  $\mu\text{L}$  添加した。

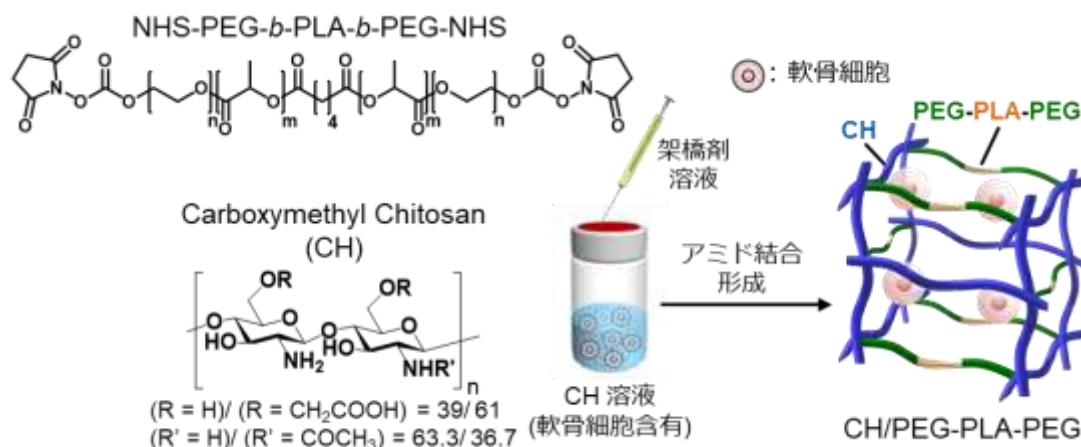


図 3-2. NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS と CH を用いたゲル作成方法.

### 3. 2. 10 細胞形態観察

ウシ膝軟骨細胞を包埋したゲル内の細胞形態と分布を観察するため、培養 0, 10, 20, 30, 40 日後におけるゲル断面画像を CLSM を用いて取得した。所定期間培養後、500  $\mu$ L の 5  $\mu$ g/mL hoechst 33342 溶液(DMEM 溶液, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) をゲル上部に添加し暗所で 1 時間インキュベートした。次に、4% paraformaldehyde 溶液(PBS, FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp., Osaka, Japan) を用いてゲル内のウシ膝軟骨細胞を 20 分間固定化し、さらに 500  $\mu$ L の 0.5% Triton X-100 水溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp.) を用いて 5 分間インキュベートした後、1% alexa fluor™ 594 phalloidin 溶液(Thermo Fisher Scientific Inc.) で 6 時間インキュベートした。これらの染色過程は全て 37°C、暗所で行い、各ステップ間に PBS を用いて 3 回洗浄操作を行った。包埋したウシ膝軟骨細胞の三次元分布を得るため、z 次元でそれぞれ厚さ 8  $\mu$ m のスライス画像を取得し、150  $\mu$ m 区間におけるスタック画像を取得した。

### 3. 2. 11 細胞生死観察

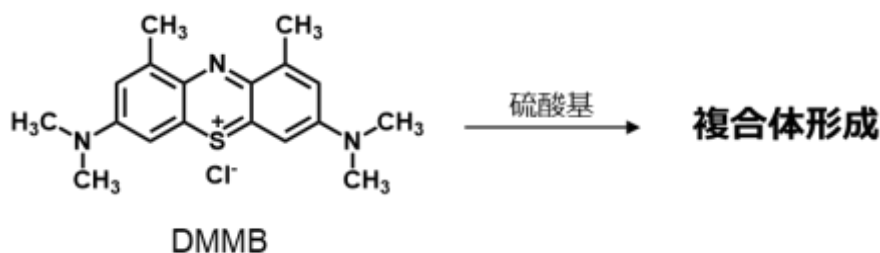
ゲル包埋直後の細胞生存を確認するため、ゲル内に包埋した細胞を calcein-AM (4  $\mu$ M, Thermo Fisher Scientific Inc.)、及び ethidium homodimer (4  $\mu$ M, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて染色した。具体的には、上述のようにディスク型ゲルを 12-well PLL 基板上に作成し 12-well plate に落とし込んだ後、calcein-AM 溶液(in DMEM) 1 mL を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間インキュベートすることで生細胞を染色した。溶液を除去し PBS 1 mL を用いて 3 回洗浄した後、ethidium homodimer 溶液(in DMEM) を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間インキュベートすることで死細胞を染色した。染色後、共焦点レーザー顕微鏡(MBS 488/594 beam splitters for calcein-AM、及び MBS 458/561 beam splitter for ethidium homodimer 備え付け) を用いてゲル内細胞を観察した。

### 3.2.12 細胞数評価

ゲルに分解性を付与した際の細胞機能を詳細に評価するため、ゲル内培養に伴う細胞数の経時変化を観察した。細胞数の評価には、hoechst 33342 染色と共焦点レーザー顕微鏡観察を組み合わせ、観察される蛍光強度により評価した。上述のようにディスク型ゲル(150  $\mu\text{m}$   $\times$  5.5 mm) を 12-well PLL 基板の上に作成し 12-well plate に落とし込み、DMEM を 1 mL 添加することで培養した。10、20、30、40 日培養後、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hoechst 33342 溶液(in DMEM) に暗所で 1 時間浸漬させ、PBS 1 mL で 3 回洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡を用い、2.91  $\mu\text{m}$  の厚さで z 軸に対し画像を取得し、各画像の蛍光強度を積算した。所定の細胞密度となるようディスク型ゲルを作成し、得られる蛍光強度の積算値から算出した検量線に外挿することで細胞数を算出した。

### 3.2.13 sGAG 定量

ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞の細胞機能を評価するため、培地中に放出された硫酸グリコサミノグリカン(sulfated glycosaminoglycan; sGAG) とゲル内に蓄積した sGAG を、dimethylmethylene blue (DMMB) assay によって定量した。10, 20, 30, 40 日培養後、培養ゲルサンプルを PBS を用いて 3 回洗浄し、500  $\mu\text{L}$  2N NaOHaq. を用いて 60  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間ゲルを加水分解した。加水分解サンプルは定量するまで -20  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。sGAG を定量するため、4 mg の DMMB を 1.25 mL のエタノールに溶解し、0.75 mL のギ酸と 6.4 mL の 1M NaOHaq. を加え、超純水を用いて 250 mL にメスアップすることで DMMB 試薬を調整した。回収培地サンプル、又は加水分解サンプル 20  $\mu\text{L}$  を DMMB 溶液 125  $\mu\text{L}$  と混合し、570 nm における吸光度を microplate reader (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて評価した。sGAG 量は、chondroitin sulfate (Sigma Aldrich Japan, Toyko, Japan) を用い検量線を作成し、吸光度を外挿することで定量した。



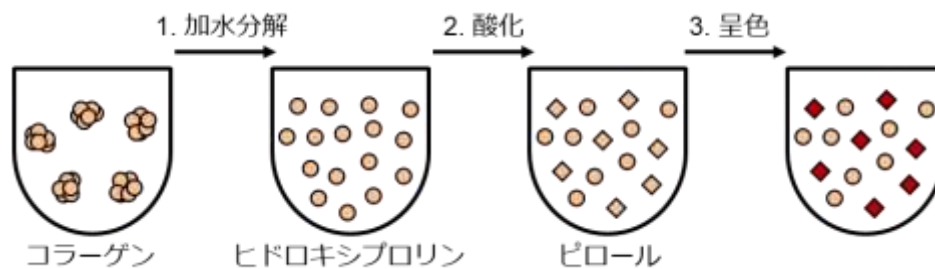
スキーム 3-9. DMMB assay 概要図.

### 3.2.14 COL 定量

先行論文にて報告された hydroxyproline assay を用い、軟骨基質であるコラーゲン(collagen; COL) を定量した。<sup>10</sup> 200  $\mu\text{L}$  の回収サンプル、または 50  $\mu\text{L}$  のゲルサンプルに対し、20  $\mu\text{L}$  の 5N HClaq.、200  $\mu\text{L}$  の 150 mM PBS、200 mg の NaCl、及び 100  $\mu\text{L}$  の 1M ホウ酸緩衝液(pH : 8.7) を添加し pH を 7.0-8.0 に調整した。続いて、200  $\mu\text{L}$  の 0.2 M chloramine-T 溶液(Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) を加え、20  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間 hydroxyproline を酸化させ、6 M sodium thiosulfate 溶液 100



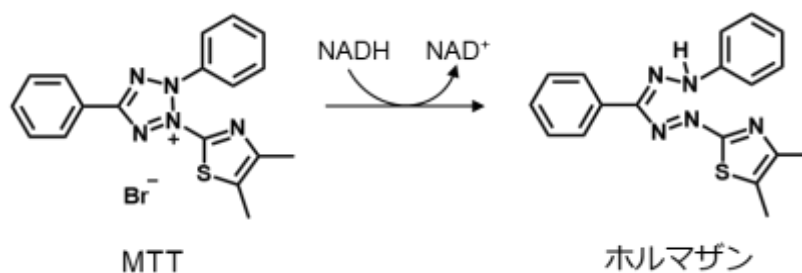
μL を混合し、酸化反応を停止させた。混合溶液を 100 °C で 24 時間加熱することで pyrrole を生成させた後、toluene 100 μL を加え 30 分間激しく振とうさせた。Toluene 相を別の容器に移した後、100 μL の *p*-dimethylaminobenzaldehyde (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) を加え室温で 15 分間インキュベートした。色調変化を microplate reader を用いて 570 nm における吸光度を測定した。検量線を、L-hydroxyproline (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて決定し、定量される hydroxyproline の 0.1 当量を COL 量とした。<sup>10</sup>



スキーム 3-10. Hydroxyproline assay 概要図.

### 3.2.15 代謝活性評価

ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞の代謝活性を、以前報告された 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT, Wako, Osaka, Japan) assay によって評価した。<sup>11</sup> 所定時間培養した後、培地全量を回収し 0.5 mg/mL MTT 溶液(in DMEM) を 500 μL 加え、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 24 時間インキュベートした。溶液を除去しゲルを PBS で 3 回洗浄した後、紫色のホルマザン塩を溶出させるため 0.04 M HCl aq. 含有イソプロパノール 500 μL 加え 24 時間室温でインキュベートした。得られた溶液に対し、570 nm における吸光度を microplate reader を用いて測定した。



スキーム 3-11. MTT assay 概要図.

### 3.2.16 H&E 染色、AB 染色

ゲル内に蓄積した代表的な軟骨基質を可視化するため、hematoxylin and eosin (H&E) 染色、及び Alcian Blue (AB) 染色を行った。ウシ膝軟骨細胞を包埋したゲルを 40 日間培養後、ゲルを PBS 1 mL で 3 回洗浄し、4% paraformaldehyde 溶液を 1 mL 添加し室温で 20 分間固定化し、再度 PBS 1 mL で 3 回洗浄した。ゲルを OCT を用いて瞬間冷却し、厚さ 7  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。切片をスライドガラスに移し、4°C で 24 時間接着させた。AB (pH 2.5, Wako, Tokyo, Japan) を用いてゲル内に蓄積した sGAG を染色し、H&E (Sigma Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を用いて細胞核と細胞質を染色した。本実験は、東京理科大学薬学部生命創薬科学科榎上賀一教授、及び水之江雄平博士にご教授いただき、本学で実験を行った。

### 3.2.17 遺伝子発現評価

ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の総 RNA を、RNeasy<sup>®</sup> ミニキット(Qiagen Inc.) と Trizol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc.) を組み合わせ回収し、ウシ膝軟骨細胞に特有の遺伝子発現量を定量した。所定時間培養後、ゲルを PBS を用いて 3 回洗浄し、Powermasher (Nippi Inc.)、及び biomasher II (Nippi Inc.) を使用してゲルを Trizol<sup>®</sup> 中でホモジナイズし、製造元のプロトコールに従い総 RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて cDNA を生成し、RT-PCR により生成物を増幅させた。<sup>12</sup> 生成物を 2% agarose gel を用いて電気泳動し、ゲルを 0.5  $\mu\text{g/mL}$  EtBr 水溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp., Osaka, Japan) に浸漬させた後、Gel Doc<sup>™</sup> EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, Inc., Philadelphia, PA, USA) を用いてイメージングを行うことで、出現バンドの濃淡により遺伝子発現量を定量した。この際、各種遺伝子のバンド強度を、*GAPDH* を用いて規格化した後、培養 30 日における CH/PEG との相対値を、遺伝子発現量として示した。詳細なプライマーの情報を以下に示す。*COL1A1*,<sup>13</sup> 5'-ctctgactggaagagcggagaatac-3' (sense) and 5'-ctgttctgcagtggtaggtgatgt-3' (antisense); *COL2A1*,<sup>13</sup> 5'-aacggtggcttccacttc-3' (sense) and 5'-gtctctgccttgacccaag-3' (antisense); *aggrecan (ACAN)*,<sup>14</sup> 5'-cactgttaccgccacttccc-3' (sense) and 5'-gacatcgttccactcgcct-3' (antisense); *GAPDH*,<sup>15</sup> 5'-tctctgcaccaccaactgc-3' (sense) and 5'-cattgtcgtaccaggaaatg-3' (antisense).

表 3-2. PCR 条件

遺伝子	変性 温度	変性 時間	アニーリング 温度	アニーリング 時間	溶出 温度	溶出 時間	サイクル数
<i>ACAN</i>	94 °C	45 s	60 °C	45 s	72 °C	60 s	30
<i>COL1A1</i>	94 °C	45 s	57 °C	45 s	72 °C	60 s	35
<i>COL2A1</i>	94 °C	45 s	57 °C	45 s	72 °C	60 s	35
<i>GAPDH</i>	94 °C	45 s	60 °C	45 s	72 °C	60 s	30

## 3.3 結果と考察

### 3.3.1 両末端反応性分解性架橋剤の合成

THP-PEG-OH の末端に対し DL-lactide の開環重合後に得られた化合物の GPC 測定結果において、反応前駆体である THP-PEG-OH と比較し高分子領域側に単峰性の溶出ピークが出現したことから、DL-lactide を用いた重合反応の進行制御を確認した(図 3-3)。加え、得られた化合物の  $^1\text{H NMR}$  スペクトルにおいては、PEG、THP、PLA のプロトンに由来するシグナルピークがそれぞれ、3.3-4.4 ppm、4.6 ppm、5.1-5.3 ppm に観察されたことから THP-PEG-*b*-PLA-OH の合成を確認し(図 3-4)、PEG プロトンピーク強度を基準とする PLA プロトンピークの積算値より、PLA の重合度を 5 と決定した。

次に、得られた THP-PEG-*b*-PLA-OH を用い adipoyl chloride との縮合反応を行うことでトリブロックコポリマーの合成を既報に従い試みた。<sup>16</sup> 得られた化合物の GPC 測定結果において、THP-PEG-*b*-PLA-OH と比較し高分子領域側に単峰性の溶出ピークが観察されたことから、THP-PEG-*b*-PLA-OH と adipoyl chloride との反応性は非常に高く、トリブロックコポリマーを合成する戦略として非常に有望であることが示唆される。さらに、 $^1\text{H NMR}$  スペクトルにおいては、adipoyl chloride のプロトンに由来するシグナルピークが 2.3 ppm 付近に観察されたことから(図 3-5)、THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP の合成に成功したことを確認した。

次に、PPTS を酸触媒として用い THP の脱保護を試みた。ここでは、酸による PLA のエステル加水分解を防ぐため、トシル酸などの強酸ではなく、pKa 5.21 の弱酸である PPTS を選択した。<sup>17</sup> 反応後に得られた化合物の  $^1\text{H NMR}$  スペクトルより、PLA のプロトンシグナルの強度減少なく、THP のプロトンに由来するシグナルピークの完全な消失が観察されたことから THP の脱保護を確認し、OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH の合成を確認した(図 3-6)。

引き続き DSC との縮合反応により得られた化合物の  $^1\text{H NMR}$  スペクトルにおいては、NHS のプロトンに由来するシグナルが 2.7 ppm 付近に観察され、その強度より NHS 基の高分子末端への導入率は 99% 以上であることを確認した(図 3-7)。これらの結果より、NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS の分子量を 5,380 と決定し、同様に非分解性架橋剤として NHS-PEG-NHS もスキーム 3-6 に示すように合成した(図 3-8)。

ABA 型トリブロックコポリマーの合成は一般的に、モノマー開始剤を用いた重合、または本研究のように別途調整したポリマー同士の縮合反応によって達成されるが、<sup>18,19</sup> 前者の方法を用いた PEG-*b*-PLA-*b*-PEG の合成は現在まで達成されていない。この重合は PLA をエチレンオキシドのアニオン開環重合により PEG の重合反応を進行させるが、PLA のアルコキシド化された末端は、隣接するカルボニル基の電子吸引性のためエチレンオキシドの重合を開始するには安定性が高すぎる。そのため、重合は停止してしまうと考えられる。従って、エチレンオキシドと DL-lactide の逐次重合による PEG-*b*-PLA-*b*-PEG の合成報告例はなく、本研究においては後者の PEG-*b*-PLA の縮合反応を利用することでトリブロックコポリマー PEG-*b*-PLA-*b*-PEG を合成し、引き続き末端の機能化を行った。

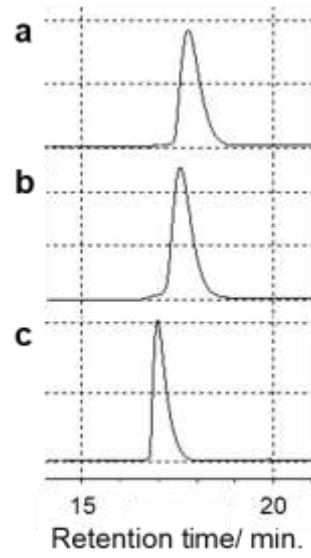


図 3-3. GPC 測定結果. (a) THP-PEG-OH, (b) THP-PEG-*b*-PLA-OH, (c) THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP.

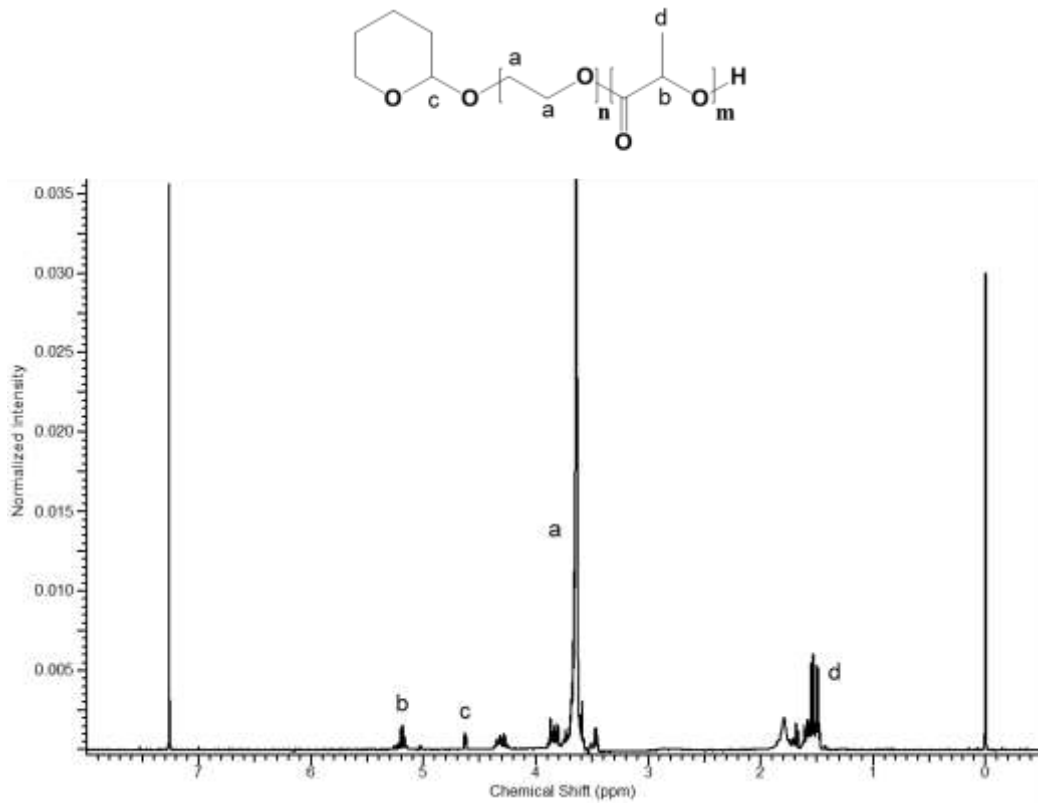


図 3-4. THP-PEG-*b*-PLA-OH の  $^1\text{H}$  NMR 測定結果.

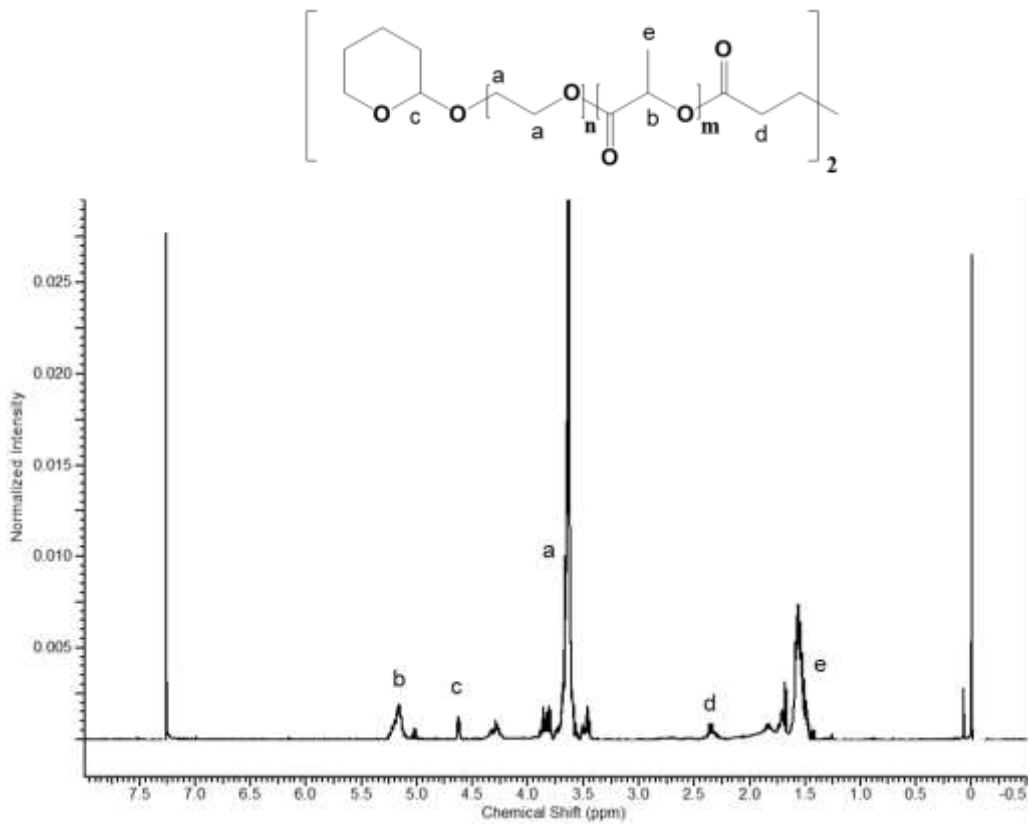


図 3-5. THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP の <sup>1</sup>H NMR 測定結果.

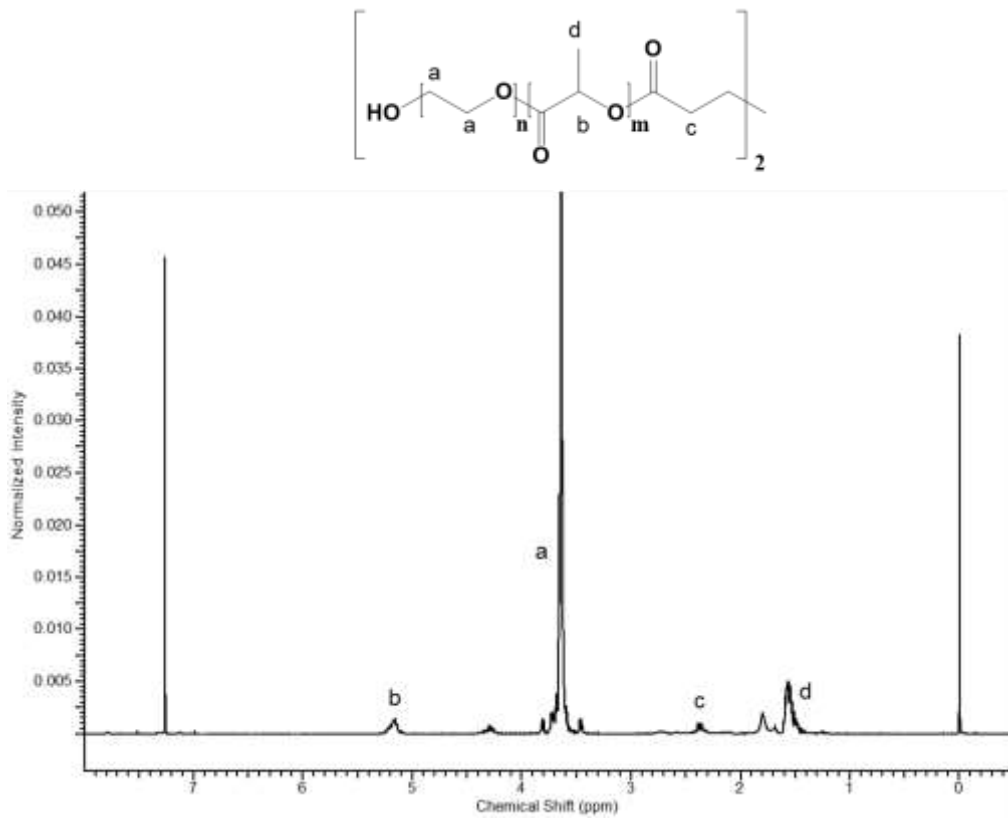


図 3-6. OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH の <sup>1</sup>H NMR 測定結果.

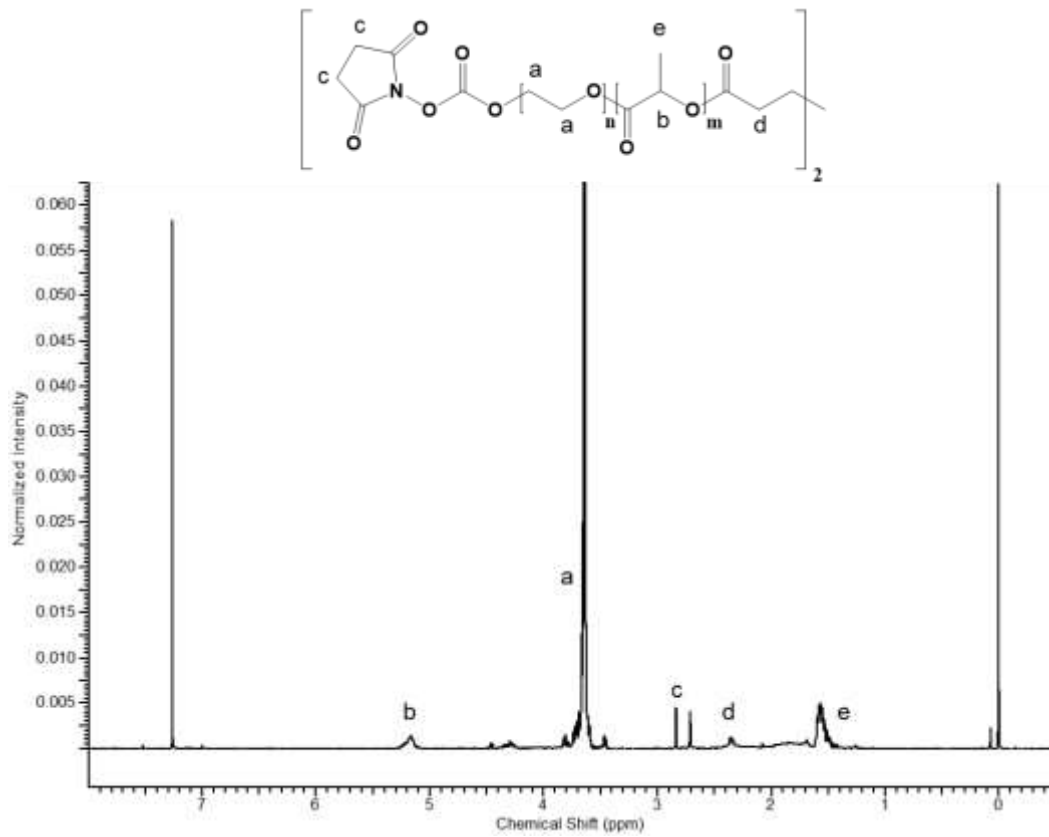


図 3-7. NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS の  $^1\text{H}$  NMR 測定結果.

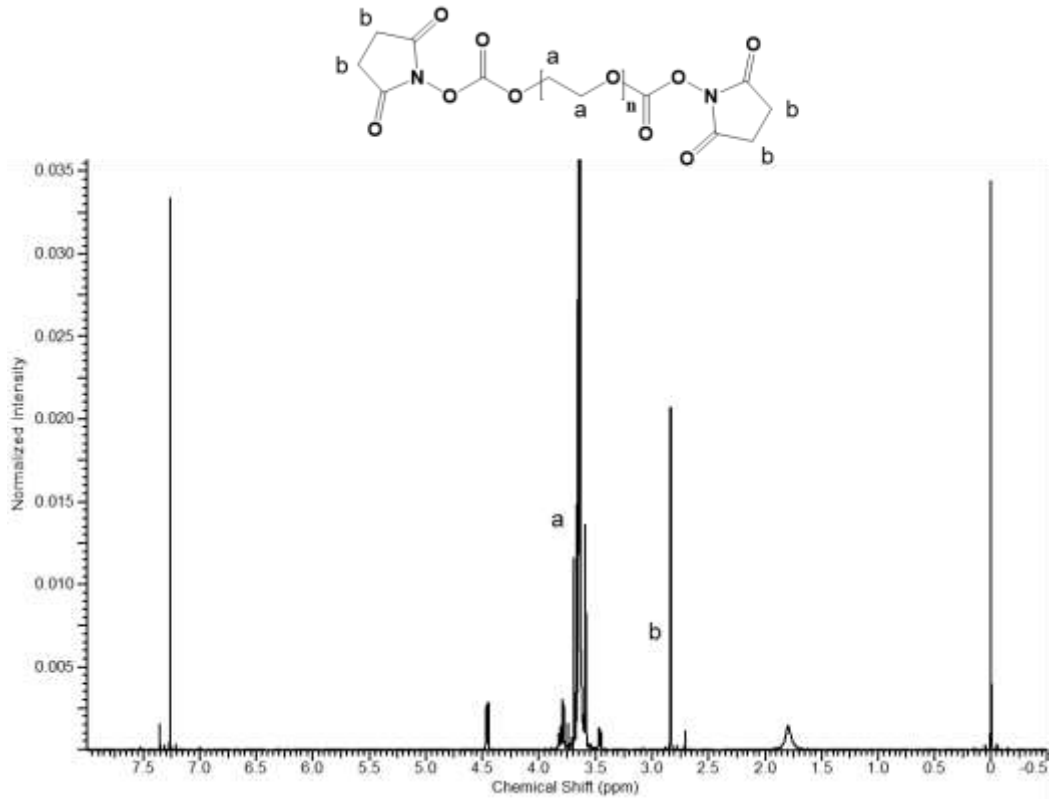


図 3-8. NHS-PEG-NHS の  $^1\text{H}$  NMR 測定結果.

### 3.3.2 ゲル化メカニズム及びゲル化速度評価

合成した NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS がインジェクタブルゲルを形成するための架橋剤として駆動するかどうか確認するため、NHS と水溶液中における反応性の高いアミノ基を有する CH を用いたゲル化試験を行った。CH は甲殻類をアルカリ処理し得られるチキン誘導体であり、軟骨組織に豊富に含まれるグリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、及びそれら誘導体と構造的に類似した化合物である。<sup>13</sup> 従って、CH を用いたハイドロゲルは軟骨組織再生のため有望な足場材料となると期待されている。<sup>13</sup> 本実験においては、対象実験として非分解性架橋剤である NHS-PEG-NHS を用い、PLA の有無におけるゲル物性の違いを観察した。

架橋剤と CH とのゲル化特性を、各々の混合濃度を様々変え作成したゲル化相図により評価した(図 3-9)。生体内でも軟骨組織を形成可能なインジェクタブルゲル作成のためには、粘性の低い低濃度領域におけるゲル化は重要な特性の一つであり、その特性により包埋する細胞の分散性や組織再生性に影響を与える。<sup>20</sup> 高分子濃度が高いと細胞分散性が不十分であり、形成組織の不均一性や毒性の懸念となる。<sup>20</sup> 従って本研究では、2 wt% を上限高分子濃度とし、それ以下の濃度における CH と架橋剤とのゲル化特性を調査した。NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS と CH とのゲル化に関して、双方の濃度が 0.75 wt% 以上の高分子領域におけるゲル化が観察された(図 3-9a)。また、NHS 官能基の代わりに、未機能化 OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH を用いたゲル化試験を行ったところゲル化は観察されなかった。これらの結果は、PLA セグメントに由来する疎水性相互作用を介したゲル化ではなく、CH のアミノ基と架橋剤の NHS を介した共有結合によるゲル化を示唆する。一方、NHS-PEG-NHS と CH のゲル化に関しては、僅かな低濃度領域側におけるゲル化が確認された(図 3-9b)。これは、架橋に寄与する NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS のミセル形成によるものと考えられる。NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS は水溶液中において、ゲル化濃度よりも低い濃度(0.1 wt%) でミセルを形成することを確認している(図 3-10)。従って、そのミセル形成により CH のアミノ基との反応性に乏しくなった結果、CH/PEG-PLA-PEG において CH/PEG よりも僅かな高濃度領域におけるゲル化が確認された。

さらに、架橋剤に含まれる PLA の配置もゲル化に重要であった。我々は PEG、PLA セグメントの配置が異なる NHS-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-NHS を PEG 末端からの DL-lactide の開環重合と NHS 機能化により合成した(図 3-11,12)。高分子濃度 2 wt% 以下において、NHS-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-NHS と CH とのゲル化が観察されなかったことから、両者の反応性は非常に低いことが示唆される(図 3-9c)。この結果は、機能性官能基の近傍に親水性セグメントを配置する我々の戦略が、PLA を高分子鎖に含むインジェクタブル架橋剤の設計に有望であることを強く裏付ける。以後の実験においては、アミノ基の物質質量に対し 10 倍過剰な NHS 物質質量となるよう、CH 濃度と架橋剤濃度を 2 wt%、1 wt% とそれぞれ固定した。

CH と NHS-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-NHS の最終濃度がそれぞれ 2 wt%、1 wt% となるよう作成した CH/PEG-PLA-PEG は、生理条件下において無色透明なゲルの形成が確認された(図 3-13a)。次に、CH/PEG-PLA-PEG のインジェクタブル特性を観察するため、動的粘弾性装置を用いたゲル化速度を評価した。CH と NHS-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-NHS の混合直後における貯蔵弾性率( $G'$ )は、損失弾性率( $G''$ )よりも低い値を示したためゾル状態であると考えられ、対して 450 秒経過した後は、 $G'$  は  $G''$  よりも大きくなったことから、ゲル状態であると考えられる(図 3-13b)。この結果は、CH の

アミノ基と、架橋剤の NHS 基の縮合反応に基づく化学架橋形成を示唆し、さらにインジェクタブルゲルとして駆動することを示唆する。<sup>21-23</sup> 一方、CH/PEG は、CH/PEG-PLA-PEG と比較し僅かに早い、約 200 秒ほどでのゲル形成が確認された(図 3-13c)。CH/PEG-PLA-PEG でゲル形成が遅れるのは、PEG-PLA-PEG のミセル形成が関連しているためと考えられる。

より詳細にゲル形成を確認するため、どれほどのゲル前駆体がゲル形成に寄与しているか、ゲル形成後における重量と理論重量により算出されるゲル化率から推定した。ゲルを作成した後、PBS と超純水で繰り返し洗浄し乾燥した後に得られる乾燥重量から、算出したゲル化量は双方のサンプルにおいて約 80% 程度であり、ほぼ同等に CH のアミノ基と反応していることが示唆された(図 3-13d)。実際、TNBS assay を用いゲル化前後におけるアミノ基の消費を観察すると、双方の架橋剤を用いたゲルの吸光度はほぼ同等であることから、双方のゲルにおける架橋数は同じであることが実証された(図 3-14)。一方、CH/PEG のヤング率は、CH/PEG-PLA-PEG と比較し高かった(図 3-13e)。同様に縮合反応が進行していると仮定すると、本実験で観察されたヤング率の差は、ミセル形成の違いに由来するネットワーク均一性に起因すると考えられる。また、CH/PEG の膨潤度は、CH/PEG-PLA-PEG と比較し低かったが(図 3-13f)、これもミセル形成に由来すると考えられる。

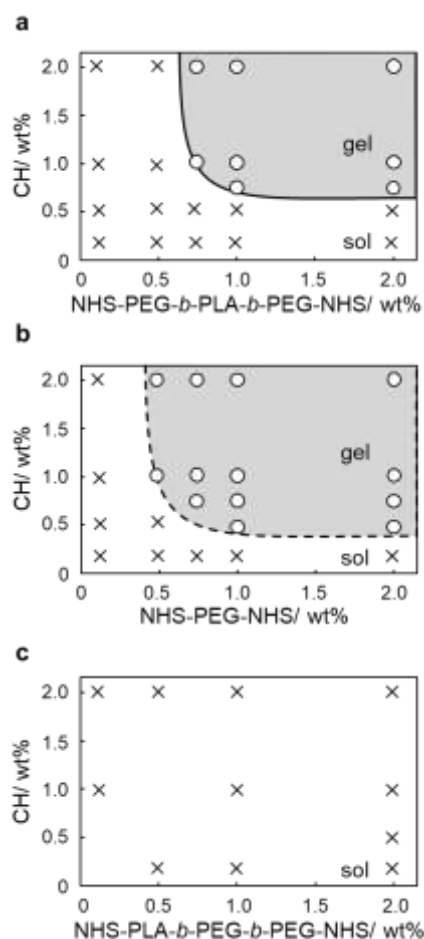


図 3-9. CH と各架橋剤とのゲル化相図. (a) CH と NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS (b) CH と NHS-PEG-NHS, (c) CH と NHS-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-NHS との混合濃度におけるゾル化-ゲル化挙動変化. O, X はそれぞれゲル化、ゾル化を示し、灰色領域がゲル化挙動を示す。



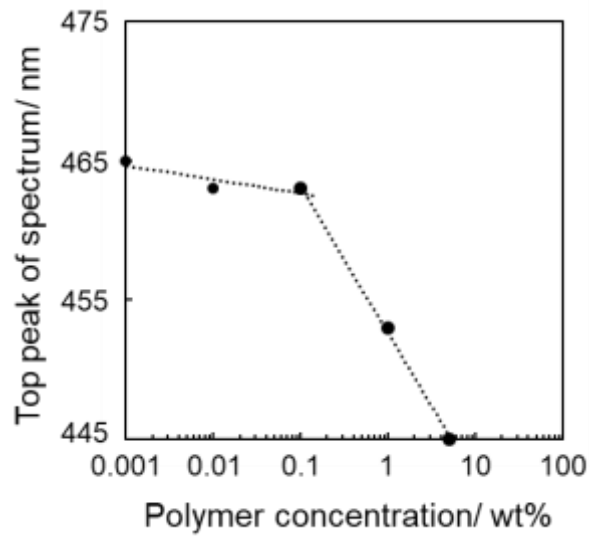


図 3-10. OH-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-OH のピレン可溶化を用いた CMC 測定結果.

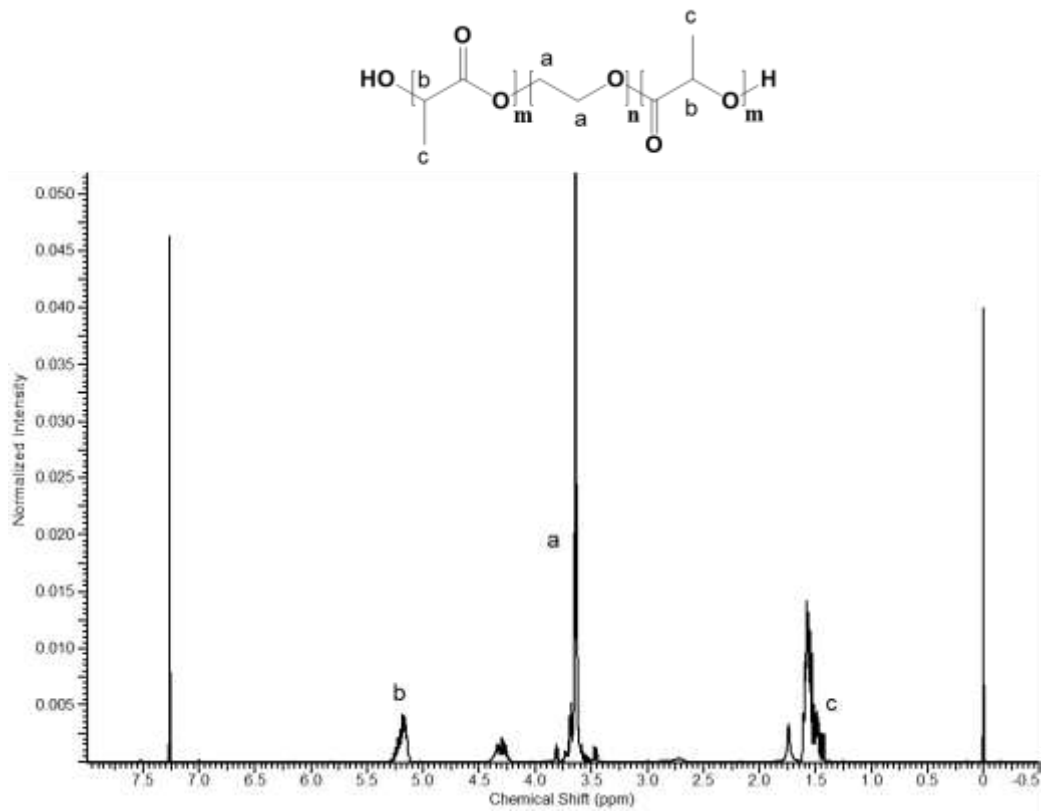


図 3-11. OH-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-OH の <sup>1</sup>H NMR 測定結果.

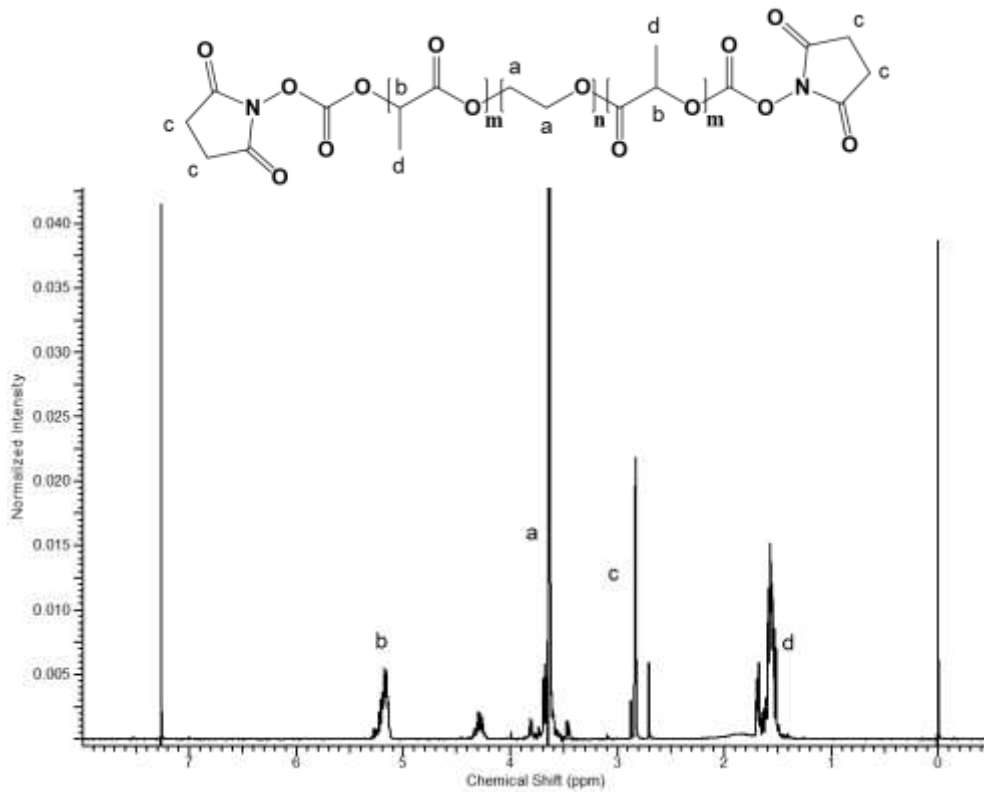


図 3-12. NHS-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-NHS の  $^1\text{H}$  NMR 測定結果.

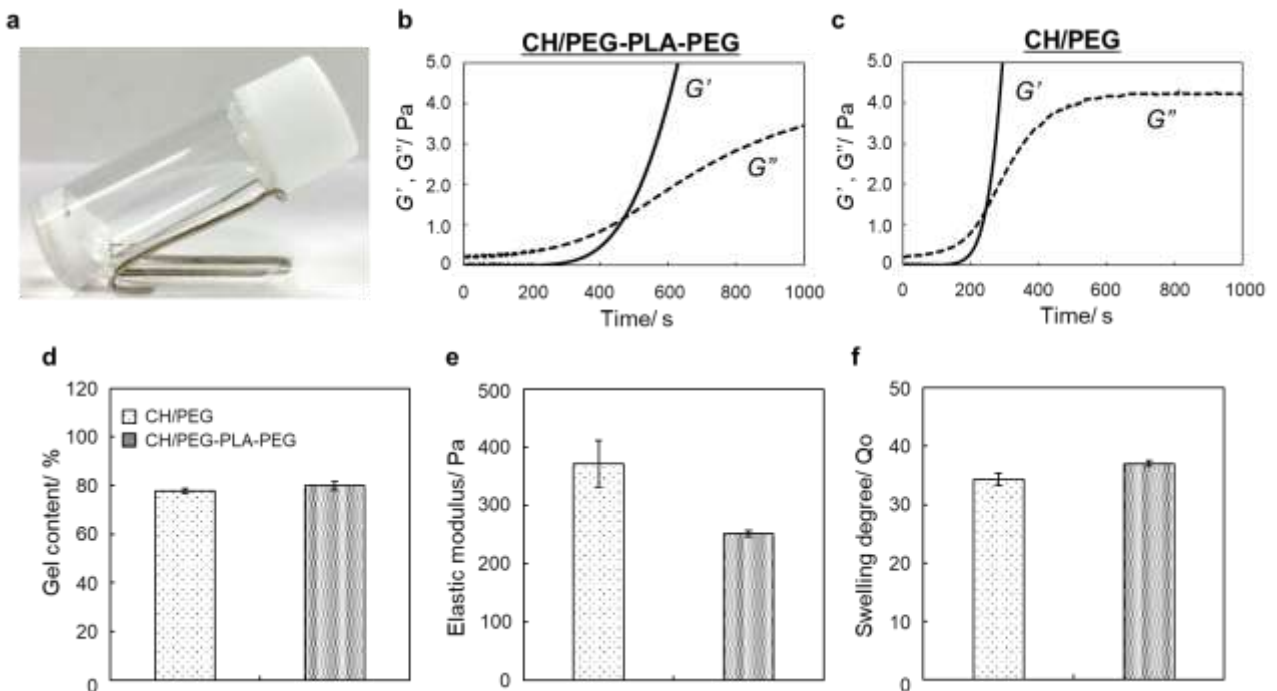


図 3-13. ゲル物性評価. (a) バイアル傾斜法を用いた CH/PEG-PLA-PEG のゲル化確認方法. (b) CH/PEG-PLA-PEG, (c) CH/PEG のゲル化ダイナミクス評価. (d) ゲル化重量比 (e) ヤング率 (f) 膨潤度. ( $n=2$ )

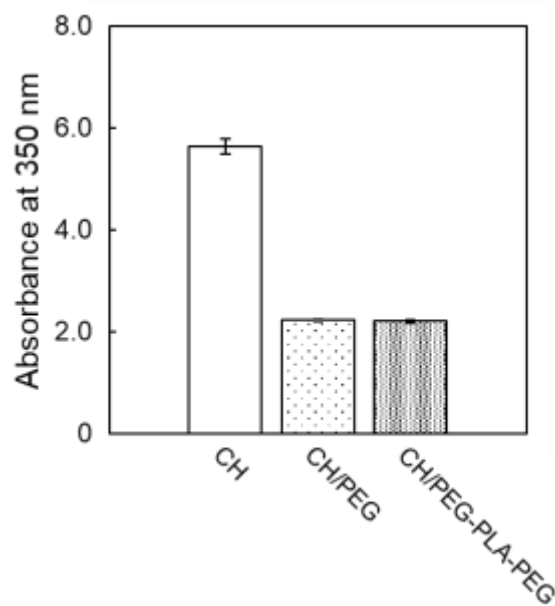


図 3-14. TNBS assay を用いたゲル化前後におけるアミノ基定量結果. CH は 2 wt% の CH 溶液を示す。(n=2)

### 3.3.3 ゲルの分解挙動評価

NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS の分解に基づくゲルの分解挙動を観察するため、CH/PEG と CH/PEG-PLA-PEG の生理条件下における重量損失割合を評価した(図 3-15)。CH/PEG においては、60 日経過後に 20% の重量損失が観察されたが、これは未架橋分のゲル前駆体の流出を示唆し、この結果はゲル化量(約 80%) からも裏付けられる(図 3-13d)。一方で、CH/PEG-PLA-PEG においては、60 日経過後に約 40% の重量損失が観察され、この値は CH/PEG よりも高かった(図 3-15a)。この結果は、NHS-PLA-*b*-PEG-*b*-PLA-NHS 架橋剤を用いた、CH をベースとするゲルへの分解性付与を実証する。さらに、CH/PEG-PLA-PEG のヤング率は、40 日、及び 60 日経過後に 60%、80% 減少し(図 3-15b)、一方で CH/PEG のヤング率はほぼ一定だったことから、CH/PEG-PLA-PEG の分解を強く示唆し、PEG-PLA-PEG のエステル加水分解に基づくネットワークの減少により、ゲル分解が誘発されることを確認した。実際、ゲル分解に伴うゲルの内部構造を SEM により観察すると、CH/PEG-PLA-PEG における空隙の増大が観察された(図 3-16)。従って、ゲルの分解に伴うゲル網目の増大により、包埋するウシ膝軟骨細胞の機能変化、及び産生タンパク質の蓄積向上が予想される。

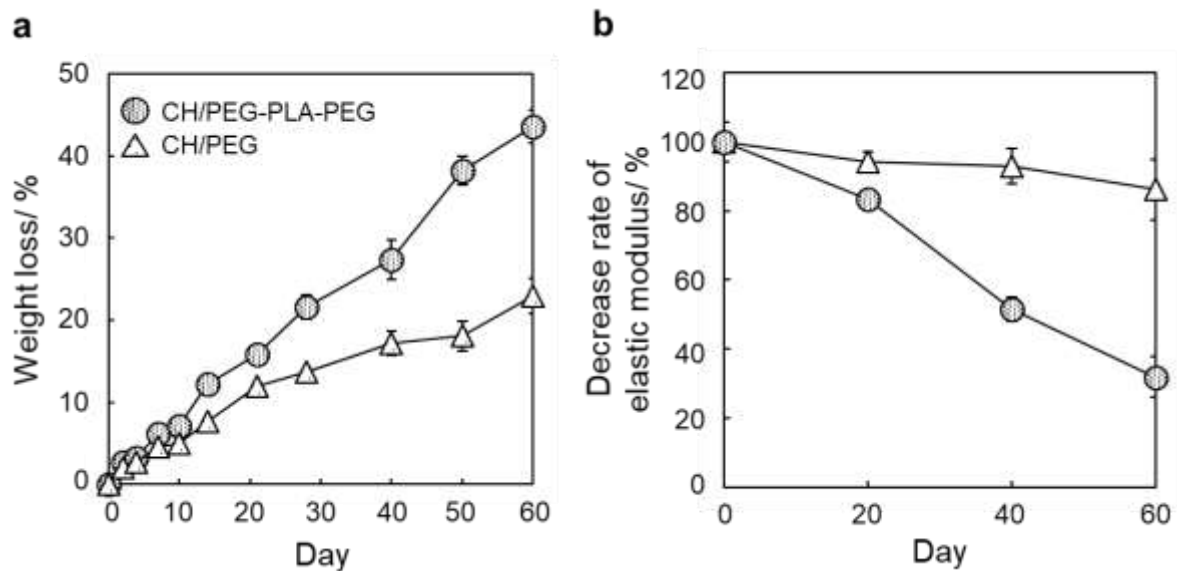


図 3-15. 生理条件下におけるゲル分解挙動評価. (a) 重量損失挙動 (b) 力学挙動変化.

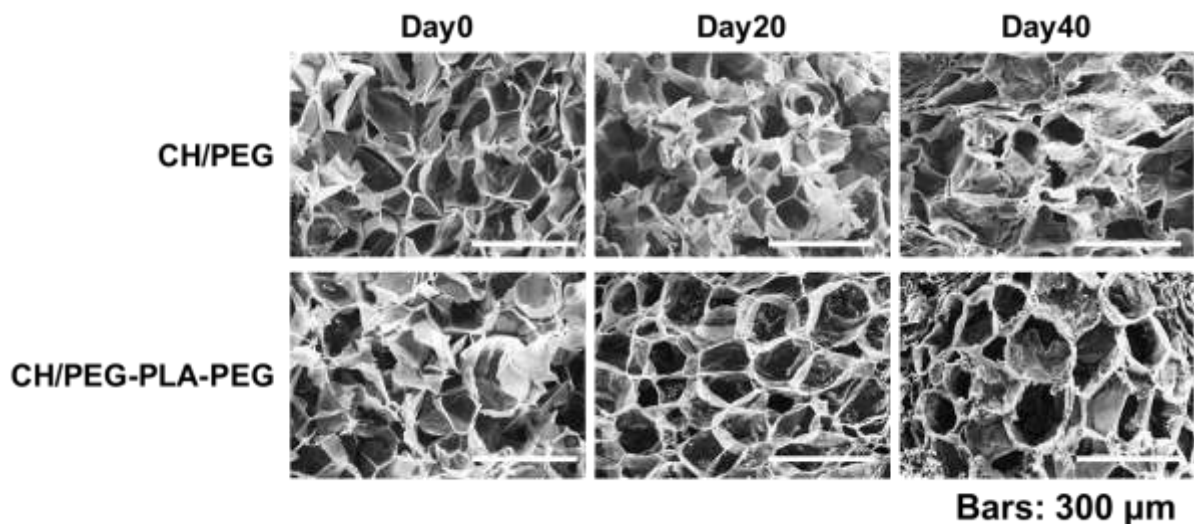


図 3-16. 生理条件下におけるゲルの網目構造変化.

### 3.3.4 ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価

ウシ膝軟骨細胞包埋型ゲルを作成した後、Live/dead assay、及び MTT assay を用いて包埋したウシ膝軟骨細胞の生存率を調査した。Live/dead assay の結果より、ウシ膝軟骨細胞を包埋した CH/PEG、または CH/PEG-PLA-PEG において、死細胞がほとんど観察されず生細胞が多く観察された(図 3-17a)。さらに、MTT assay の結果より、ウシ膝軟骨細胞のゲル包埋前後において吸光度が変化しなかったことから、これらゲルへのウシ膝軟骨細胞包埋プロセスは、細胞毒性を誘発しないことが強く示唆される(図 3-17b)。

ハイドロゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の細胞形態を観察するため、CH/PEG、及び CH/PEG-PLA-PEG 中で培養したウシ膝軟骨細胞を、それぞれ hoechst 33342 と alexa fluor™ 594 phalloidin を用いて細胞核と f-actin を染色することで観察した(図 3-18)。ゲル中に包埋したウシ膝軟骨細胞は、双方のゲルにおいて十分に分散していたことから、選択したゲル化濃度は均一組織形成に適切であることが示唆される。加えて双方の細胞形態は、培養全期間において球状、または楕円形であった。軟骨組織は、その形態に基づき硝子軟骨と繊維軟骨に大別されることが知られている。<sup>24</sup> 硝子軟骨は、球状、及び楕円形の軟骨細胞を含む関節軟骨の主成分である。<sup>25</sup> 一方で繊維軟骨は、典型的な二次元培養皿上に観察される軟骨細胞のように、脱細胞化された繊維状の軟骨細胞を含んでいる。この形態は関節軟骨組織の機械的強度を損なうため避けなければならない。<sup>26</sup> 従って、本ゲル化システムを用いて軟骨細胞をゲル内に包埋すると、硝子軟骨形成のため重要な表現型が保持されることが示唆された。

さらに詳細に、ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞の保持数を、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光観察から算出される蛍光強度により評価した(図 3-19)。CH/PEG-PLA-PEG に包埋したウシ膝軟骨細胞数は、ゲル分解によりウシ膝軟骨細胞が放出されることで、CH/PEG の細胞数よりも減少する傾向が観察された。しかしこれらの値はほぼ同じであり、細胞培養には影響しない。

本ゲル化システムを用いて作成した分解性、非分解性ゲル双方にウシ膝軟骨細胞を包埋すると、硝子軟骨形成に優れた有効性を示すことが示唆された。そこで詳細に細胞機能を調査するため、DMMB assay、および hydroxyproline assay を用いて、ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞のタンパク産生機能を評価した(図 3-20)。一般的に、天然の軟骨組織は軟骨組織形成タンパク質である sGAG 鎖、及び COL 鎖で構成されている。<sup>27</sup> 従って、sGAG と COL 合成量は、関節軟骨形成性の一つの指標であり、包埋細胞からのタンパク産生を向上させることは、足場設計において重要な意味を成す。図 3-20 に、CH/PEG、及び CH/PEG-PLA-PEG に包埋したウシ膝軟骨細胞から産生された sGAG、及び COL 産生量を示す。分解性 CH/PEG-PLA-PEG から産生される sGAG 量は、非分解性 CH/PEG よりも高く、同様に COL 産生も向上した。これらの結果は、CH を主骨格とするゲルに分解性を付与することにより、ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の軟骨組織形成能力向上を示唆する。ゲル内に包埋した細胞からのタンパク質合成は、硬さ、気孔率、細孔形など、空間的な構造特性に影響することが広く知られている。<sup>28</sup> 本研究において開発したゲルは分解性を示すため、ネットワーク構造が徐々に変化し、ECM 合成に影響を与える。<sup>20,28,29</sup> 従ってゲル分解は、図 3-16 に示したようにネットワーク密度の経時的な減少に寄与し、結果として ECM 産生増加、及びそれらを蓄積するための空間を広げると推察される。つまり、NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS 架橋剤を用いたゲルの分解が加速することにより、CH を主骨格とするゲルに包埋した細胞の ECM 合成が促進されたことが示唆された。

双方のゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞から産生されるタンパク質を直接観察するため、ウシ膝軟骨細胞を 40 日間培養したゲルに対し組織学的評価を行った(図 3-21)。CH/PEG-PLA-PEG、及び CH/PEG における H&E 染色においては、双方のゲルにおいて同様の画像が観察され、ゲル内に細胞が広く分布しており、楕円状、球状の細胞形態が観察された。この結果は、図 3-18 の共焦点レーザー顕微鏡観察結果と一致する。一方、AB を用いた sGAG 染色においては、ゲルに包埋した細胞の周囲に、産生した sGAG が顕著に観察され、CH/PEG-PLA-PEG において多くの sGAG が観察

された。これらの結果は、ゲル分解が進行するとネットワーク密度が徐々に低下するため、産生タンパク質をより多く蓄積可能な空間を提供していることを実証する。

硝子軟骨組織を形成する表現型をより詳細に調査するため、ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の遺伝子発現能力を、RT-PCR を用いることで評価した(図 3-22)。硝子軟骨は、軟骨細胞、プロテオグリカン、II 型コラーゲン、及びその他タンパク質により構成され組織化している。<sup>25</sup> 一方で、脱分化細胞により構成されている繊維軟骨には I 型コラーゲンが豊富に含まれる。<sup>26</sup> 繊維軟骨形成は、関節軟骨の構造と機械的強度を損なうため、プロテオグリカン遺伝子(*ACAN*)、及び II 型コラーゲン遺伝子(*COL2A1*) 発現量を向上させ、一方で I 型コラーゲン(*COL1A1*) 遺伝子発現量を低下させることが、関節軟骨組織再生において重要な指標である。<sup>25</sup> 本実験においては、ウシ由来の膝軟骨細胞を用いている。回収された軟骨細胞は硝子軟骨細胞であるが、一度回収すると細胞の脱分化を誘発し、二次元平面で観察されるような繊維性の軟骨細胞へと分化してしまう。<sup>25</sup> しかし、ハイドロゲルなどの三次元足場材料で軟骨細胞を培養すると、その表現型は硝子軟骨細胞へと再分化誘導し、ハイドロゲルの物性により再分化の度合いが変化する。従って、II 型コラーゲン遺伝子の発現量が多いほど、細胞を培養するゲル中において硝子軟骨組織の再生に優れることを示す。

培養 30 日における *ACAN* の発現量は、CH/PEG-PLA-PEG において CH/PEG と比較し向上したが、培養 40 日においては双方のゲルにおいて同等であった。この結果は、培養 40 日の方が、培養 30 日より sGAG 産生量が、双方のゲルにおいて拮抗する図 3-20 の結果と相関している。一方でコラーゲン遺伝子においては、双方のゲルで顕著な違いが観察された。繊維軟骨遺伝子(*COL1A1*) に関しては、CH/PEG-PLA-PEG において CH/PEG と比較し発現量が低下し、硝子軟骨遺伝子(*COL2A1*) に関しては発現量が向上し、これらの結果は、培養 30 日、及び 40 日において観察された。結果として、繊維軟骨、または硝子軟骨への分化性を示す *COL2A1/COL1A1* は、CH/PEG-PLA-PEG において CH/PEG と比較し顕著に向上した。以上より、ネットワークの分解が軟骨組織形成に大きく寄与していることを実証した。臨床的な観点においては、足場分解は包埋する軟骨細胞の機能を向上させるのみならず、移植された軟骨細胞が軟骨組織の形成に伴い機械的強度を向上させるため、精密に制御し最適化する必要がある。従って、移植された細胞が他の部位に流出するのを防ぐため、ECM 合成よりも早い分解は避けなければならない。<sup>30</sup> 本ゲル化システムにおいて、ゲルの分解性を CH、または分解性架橋剤のゲル化濃度を様々変化させること、または非分解性架橋剤との混合架橋剤を使用することで制御可能である(図 3-23)。従って本システムは、生体内応用に向け適切なゲル化システムとゲル内環境を提供可能である。

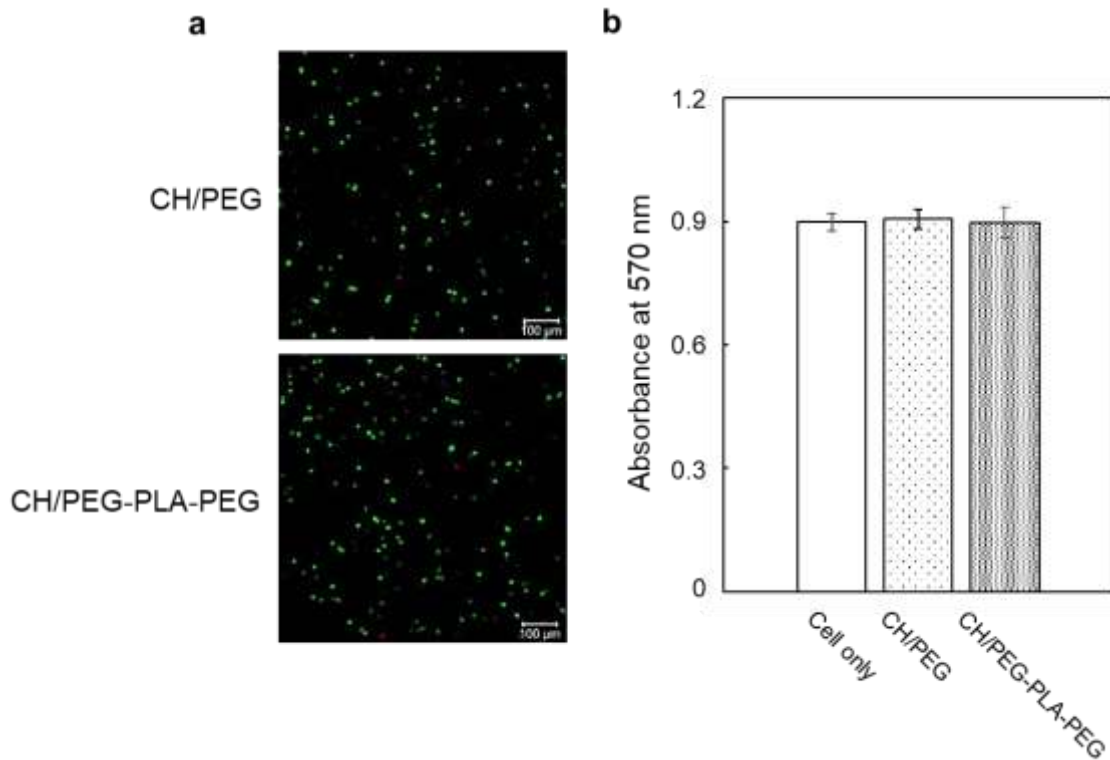


図 3-17. ウシ膝細胞包埋後におけるゲル内細胞生存率評価. (a) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた Live/dead assay. Scale bar: 100 μm. (b) MTT assay を用いた 570 nm における吸光度評価. Cell only は  $5.0 \times 10^5$  cells のウシ膝軟骨細胞に対し吸光度を測定した結果. (n=2)

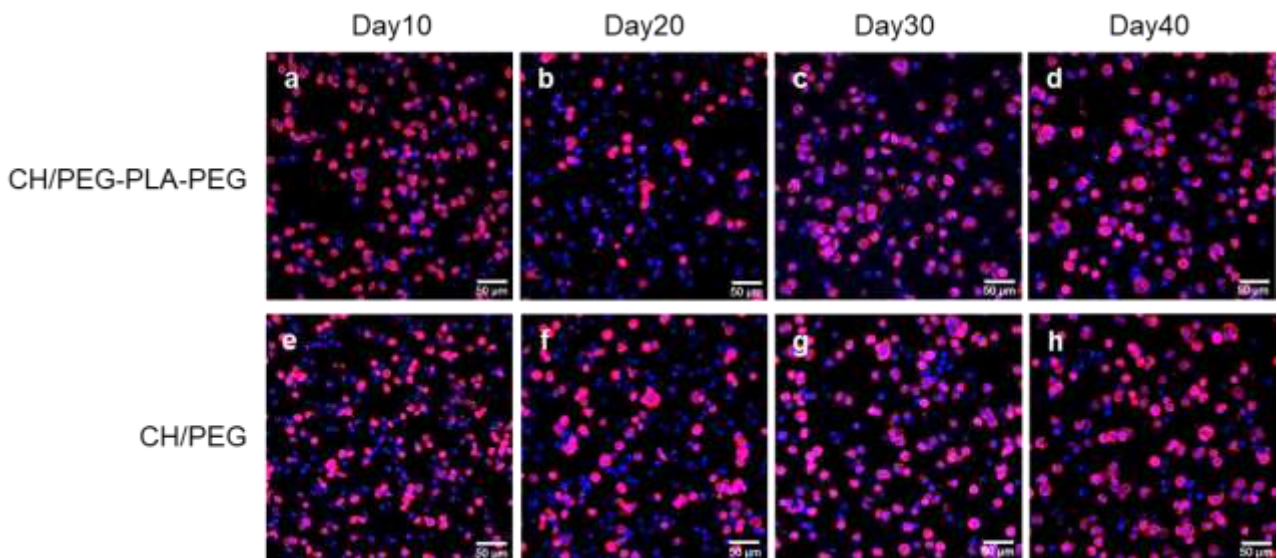


図 3-18. ウシ膝軟骨細胞をゲル内に包埋し培養した後の共焦点レーザー顕微鏡画像. (a,e) 10 日後, (b,f) 20 日後, (c,g) 30 日後, (d,h) 40 日培養後. 核を hoechst33342 (青)/f-actin を alexa fluor™ 594 phalloidin (赤) を用いて染色した. Scale bar: 100 μm.

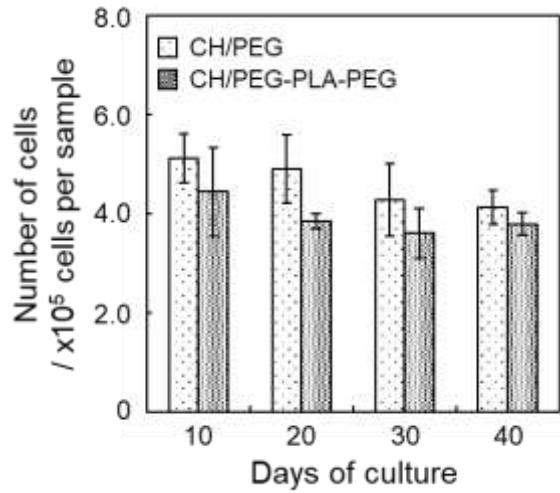


図 3-19. ゲル内培養細胞数. (n=3)

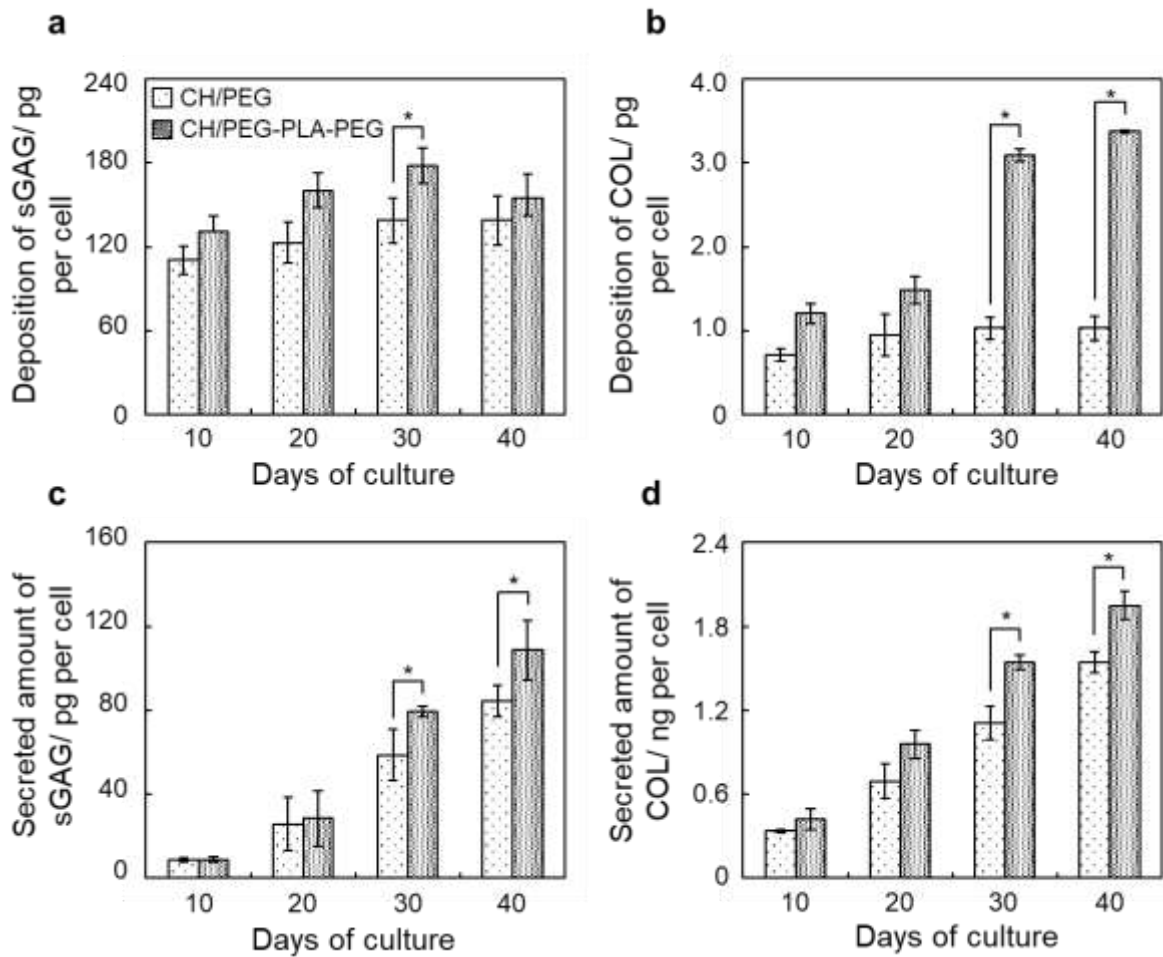


図 3-20. ウシ膝軟骨細胞をゲル内に包埋し培養した後のタンパク質産生量. (a) 蓄積した sGAG 量, (b) 蓄積した COL 量, (c) 放出した sGAG 量, (d) 放出した COL 量. (n=3, \*p < 0.05 (Student's *t*-test))



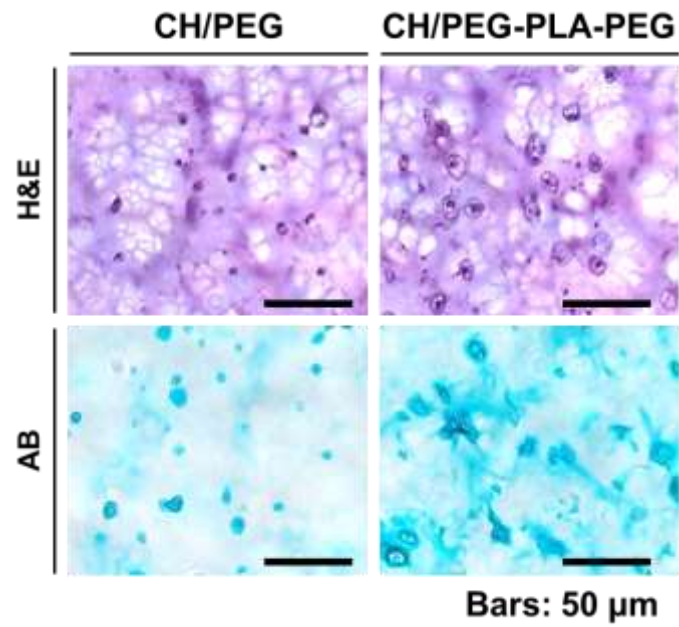


図 3-21. H&E 染色、及び AB 染色を用いた培養 40 日後におけるゲル内ウシ膝軟骨細胞の組織学的評価. Scale bar: 50 μm.

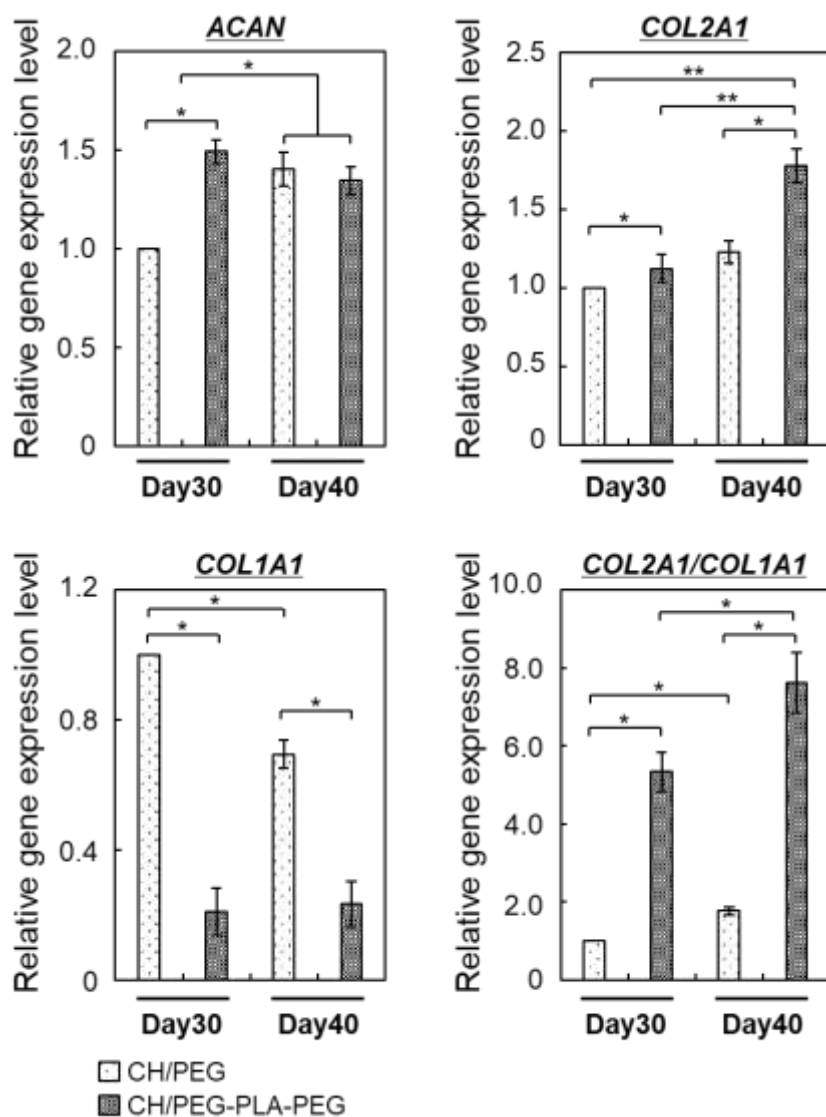


図 3-22. ウシ膝軟骨細胞ゲル内培養後の mRNA 発現量. Aggrecan (*ACAN*) 遺伝子, II 型コラーゲン遺伝子(*COL2A1*), I 型コラーゲン遺伝子(*COL1A1*), *COL2A1/COL1A1* 比をそれぞれ示す。各遺伝子発現量を *GAPDH* にて規格化した後、培養 30 日における CH/PEG の相対強度として、遺伝子発現量を評価した。(n=3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (Student's *t*-test))

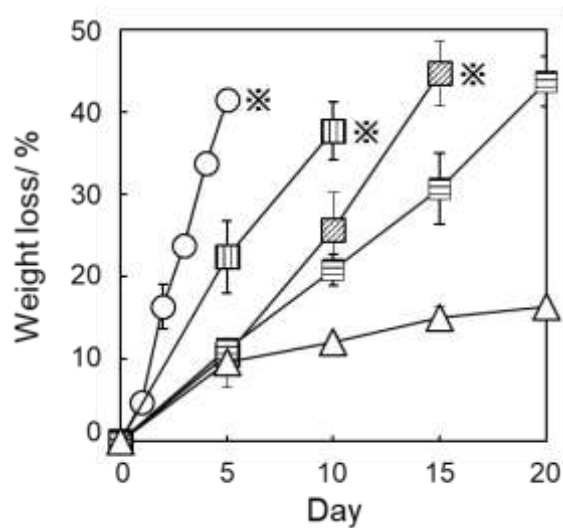


図 3-23. 非分解性架橋剤, 分解性架橋剤の混合架橋剤を使用した際の酸加速分解試験. NHS-PEG-NHS/ NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS=100/0 (○), 75/25 (◻), 50/50 (◻), 25/75 (◻), 0/100(△). (n=3)  
 ※はゲルの完全分解を示す。

## 3.4 結論

本章では、生体内に投与して用いる足場材料を想定した *in-situ* 型の分解性ゲルを作成し、ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価を行った。*In-situ* 型のゲルとして分解性インジェクタブルゲルに着目し、その材料を作成するため、バイオマテリアルとして幅広く応用されている CH を主骨格とし、分解性高分子で架橋することを着想した。その分解性高分子としては PLA を選択し、水中で CH との架橋反応が円滑に進むよう、親水性 PEG と連結しその末端に官能基を配置した NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を設計した。CH と NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS は混合するだけでゲルとなり、そのゲルの力学強度、膨潤度、ゲル化効率などのゲル物性は、非分解性ゲル(CH/PEG) と比較し同程度の値が得られた。また、CH/PEG-PLA-PEG は、生理条件下において約 60 日間かけて徐々に分解されたことから、PLA のエステル加水分解に基づく分解性の付与が達成され、分解性インジェクタブルゲルの構築を確認した。非分解性、分解性の双方のゲルにウシ膝軟骨細胞を包埋し、Live/dead assay を用いた細胞包埋後における細胞の生死判定を行うと、死細胞と比較し生細胞が多く観察されたことから、細胞包埋過程において細胞毒性を与えないことが示唆された。ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の細胞機能を、DMMB assay による sGAG 量、hydroxyproline assay による COL 量の定量より、分解性 CH/PEG-PLA-PEG は、非分解性 CH/PEG ゲルと比較し優れた ECM 産生が観察された。より詳細な細胞機能を評価するため、RT-PCR を用いたウシ膝軟骨細胞の mRNA 発現を評価すると、分解性 CH/PEG-PLA-PEG は、非分解性 CH/PEG と比較し、II 型コラーゲン遺伝子(*COL2A1*) の発現量が向上し、さらに I 型コラーゲン遺伝子(*COL1A1*) の発現量が低下したことから、硝子軟骨への優先的な分化を達成した。以上の結果より、作成した分解性 CH/PEG-PLA-PEG は、関節軟骨の主成分である硝子軟骨への分化を、CH を主骨格とするゲルに対し分解性架橋剤を適用することで達成し、ゲルの網目分解により空隙が拡大することで ECM 蓄積を増大させることが示唆された。このように本章では、分解性ゲル作成のためこれまで行われてきた外部刺激応答や毒性の懸念を伴うラジカル種の発生なく、新規分解性架橋剤(NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS) を用いた足場材料作成を行い、足場材の機能向上を達成した。

## 参考文献

1. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 83-99.
2. Pellá, M. C. G.; Lima-Tenório, M. K.; Tenório-Neto, E. T.; Guilherme, M. R.; Muniz, E. C.; Rubira, A. F. Chitosan-based Hydrogels: From Preparation to Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *196*, 233-245.
3. Xu, Y.; Li, Y.; Chen, Q.; Fu, L.; Tao, L.; Wei, Y. Injectable and Self-Healing Chitosan Hydrogel Based on Imine Bonds: Design and Therapeutic Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2198.
4. Narayanan, G.; Vernekar, V. N.; Kuyinu, E. L.; Laurencin, C. T. Poly (lactic acid)-based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 247-276.
5. Pan, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) Porous Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Interface Focus.* **2012**, *2*, 366-377.
6. Basu, A.; Kunduru, K. R.; Doppalapudi, S.; Domb, A. J.; Khan, W. Poly(lactic acid) based Hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 192-205.
7. Peng, S.; Liu, H. X.; Ko, C. Y.; Yang, S. R.; Hung, W. L.; Chu, I. M. A Hydrolytically-tunable Photocrosslinked PLA-PEG-PLA/PCLPEG-PCL Dual-component Hydrogel that Enhances Matrix Deposition of Encapsulated Chondrocytes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *11*, 669-678.
8. Li, F.; Li, S.; Ghzaoui, A. E.; Nouailhas, H.; Zhuo, R. Synthesis and Gelation Properties of PEG-PLA-PEG Triblock Copolymers Obtained by Coupling Monohydroxylated PEG-PLA with Adipoyl Chloride. *Langmuir* **2007**, *23*, 2778-2783.
9. Nagasaki, Y.; Iijima, M.; Kato, M.; Kataoka, K. Primary amino-terminal heterobifunctional poly(ethylene oxide). Facile Synthesis of Poly(ethylene oxide) with a Primary Amino Group at One End and a Hydroxyl Group at the Other End. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 702-704.
10. Shen, H.; Lin, H.; Sun, A. X. Song, S.; Zhang, Z.; Dai, J. Tuan, R. S. Chondroinductive Factor-free Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Graphene Oxide-incorporated Hydrogels. *J. Mater. Chem. B*, **2018**, *6*, 908-917.
11. Jacob, R. S.; Ghosh, D.; Singh, P. K.; Basu, S. K.; Jha, N. N.; Das, S.; Sukul, P. K.; Patil, S.; Sathaye, S.; Kumar, A.; Chowdhury, A.; Malik, S.; Sen, S.; Maji, S. S.; Self healing Hydrogels Composed of Amyloid Nanofibrils for Cell Culture and Stem Cell Differentiation. *Biomaterials* **2015**, *54*, 97-105.
12. Saito, M.; Kiyokawa, N.; Taguchi, T.; Suzuki, K.; Sekino, T.; Mimori, K.; Suzuki, T.; Nakajima, H.; Katagiri, Y. U.; Fujimura, J.; Fujita, H.; Ishimoto, K.; Yamashiro, Y.; Fujimoto, J. Granulocyte Colony-stimulating Factor Directly Affects Human Monocytes and Modulates Cytokine Secretion. *J. Exp. Hematol.* **2002**, *30*, 1115-1123.
13. Aisagbonhi, O.; Rai, M.; Ryzhov, S.; Atria, N.; Feoktistov, I.; Hatzopoulos, A. K. Experimental Myocardial Infarction Triggers Canonical Wnt Signaling and Endothelial-to-mesenchymal Transition. *Dis. Model. Mech.* **2011**, *4*, 469-483.

14. Ohno, T.; Tanisaka, K.; Hiraoka, Y.; Ushida, T.; Tamaki, T.; Tateishi, T. Effect of Type I and Type II Collagen Sponges as 3D Scaffolds for Hyaline Cartilage-like Tissue Regeneration on Phenotypic Control of Seeded Chondrocytes *in vitro*. *Mater. Sci. Eng. C* **2004**, *24*, 407–411.
15. Maeda, K.; Fujihara, M.; Harasawa, R. Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Infection Activates the Unfolded Protein Response in MDBK Cells, Leading to Apoptosis. *J. Vet. Med. Sci.* **2009**, *71*, 801–805.
16. Li, F.; Li, S.; Ghzaoui, A. E.; Nouailhas, H.; Zhuo, R. Synthesis and Gelation Properties of PEG-PLA-PEG Triblock Copolymers Obtained by Coupling Monohydroxylated PEG-PLA with Adipoyl Chloride. *Langmuir* **2007**, *23*, 2778-2783.
17. Cho, H.; Kwon, E.; Yasui, Y.; Kobayashi S.; Yoshida, S.; Nishimura Y.; Yamaguchi, M. Ring Cleavage of Dihydropyrimidine Skeleton. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 7185–7188.
18. Du, Y. J.; Lemstra, P. J.; Nijenhuis, A. J.; Aert, H. A. M.; Bastiaansen, C. ABA Type Copolymers of Lactide with Poly(ethylene glycol). Kinetic, Mechanistic, and Model Studies. *Macromolecules* **1995**, *28*, 2124–2132.
19. Lee, W. C.; Li, Y. C.; Chu, I. M. Amphiphilic Poly(D,L-lactic acid)/Poly(ethylene glycol)/Poly(D,L-lactic acid) Nanogels for Controlled Release of Hydrophobic Drugs. *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 846-854.
20. Kong, H. J.; Smith, M. K.; Mooney, D. J. Designing Alginate Hydrogels to Maintain Viability of Immobilized Cells. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4023-4029.
21. Dong, R.; Zhao, X.; Guo, B.; Ma, P. X. Self-Healing Conductive Injectable Hydrogels with Antibacterial Activity as Cell Delivery Carrier for Cardiac Cell Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 17138-17150.
22. Yan, S.; Wang, T.; Feng, L.; Zhu, J.; Zhang, K.; Chen, X.; Cui, L.; Yin, J. Injectable *in situ* Self-cross-linking Hydrogels based on Poly(L-glutamic acid) and Alginate for Cartilage Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4495-4508.
23. Broguiere, N.; Cavalli, E.; Salzmann, G. M.; Applegate, L. A.; Wong, M. Z. Factor XIII Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 2176-2184.
24. Richardson, S. M.; Kalamegam, G.; Pushparaj, P. N.; Matta, C.; Memic, A.; Khademhosseini, A.; Mobasher, R.; Poletti, F. L.; Hoyland, J. A.; Mobasher, A. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine: Focus on Articular Cartilage and Intervertebral Disc Regeneration. *Methods* **2016**, *99*, 69-80.
25. Armiento, A. R.; Alini, M.; Stoddart, M. J. Articular Fibrocartilage - Why does Hyaline Cartilage Fail to Repair? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *146*, 289-305.
26. Shepherd, D. E.; Seedhom, B. B. The ‘instantaneous’ Compressive Modulus of Human Articular Cartilage in Joints of the Lower Limb. *Rheumatology* **1999**, *38*, 124–132.
27. Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Chichester, C. O.; Pittenger, M. F. Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells from Marrow. *Tissue Eng.* **1998**, *4*, 415-428.
28. Nicodemus, G. D.; Bryant, S. J. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2008**, *14*, 149-165.
29. Zustiak, S. P.; Leach, J. B. Hydrolytically Degradable Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Scaffolds with Tunable Degradation and Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 1348-1357.

## 第 4 章

# インジェクタブル IPN ゲルの作成と 軟骨細胞機能評価

## 4.1 緒言

本章では、ゲルネットワークの複合により再現可能な生体内 ECM 構造を、インジェクタブルシステムを介し作成することで包埋するウシ膝軟骨細胞の機能を高める *in-situ* ゲルの設計を試みた。

生体内環境を再現したネットワーク構造は、細胞のタンパク質産生量や遺伝子発現量を向上させることが知られている。<sup>14</sup> 従って、第 3 章にて扱った CH を主骨格とするゲルネットワークに対し、新たなネットワーク成分を追加することで生体内のネットワーク構造を再現することができれば、より優れた足場材料となることが期待される。本章においては、ネットワーク同士の相互侵入によりネットワーク独自の特性を発揮可能かつ、形成するネットワークの構造が生体内の ECM 構造を再現可能な相互侵入高分子(Interpenetrating polymer network: IPN) に着目し、生体内に直接投与可能なインジェクタブル IPN ゲルの設計を行った。

IPN ゲル設計のため主に用いられる手法としては、一つのネットワークを形成させた後、照射によりもう一方のネットワークを形成させる多段階合成手法が挙げられる。<sup>5-7</sup> しかし本手法は、ラジカルの発生や熱を伴うことから周辺組織や包埋する細胞への毒性が懸念されている。この IPN 構造を、ゲル化成分を混合するだけで作成できれば、低侵襲性治療実現のため、より優れたインジェクタブル IPN ゲルとなることが期待される。そこで本章においては、CH を主骨格とするネットワークと自己組織化ペプチドネットワークとの *one-pot* な IPN 形成を着想した。代表的な自己組織化ペプチドである RADA16 は、生理条件下において  $\beta$ -sheet 構造の形成に伴い自己組織化する。<sup>8-10</sup> 形成するネットワークは微細構造であり細胞のタンパク質産生や遺伝子発現を向上させるため、<sup>11,12</sup> 本材料を IPN 成分として組み込めば、より生体内環境を再現した IPN 構造の構築が期待できる。従って、CH、NHS-PEG-NHS、RADA16 を同時に混合することによって、RADA16 の物理架橋ネットワークと、CH と NHS-PEG-NHS の化学架橋ネットワークの形成が独立に阻害することなく行われれば、第 3 章で用いた単一の CH 化学架橋ゲルと比べて、生体環境をより模倣した *in-situ* 型の IPN ゲルを構築することができると予想した。ゲル化メカニズムと  $\beta$ -sheet 構造の形成性を評価することで IPN 化を評価し、さらに、ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能を、第 3 章と同様に、所定時間培養後のタンパク質産生量、遺伝子発現量を評価することで調査した。

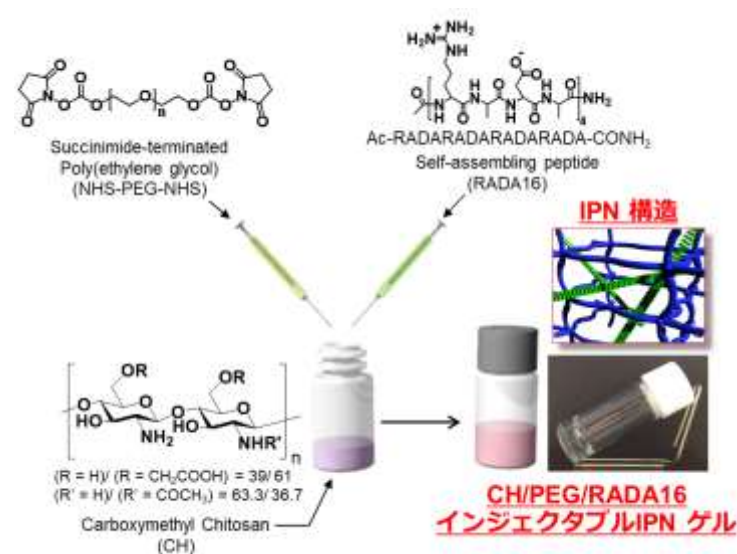


図 4-1. 第 4 章における研究概要図.



## 4.2 実験

### 4.2.1 試薬、溶媒

第4章で用いる試薬、及び溶媒は表4-1の通りである。これらの試薬、溶媒に関しては、全て市販品であり、それ以上の精製をすることなく使用した。

表 4-1. 試薬、溶媒

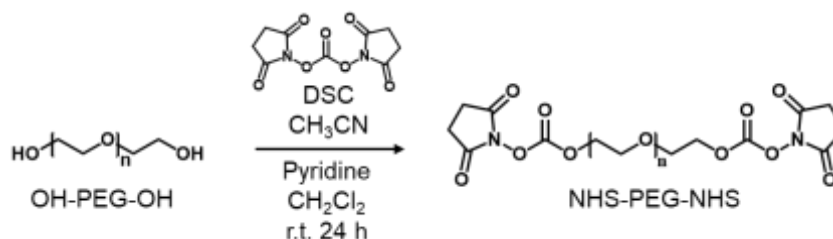
試薬名	購入先
Acetonitrile (CH <sub>3</sub> CN)	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
3% atelocollagen	KOKEN Co. Ltd. (Tokyo, Japan)
Benzene	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Carboxymethyl chitosan (CH)* <sup>1</sup>	Koyo Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Chloroform	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Dichloromethane	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Diethyl ether (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
<i>N,N'</i> -disuccinimidyl carbonate (DSC)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Fetal bovine serum (FBS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Penicillin-streptomycin (PS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Pyridine	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)
Poly(ethylene glycol) (PEG)* <sup>2</sup>	Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)
RADA16 (PuraMatrix™)* <sup>3</sup>	3-D Matrix Inc. (Cambridge, MA, USA)
Toluene	FUJIFILM Wako Pure Chem. Corp. (Osaka, Japan)

※1  $M_w=100000$ ,  $M_n=47000$ ,  $M_w/M_n=2.1$ , Deacetylation degree, 63.3%; Degree of substitution, 61%

※2  $M_n=2,070$

※3 Ac-RADARADARADARADA-CONH<sub>2</sub>. RADA16 は、(株) スリー・ディー・マトリックスの松田章博士より提供されたものである。

### 4.2.2 NHS-PEG-NHS の合成



スキーム 4-1. NHS-PEG-NHS 合成スキーム.

窒素雰囲気下、PEG (2.0 g, 1.00 mmol) を dichlorometane 50 mL に溶解させ、室温で 10 分間攪拌した。別途、CH<sub>3</sub>CN 20 mL に DSC (1.28 g, 5.0 mmol) を 50 °C で 30 分間溶解させた。DSC 溶液と PEG 溶液を混合した後、pyridine 200  $\mu$ L 添加し、室温で 24 時間攪拌した。反応後、混合溶液を濾過し、減圧下で濃縮した後、サンプルを chloroform 10 mL に溶解させ、diethyl ether 300 mL に滴下することでサンプルを沈殿させた。この操作を 3 回繰り返した後、沈殿物を benzene 5 mL に溶解させ、凍結乾燥後、NHS-PEG-NHS を白色粉末として得た(収量：1.8 g、収率：90%)。得られた高分子を CDCl<sub>3</sub> を溶媒とした <sup>1</sup>H NMR 測定により評価した(NHS 置換度：99%)。

### 4.2.3 RADA16 のゲル化評価

RADA16 のゲル化特性を調査するため、HAAKE MARS Rotational Rheometer (Thermo Scientific, Germany) を用いて動的周波数測定を行った。225  $\mu$ L の超純水または PBS (200 mM、pH 7.4) を測定装置の底板に置き、75  $\mu$ L の 1.0 wt% RADA16 水溶液と混合した。室温で 60 分静置した後、サンプルの厚さが 0.2 mm になるまで 25 mm の平行平板を底板に接近させ、0.1-100 Hz の振動周波数、1% ひずみを掛け周波数掃引測定を行った。

### 4.2.4 CH/PEG のゲル化評価

CH と NHS-PEG-NHS とのゲル化を、バイアル傾斜試験によって評価した。様々な濃度の PBS で CH、及び NHS-PEG-NHS を別々に調製し、CH 溶液に対し PEG 溶液を加えることで、ゲル形成に必要な両者の添加濃度を調査した。300  $\mu$ L の 2.0/1.0 wt% CH/PEG の調製を一例に挙げて説明する。100  $\mu$ L の 6 wt% CH 溶液を PBS を用いて調製し、150  $\mu$ L の PBS を添加した。一方、50  $\mu$ L の 6 wt% NHS-PEG-NHS 溶液を PBS を用いて別の容器に調製しておき、直後に CH 溶液に添加し激しく攪拌した。室温で 30 分静置した後、バイアルを傾斜させ流動性を確認することで混合サンプルのゲル化を目視で確認した。

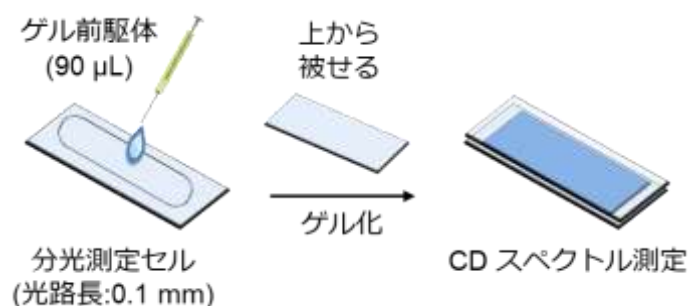
### 4.2.5 ゲル化ダイナミクス解析

RADA16、CH/PEG、及び CH/PEG/RADA16 のゲル化ダイナミクスを解析するため、各溶液を混合した直後からの貯蔵弾性率( $G'$ ) と損失弾性率( $G''$ ) の経時的変化を動的粘弾性装置(HAAKE MARS Rotational Rheometer) により評価した(ひずみ：1%、周波数：1 Hz)。0.25 wt% RADA16 を作成する場合、225  $\mu$ L の PBS (200 mM、pH 7.4) を装置の底板に置き、75  $\mu$ L の 1.0 wt% RADA16 水溶液を混合し(最終濃度：0.25 wt%)、直後にサンプルの厚さが 0.2 mm になるまで直径 25 mm の平板を接近させ測定を開始した。2.0/1.0 wt% CH/PEG を作成する場合、100  $\mu$ L の 6 wt% CH 溶液と 200  $\mu$ L の PBS を装置の底板に置き、50  $\mu$ L の 6 wt% NHS-PEG-NHS 溶液を混合し測定を開始した。2.0/1.0/0.25 wt% CH/PEG/RADA16 を作成する場合、100  $\mu$ L の 6 wt% CH 溶液と 100  $\mu$ L の PBS を装置の底板に置き、50  $\mu$ L の 6 wt% NHS-PEG-NHS 溶液と 50  $\mu$ L の 1.0 wt% RADA16 水溶液を添加し測定を開始した。これら全ての測定は、平面型プレートを用い、20 °C で行った。

## 4.2.6 $\beta$ -sheet 構造のゲル内形成評価

ゲル中における RADA16 の  $\beta$ -sheet 構造の形成を調査するため、分光偏光計(JASCO J-725, JASCO Corp., Tokyo, Japan) を用いてゲルの CD スペクトルを測定した。90  $\mu$ L のゲル前駆体を 1.5 mL サンプルチューブ内に作成し、直後に分光測定セル(Path length:0.1 mm, Starna Scientific Ltd., Hainault, United Kingdom) に移した。室温で 30 分間静置しゲル化させた後、CD スペクトルを測定した。また、細胞包埋ゲルの CD スペクトル測定には、ウシ膝軟骨細胞を 30  $\mu$ L の 6 wt% CH 溶液に懸濁させ、15  $\mu$ L の 6 wt% NHS-PEG-NHS 溶液、22.5  $\mu$ L の 1.0 wt% RADA16 水溶液、さらに 22.5  $\mu$ L の PBS を混合した直後に分光測定セルに移しゲル化させた後、同様に CD スペクトルを測定することで、細胞包埋ゲルの CD スペクトルを測定した。細胞を包埋した CH/PEG に関しても同様にゲルを作成した後 CD スペクトルを測定し、CH/PEG/RADA16 と CH/PEG のスペクトルを差し引くことで、細胞を包埋した CH/PEG/RADA16 中における  $\beta$ -sheet 構造の形成を評価した。この際、ウシ膝軟骨細胞密度は全てのゲルサンプルにおいて  $1.0 \times 10^7$  cells/mL に揃え実験を行った。

さらに詳細に、thioflavin T (ThT, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた蛍光測定を行うことで、ゲル内の  $\beta$ -sheet 構造の形成を調査した。具体的に、100  $\mu$ L のゲルを 96-well plate に作成し、100  $\mu$ L の 200  $\mu$ M ThT 溶液に室温で 2 時間浸漬させることでゲル内の  $\beta$ -sheet を染色した。PBS を用いて 3 回洗浄した後、microplate reader を用いて蛍光強度( $\lambda_{ex} = 430$  nm,  $\lambda_{em} = 474$  nm) を測定した。



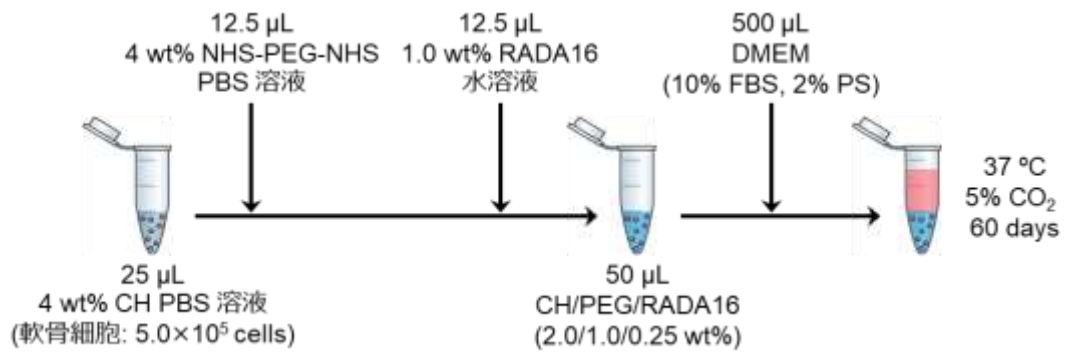
スキーム 4-2. CD スペクトル測定概要図.

## 4.2.7 IPN ゲルのその他物性評価

IPN ゲルのその他物性評価に関しては、前 3 章のゲル物性解析(3.2.5-3.2.8)と同様に評価した。

## 4.2.8 ウシ膝軟骨細胞包埋型 IPN ゲルの作成

ウシ膝軟骨細胞( $5.0 \times 10^5$  cells) を 25  $\mu$ L の 4 wt% CH 溶液に懸濁させ、12.5  $\mu$ L の 4 wt% PEG 溶液と 12.5  $\mu$ L の 1.0 wt% RADA16 水溶液を混合することで作成した。培地中に放出されたタンパク質量を定量するため、2, 3 日毎に培地全量を回収し、新たな DMEM を 500  $\mu$ L 添加した。



スキーム 4-3. ウシ膝軟骨細胞のゲル内包埋概要図.

#### 4.2.9 ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価

ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価においては、前3章(3.2.10-3.2.17)と同様に評価した。

## 4.3 結果と考察

### 4.3.1 IPN ゲル形成評価

本研究において、CH を主骨格とするゲルとして、水溶性の CH と両末端をスクシンイミド基で機能化した高分子架橋剤(NHS-PEG-NHS) を混合することで CH のアミノ基と架橋剤の NHS 基との縮合反応に基づきネットワークを形成させる。その架橋剤をスキーム 4-1 に示すように、PEG 両末端に対し DSC を反応させることで NHS-PEG-NHS を合成した(図 4-2)。合成した化合物の <sup>1</sup>H NMR スペクトル測定により、PEG に基づくプロトンピーク強度を基準とした NHS 基のプロトンピーク強度より、PEG の両末端を NHS 基で修飾した NHS-PEG-NHS の合成を確認した。

RADA16 と CH/PEG の双方のネットワークから構成される IPN を構築するには、各々のネットワーク形成を阻害または影響を与えず形成される必要がある。RADA16 のネットワーク形成に関しては、pH、またはイオン強度の変化に応答することで  $\beta$ -sheet 構造を形成し、結果として物理架橋ネットワークを形成する。<sup>8-10</sup> 図 4-3 より、1.0 wt% の RADA16 水溶液に対し PBS を添加し PBS 濃度 150 mM、pH 7.4 となるよう作成した 0.25 wt% の RADA16 に関して、貯蔵弾性率( $G'$ ) は損失弾性率( $G''$ ) よりも測定周波数領域において高かった一方、超純水中で作成した 0.25 wt% の RADA16 に関しては、 $G'$  は  $G''$  よりも常に低かった。従って、RADA16 は PBS 添加に応答し物理架橋ネットワークを形成する事が示唆された。一方、CH/PEG に関しては、CH、及び NHS-PEG-NHS を混合し 20 分静置後におけるバイアル傾斜試験より、CH で 0.5 wt% 以上、NHS-PEG-NHS で 0.25 wt% 以上の濃度でゾルからゲルへの転移が観察され、超純水中においても同様の挙動が観察された。また、前章の図 3-14 における TNBS assay により、CH と NHS-PEG-NHS との混合により、CH と比較しアミノ基量が減少することを確認していることから、CH/PEG はアミド結合の形成を介し化学架橋ネットワークを形成することが示唆されている。これらの結果は、双方の混合系において互いのゲル化駆動力が異なるため、それぞれ独立してネットワークが形成されることを示唆する。さらに、CH と RADA16、NHS-PEG-NHS と RADA16 を混合した際のバイアル傾斜試験、及び周波数依存測定においても、明確なゲル化が観察されなかった事から、双方のネットワークは互いに独立に形成されることが強く示唆された(図 4-4)。

双方のネットワークで構成されるゲルが IPN 構造を有している場合、RADA16 と CH/PEG ネットワークの形成は互いのネットワーク形成を阻害することなく進行するはずである。そこで、RADA16、CH と PEG、及び CH、PEG、RADA16 の混合溶液のゲル化速度を比較することでこれら 3 つの成分から成る IPN 形成を評価した。RADA16 を 150 mM PBS と混合した場合、溶液の混合直後から  $G'$  は  $G''$  よりも常に高かった事から、RADA16 の迅速なネットワーク形成を確認した。一方、CH と NHS-PEG-NHS を混合した溶液に関しては、双方の溶液を混合した直後における  $G'$  は  $G''$  よりも低く、混合 220 秒程度で  $G'$  は急激に上昇し  $G''$  よりも大きくなったことから、所定時間経過後のゲル化が観察された(図 4-5)。さらに、3 成分混合系においては、混合直後も  $G'$  は  $G''$  よりも高く、所定時間経過後に  $G'$  は多段階的に変化しその変曲点は、CH/PEG のゲル化点と一致していたことから、3 成分混合液においては RADA16 ネットワークが溶液混合直後に形成され、遅れて CH/PEG ネットワークが形成されることを確認した。

CH/PEG/RADA16 のネットワーク形成をより詳細に確認するため、PEG 架橋剤の濃度変化に基づくネットワーク形成を調査した(図 4-6)。架橋剤濃度が高くなるとゲル化に寄与する縮合反応が効率的に進行するため CH/PEG のゲル化時間は速くなる。3 成分混合系において PEG 濃度を増加させると、PEG 濃度 1 wt% において観察された変曲点(約 220 秒) よりも、短時間で変曲点が観察された(2.0 wt%; 200 秒、3.0 wt%; 150 秒)。この変曲点は同濃度の PEG を含む CH/PEG のゲル化時間と一致していたことから、CH/PEG ネットワークの形成は RADA16 ネットワークの形成に依存せず形成されることが示唆された。これらの結果は、RADA16 と CH/PEG ネットワークが独立に形成されることを支持する。

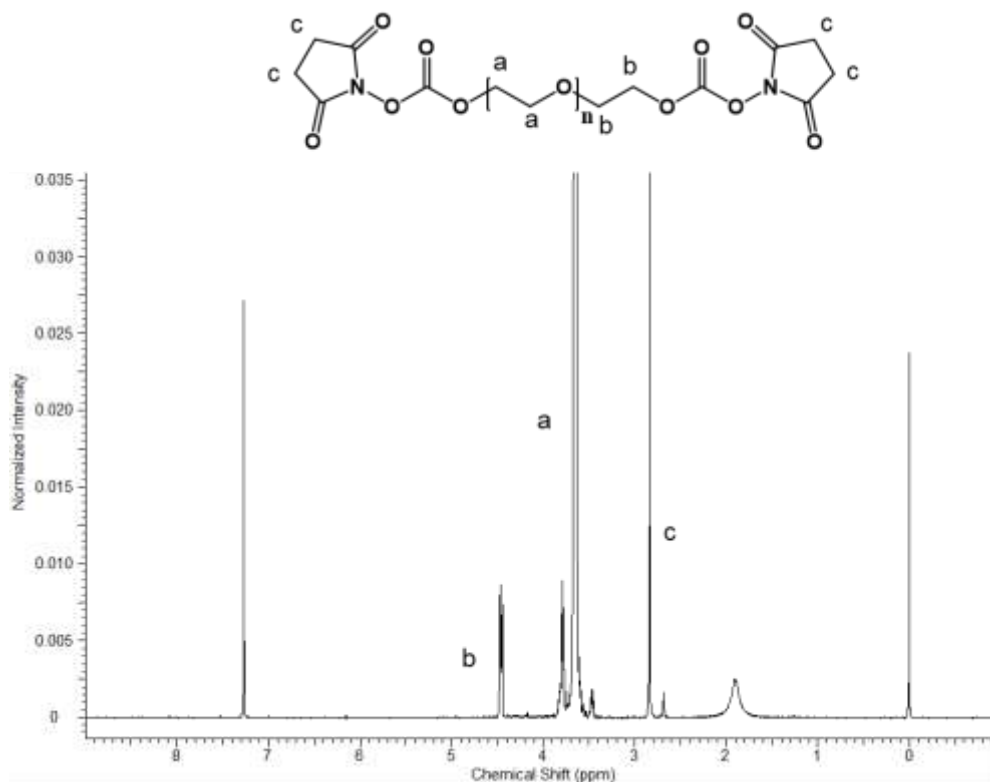


図 4-2. NHS-PEG-NHS の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル。

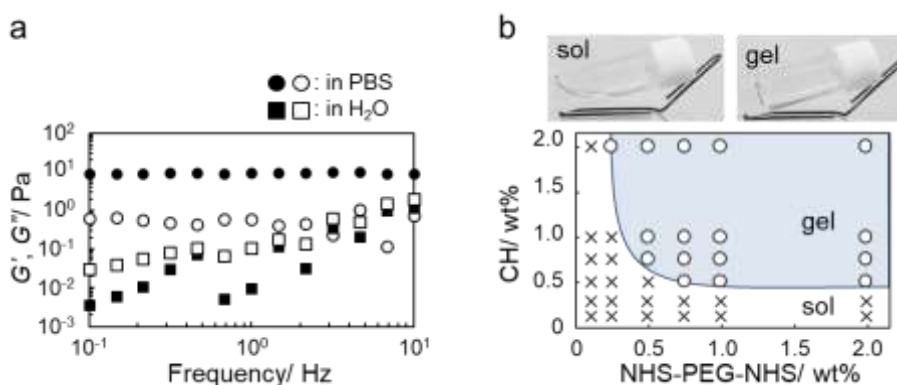


図 4-3. RADA16 と CH/PEG のゲル化解析. (a) RADA16 のゲル化解析: 黒プロットは貯蔵弾性率 ( $G'$ ) を、白プロットは損失弾性率 ( $G''$ ) を示す. (b) CH と NHS-PEG-NHS の濃度に依存したゲル化解析: 挿入写真はバイアル傾斜試験による CH/PEG のゾル-ゲル挙動を示す。また、青領域は各溶液を混合した際のゲル化領域を示す。

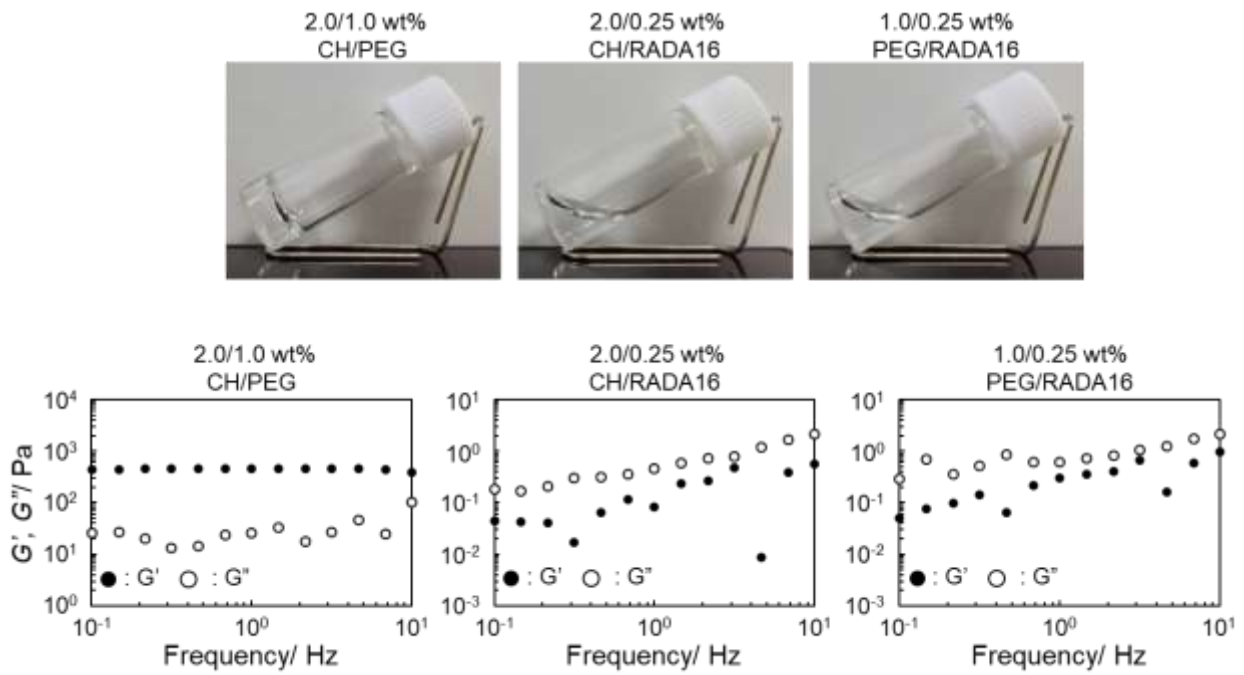


図 4-4. 各混合溶液におけるゲル化解析. 挿入写真は各溶液を混合した際のゾル化、ゲル化挙動をバイアル傾斜試験にて示している。また、それらの溶液を混合した際の、 $G'$ 、及び  $G''$  の周波数依存測定結果も示す。

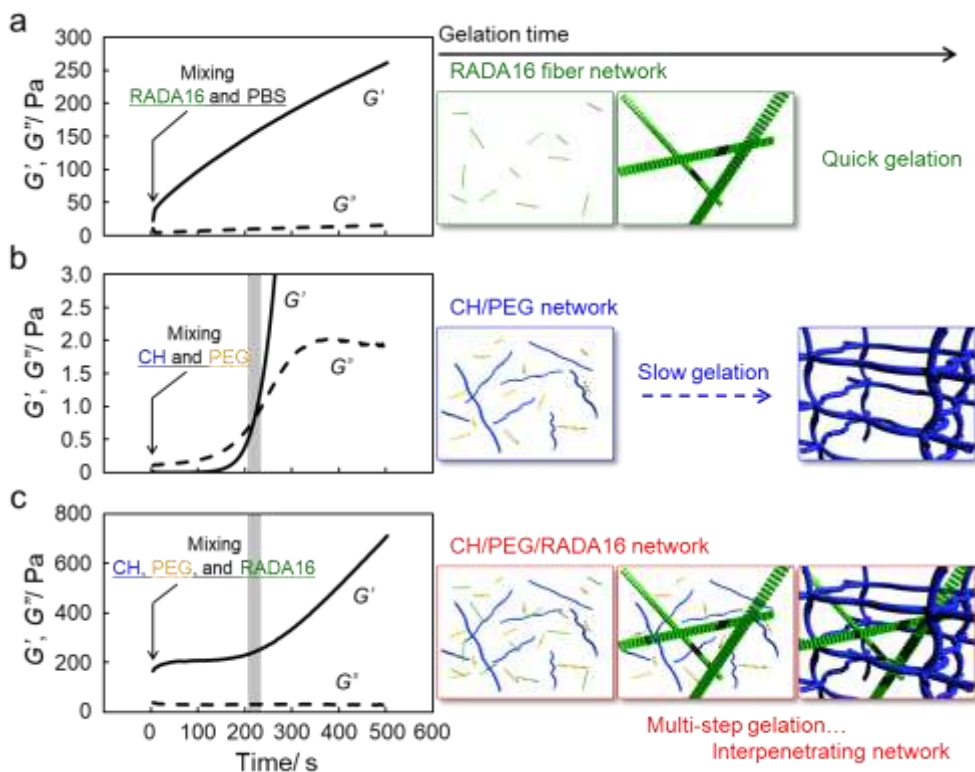


図 4-5. 各混合溶液のゲル化メカニズム解析. (a) RADA16、PBS 混合系、(b) CH、PEG 混合系、(c) CH、PEG、RADA16 混合系における  $G'$  と  $G''$  の時間依存的挙動. 実線:  $G'$ 、破線:  $G''$ 、灰領域: ゲル化時間. また、挿入図は各溶液を混合した際のネットワーク形成概要図を示す。

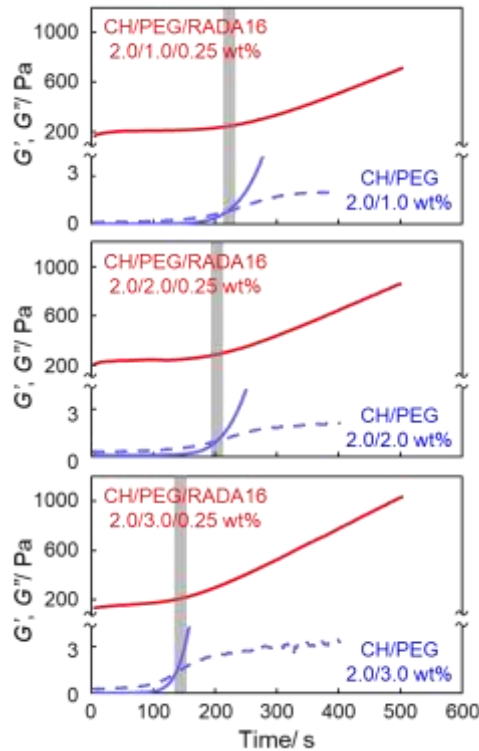


図 4-6. PEG 濃度を増加させた際のゲルメカニズム解析. CH/PEG/RADA16 に関しては全ての PEG 濃度において  $G'$  のみを示す。実線:  $G'$ ; 破線:  $G''$ 。

### 4.3.2 IPN 性に基づくゲル物性評価

得られた CH/PEG/RADA16 のゲル特性を、それぞれ単独の RADA16、CH/PEG と比較することにより評価した。動的粘弾性測定より獲得した CH/PEG/RADA16 の応力-ひずみ曲線より、CH/PEG/RADA16 の力学強度は、RADA16、及び CH/PEG の単独ゲルよりも高かった(図 4-7a、表 4-1)。これは、それぞれ単独のネットワークよりも CH/PEG/RADA16 の方がネットワーク密度が高いことに起因する。上述したように CH/PEG/RADA16 中において、RADA16 と CH/PEG ネットワークがそれぞれ形成していると仮定すると、この結果は双方のネットワークが CH/PEG/RADA16 中にそれぞれ独立して存在することを示唆する。さらに、ゲルの力学強度と膨潤度も IPN 形成を示唆しており(表 4-1)、IPN は単一の網目よりもネットワークが密のため、単一ゲルよりも力学強度が強く、低い膨潤度を示す。<sup>7,8</sup> また、CH/PEG を作成した後、RADA16 のゲル内分子浸透により作成したゲルの力学強度は、3 成分を同時混合したゲルよりも低かった(補足 a)。従って、この IPN ゲル形成では、RADA16 ネットワークの形成が CH/PEG ネットワークの形成より先に起こることが重要であり、3 成分の同時混合により IPN 形成が達成されることは、二つのゲル化速度の相違も重要であったことを示唆する。

次に、CH/PEG/RADA16 中の  $\beta$ -sheet 構造の形成を評価した。ペプチドネットワークは、組織再生効率を促進する微細構造を形成するため、組織再生に好ましい足場材料である。<sup>11,12</sup> 0.25 wt% RADA16 の CD スペクトル測定において、220 nm 付近にペプチドの  $\beta$ -sheet 構造に由来する明確な負のコットン効果が観察され、CH/PEG/RADA16 においても同様に観察された(図 4-7b)。



CH/PEG/RADA16 のスペクトルから CH/PEG のスペクトルを差し引いた差スペクトルは、単独の RADA16 のスペクトルと類似していた。さらに  $\beta$ -sheet 構造の ThT 染色により、得られた蛍光強度は単独の RADA16 と同等だったことから(図 4-8)、RADA16 のネットワークはゲル中で安定に形成していることを示唆する。さらに、ゲルの内部構造を SEM により観察すると、CH/PEG、及び CH/PEG/RADA16 間に大きな違いが観察された(図 4-7c,d)。CH/PEG においては、ハイドロゲル特有の多孔質構造が観察され、その空隙も多く観察された一方、CH/PEG/RADA16 においては、その明確な空隙は観察されず、埋め尽くされた空隙が観察された。これらの結果は、CH/PEG/RADA16 中での RADA16 ネットワークの形成を支持する。一方、多段階手法で作成したゲルの負のコットン効果は、3 液の同時混合により形成するゲルよりも減少したことから、先に示したように RADA16 ネットワークの形成が、CH/PEG ネットワークよりも先に起こることが重要である(補足 b)。

RADA16 の微細なネットワーク構造は、タンパク質産生量や遺伝子発現量に大きく影響を与える。<sup>11,12</sup> 本 IPN 構造は、RADA16 の微細ネットワークと CH/PEG ネットワークとの複合化により生体内 ECM 構造を再現しており、仮に RADA16 ネットワークのみがゲル外に流出してしまうと、包埋する細胞機能の向上は達成されない。そこで、力学強度、及び  $\beta$ -sheet 構造の経時的な変化を観察すると、双方のゲルにおける力学強度は、60 日経過後も維持され、さらに  $\beta$ -sheet 構造も、CH/PEG/RADA16 では、60 日間保持されたことから(図 4-9)、RADA16 ネットワークはゲル外に流出することなくその IPN 構造が、包埋する細胞に優れた生息環境を提供することが期待される。

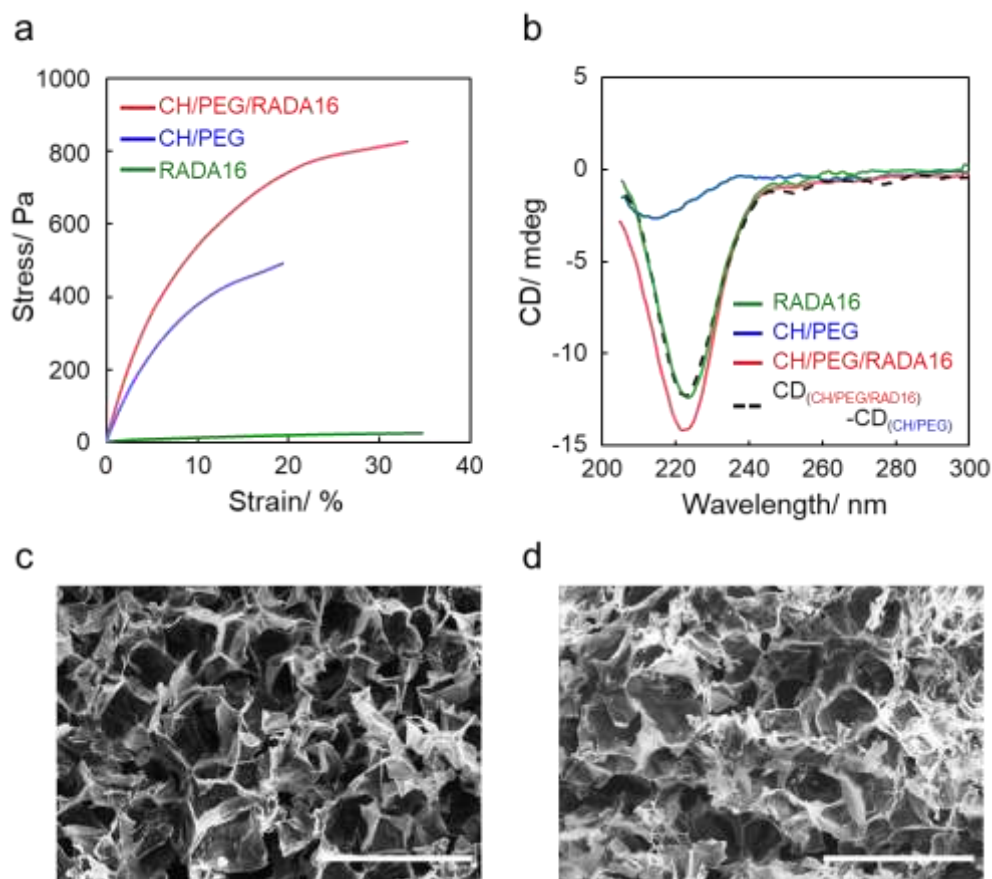


図 4-7. (a) 各ハイドロゲルの応力-ひずみ曲線. (b) 各ハイドロゲルの CD スペクトル測定結果. 破線: CH/PEG/RADA16 のスペクトルから CH/PEG のスペクトルを差し引いた差スペクトル. (c,d) 各ハイドロゲルの SEM 観察結果. (c) CH/PEG, (d) CH/PEG/RADA16. Scale bar; 300  $\mu$ m.

表 4-1. 各ハイドロゲルの物性. Elastic modulus, fracture stress, fracture strain は、図 4-7 の応力ひずみ曲線から算出した。(n=3)

Sample	Elastic modulus/ Pa	Fracture stress/ Pa	Fracture strain/ %	Swelling ratio/ -
RADA16	$16.6 \pm 1.8$	$23.4 \pm 5.0$	$34.3 \pm 0.2$	$52.2 \pm 4.8$
CH/PEG	$533.9 \pm 17.5$	$549.7 \pm 74.8$	$21.8 \pm 2.0$	$33.6 \pm 0.7$
CH/PEG/RADA16	$803.1 \pm 60.3$	$819.9 \pm 43.2$	$33.8 \pm 4.4$	$29.9 \pm 0.6$

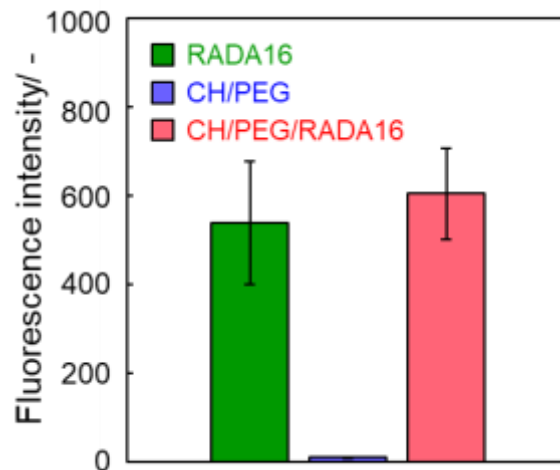


図 4-8 ThT を用いた蛍光測定による  $\beta$ -sheet 構造形成性評価. (n=3)

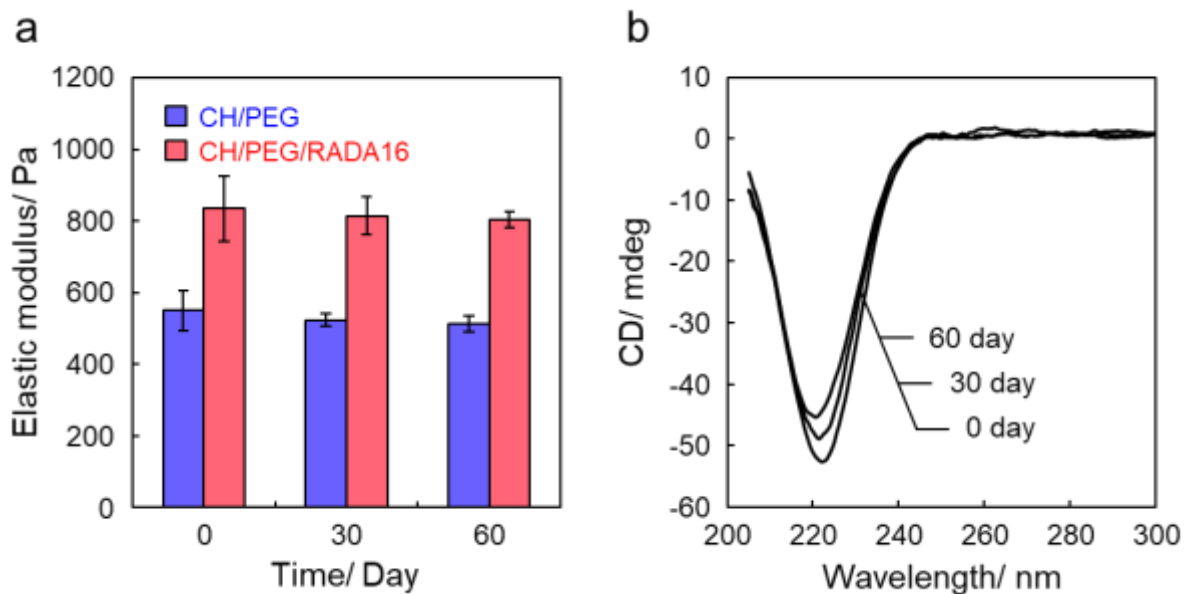


図 4-9. 経過時間毎の(a) 力学強度、(b) CD スペクトル.

### 4.3.3 ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価

ウシ膝軟骨細胞をこれらのゲルに包埋し、細胞の三次元培養を行った。ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞を、hoechst33342 溶液、alexa fluor™ 594 phalloidin 溶液を用い細胞核と f-actin の染色後における共焦点レーザー顕微鏡観察結果より、軟骨細胞がゲル内に均一に分散している様子が観察された(図 4-10a)。均一な細胞分布は組織再生に重要であり、また、ゲルネットワークが物理的に細胞分散性を阻害する可能性がある。<sup>13</sup> 本研究のゲル化システムは、*in-situ* のゲル化システムであるため流動性の有るゾル状態から流動性の無いゲルへと変化するため、ゲルに包埋された細胞は均一、かつ三次元的な分散性を有する。さらに、ゲル内に包埋されたウシ膝軟骨細胞は、全培養期間におい

て球状を維持していた(図 4-11,12)。通常、二次元培養皿で培養された軟骨細胞は繊維状の形態を示し、これは機械的強度に乏しい繊維軟骨への脱分化の兆候であり、この表現型への変化は避けるべきである。<sup>14,15</sup> 一方、本研究における三次元培養は、その球状形態を維持し、関節軟骨の主成分としての硝子軟骨への効率的な分化誘導を果たしていることが示唆された。

細胞包埋下におけるゲルの  $\beta$ -sheet 構造を、CD スペクトル測定を行うことで確認した。ウシ膝軟骨細胞を包埋した CH/PEG/RADA16 の CD スペクトルは、ウシ膝軟骨細胞を包埋していない場合と同様に、220 nm 付近にペプチドの自己組織化に基づく負のコットン効果が観察された。さらに、ウシ膝軟骨細胞、CH/PEG に由来するスペクトルを差し引いた差スペクトルは、単一の RADA16 と類似していた(図 4-10b)。この結果は、細胞の包埋に関係なく、RADA16 に由来する  $\beta$ -sheet 構造の形成を示唆している。

CH/PEG/RADA16 の細胞足場としての機能を確認するため、包埋した細胞の増殖、代謝活性、sGAG 産生量、COL 産生量を評価した(図 4-13)。定量したウシ膝軟骨細胞数は、双方のゲルにおいて 60 日間の培養で初期細胞数( $0.5 \times 10^6$  cells) と同様に維持していた(図 4-13a) 一方で、MTT assay によって算出した細胞の代謝活性は双方のゲルにおいて明確に異なっていた(図 4-13b)。また、CH/PEG に包埋したウシ膝軟骨細胞の代謝活性は 2 日で減少しその後維持していた一方、CH/PEG/RADA16 では減少せず、60 日間に渡り僅かに上昇した。この結果は、CH/PEG/RADA16 に包埋した細胞の代謝活性は CH/PEG と比較し向上しており、RADA16 の微細ネットワーク構造の寄与が示唆される。

関節軟骨は主に、GAG 誘導体と幾種の COL により構成される高度に水和した軟組織である。<sup>16</sup> 従って、軟骨組織再生のための足場材料設計においては、包埋したウシ膝軟骨細胞からの GAG、及び COL 産生を促進させることが不可欠である。培養 30 日におけるウシ膝軟骨細胞の sGAG 産生量は、CH/PEG よりも CH/PEG/RADA16 において有意に高く、CH/PEG/RADA16 においてウシ膝軟骨細胞が活性化されたことを示唆する(図 4-13c,d)。さらに、hydroxyproline assay よって定量した COL 産生量も同様に、CH/PEG/RADA16 において向上した(図 4-13e,f)。これらの結果は、RADA16 の微細ネットワークを用い IPN を構築することにより、ECM 産生を含む細胞機能が有意に促進されることを示唆している。

本足場材料を用い包埋したウシ膝軟骨細胞の機能をさらに詳細に評価するため、典型的な mRNA の発現量を RT-PCR によって評価した(図 4-14)。硝子軟骨への選択的な分化を達成するためには、コラーゲン型の発現タイプが特に重要である。<sup>17</sup> 一般的に、硝子軟骨においては II 型コラーゲンが豊富に含まれ、繊維軟骨には I 型コラーゲン支配的である。<sup>16,17</sup> *ACAN*、及び *COL2A1* は硝子軟骨様の遺伝子マーカーであり、*COL1A1* は繊維軟骨様の遺伝子発現マーカーである。CH/PEG/RADA16 に包埋したウシ膝軟骨細胞の遺伝子発現量は、CH/PEG と比較し、*ACAN*、*COL2A1* において向上し、*COL1A1* においては低下した。この結果は、関節軟骨の再生足場として RADA16 が有効に寄与していることを示唆する。一方、硝子軟骨への選択性は、*COL2A1* と *COL1A1* の遺伝子発現比から評価可能であり、CH/PEG/RADA16 に包埋したウシ膝軟骨細胞の *COL2A1*/*COL1A1* は、CH/PEG よりも高くなった。従って、硝子軟骨組織を形成するための CH/PEG/RADA16 は、関節軟骨組織再生において有望な足場であることが実証された。

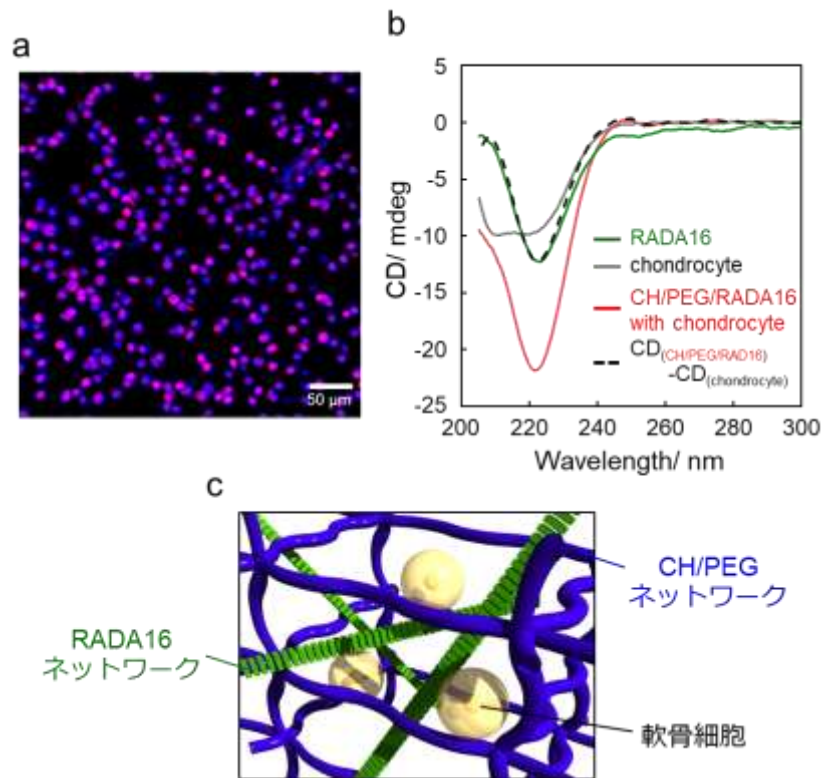


図 4-10. 細胞包埋直後における細胞分散性評価、 $\beta$ -sheet 構造形成性評価. (a) CH/PEG/RADA16 に包埋したウシ膝軟骨細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像. 核を hoechst33342 (青)/f-actin を alexa fluor™ 594 phalloidin (赤) を用いて染色した. Scale bar: 50  $\mu$ m. (b) 細胞包埋後の CD スペクトル測定結果. 破線: 細胞包埋 CH/PEG/RADA16 の CD スペクトルより細胞包埋 CH/PEG の CD スペクトルを差し引いた差スペクトル. (c) 細胞包埋下における IPN 概要図.

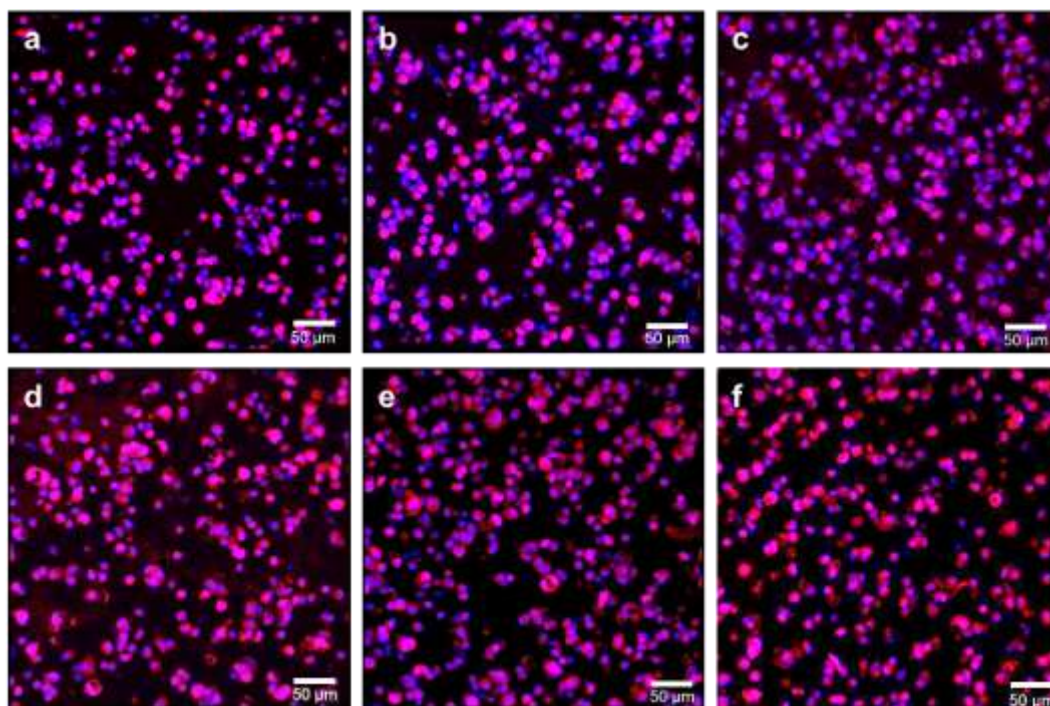


図 4-11. 培養経過毎の CH/PEG に包埋したウシ膝軟骨細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像. 核を hoechst33342 (青)/f-actin を alexa fluor™ 594 phalloidin (赤) を用いて染色した。(a) 10 日, (b) 20 日, (c) 30 日, (d) 40 日, (e) 50 日, (f) 60 日培養した後の画像. Scale bar: 50 μm.

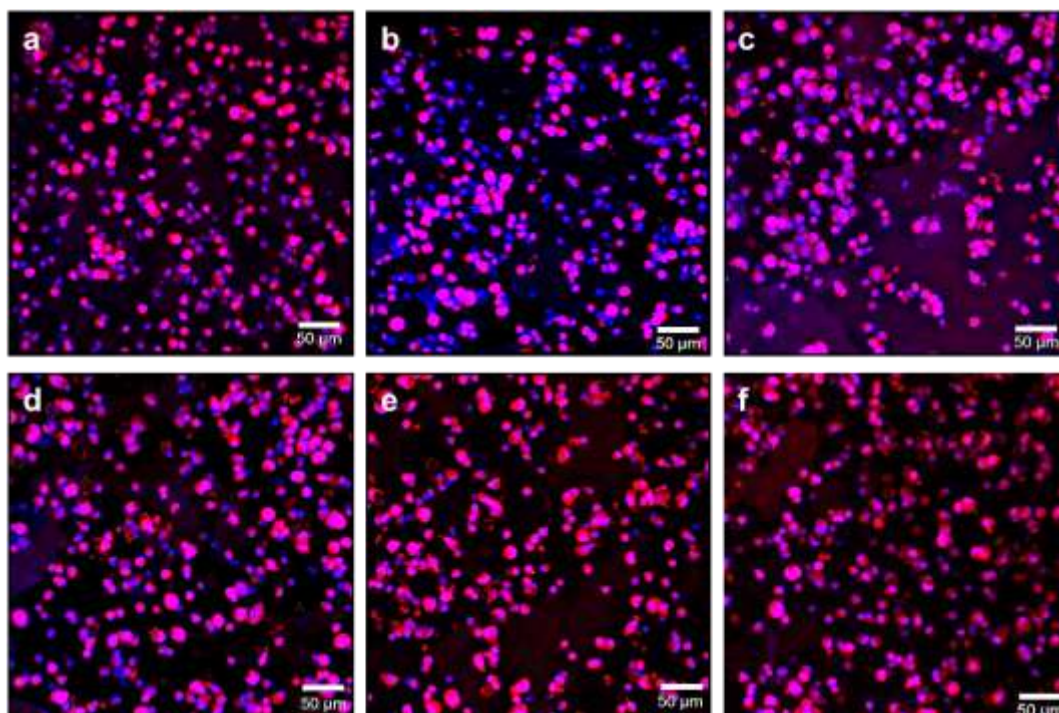


図 4-12. 培養経過毎の CH/PEG/RADA16 に包埋したウシ膝軟骨細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像. 核を hoechst33342 (青)/f-actin を alexa fluor™ 594 phalloidin (赤) を用いて染色した。(a) 10 日, (b) 20 日, (c) 30 日, (d) 40 日, (e) 50 日, (f) 60 日培養した後の画像. Scale bar: 50 μm.

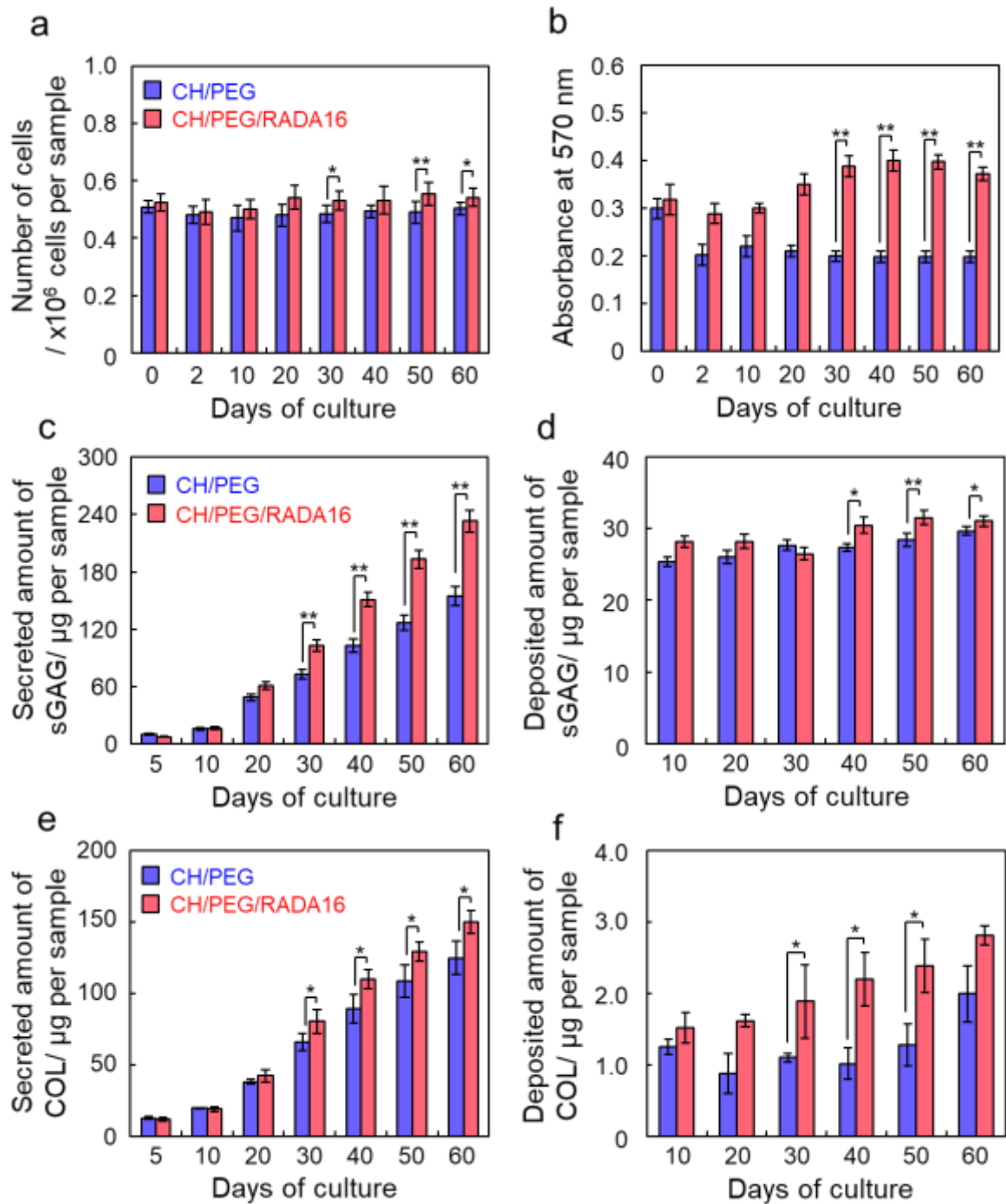


図 4-13. 細胞をゲル内に包埋し培養した際の細胞機能. (a) 培養細胞数, (b) MTT assay を用いた 570 nm における吸光度, (c) 放出された sGAG 量, (d) 蓄積した sGAG 量, (e) 放出された COL 量, (f) 蓄積した COL 量. (n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (Student's *t*-test))

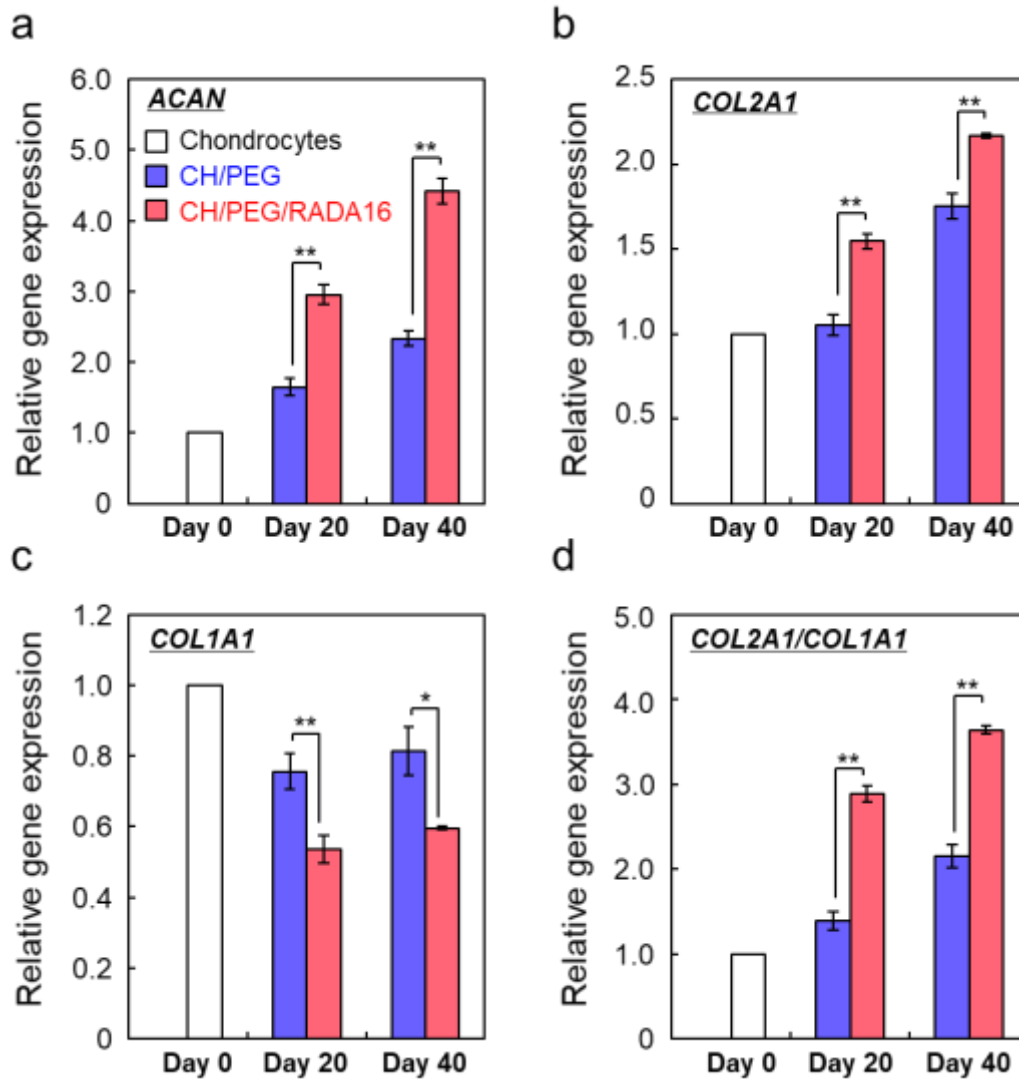


図 4-14. ウシ膝軟骨細胞ゲル内培養後の mRNA 発現量. (a) Aggrecan (*ACAN*) 遺伝子, (b) II 型コラーゲン遺伝子(*COL2A1*), (c) I 型コラーゲン遺伝子(*COL1A1*) (d) *COL2A1*/*COL1A1* 比. 各遺伝子発現量を *GAPDH* にて規格化した後、Day 0 におけるウシ膝軟骨細胞から抽出した遺伝子発現量との相対比を示している。(n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (Student's *t*-test))



## 4.4 結論

本章では、生体内 ECM 構造を再現可能な *in-situ* 型インジェクタブル IPN ゲル作成のため、ゲル作成に係るゲル化駆動力とゲル化速度に着目し、CH、PEG、RADA16 から成る軟骨組織再生足場の作成を検討した。レオメーターを用いた動的粘弾性測定、及びバイアル傾斜試験により、RADA16 は超純水中ではなく、PBS 中において初めてゲルを形成する一方、CH/PEG は CH と PEG の濃度に依存しゲルを形成した。さらにゲル化ダイナミクス測定では、RADA16 は PBS と混合した直後にゲル化する一方、CH/PEG は所定時間経過後にゲルを形成した。これら三種を組み合わせた CH/PEG/RADA16 においては、溶液混合直後のゲル化が確認され、貯蔵弾性率  $G'$  は多段階的に変化し、 $G'$  の変曲点は CH/PEG のゲル化点と一致していたことから、双方のネットワーク形成を阻害しないことが示唆された。CH/PEG/RADA16 におけるゲル特性評価において、CH/PEG/RADA16 の力学強度は、CH/PEG と比較し有意に優れ、かつ膨潤度は低下したことから、双方の網目複合化におけるネットワーク密度の向上が示唆された。さらに CD スペクトル測定においては、単一の RADA16 に観察される負のコットン効果が、CH/PEG/RADA16 においても同様に観察されたことから、CH/PEG/RADA16 の  $\beta$ -sheet 構造がゲル中で安定に保持されていることが示唆された。これらの結果より、CH、PEG、RADA16 により構成されるゲルは、双方のネットワークが独立に IPN を形成していることが示唆された。

本 IPN ゲルにウシ膝軟骨細胞を包埋し培養すると、軟骨細胞活性化の指標の一つである sGAG 産生量、COL 産生量は、CH/PEG と比較し有意に優れていた。さらに、軟骨特有の遺伝子発現量は、CH/PEG/RADA16 において、CH/PEG と比較しアグリカン遺伝子 *ACAN* と II 型コラーゲン遺伝子 *COL2A1* は向上し、I 型コラーゲン遺伝子 *COL1A1* は低下した。これらの結果より、CH/PEG/RADA16 においては、力学強度に乏しい繊維軟骨ではなく、関節軟骨由来の硝子軟骨に誘導されていることを実証した。

従来の IPN ゲルは UV 照射やゲル前駆体のゲル浸漬による多段階な作成手法が主に研究されているが、これら手法は、細胞毒性を伴う事、またインジェクタブルで IPN ゲルを作成できない事から、低侵襲性治療実現のための材料設計には不向きであった。本章にて提案した混合するだけで IPN ゲルを合成可能なインジェクタブルシステムは、同様のコンセプトを用いた足場材設計を他の成分で行うことで、軟骨組織再生のみならず、骨再生や腱再生など様々な組織再生への応用が期待されるだろう。

## 参考文献

1. Yang, J.; Yang, X.; Wang, L.; Zhang, W.; Yu, W.; Wang, N.; Peng, B.; Zheng, W.; Yang, G.; Jiang, X. Biomimetic Nanofibers can Construct Effective Tissue-engineered Intervertebral Discs for Therapeutic Implantation. *Nanoscale* **2017**, *9*, 13095-13103.
2. Spang, M. T.; Christman, K. L. Extracellular Matrix Hydrogel Therapies: In vivo Applications and Development. *Acta Biomater.* **2018**, *68*, 1-14.
3. Kundu, B.; Rajkhowa, R.; Kundu, S. C.; Wang, X. Silk Fibroin Biomaterials for Tissue Regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 457-470.
4. Morgese, G.; Cavalli, E.; Müller, M.; Zenobi-Wong, M.; Benetti, E. M. Nanoassemblies of Tissue-Reactive, Polyoxazoline Graft-Copolymers Restore the Lubrication Properties of Degraded Cartilage. *ACS Nano* **2017**, *11*, 2794-2804.
5. Ingavle, G. C.; Dormer, N. H.; Gehrke, S. H.; Detamore, M. S. Using Chondroitin Sulfate to Improve the Viability and Biosynthesis of Chondrocytes Encapsulated in Interpenetrating Network (IPN) Hydrogels of Agarose and Poly(ethylene glycol) Diacrylate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 157-170.
6. de Lima, G. G.; Elter, J. K.; Chee, B. S.; Magalhães, W. L. E.; Devine, D. M.; Nugent, M. J. D.; de Sá, M. J. C. A Tough and Novel Dual-Response PAA/P(NiPAAM-co-PEGDMA) IPN Hydrogels with Ceramics by Photopolymerization for Consolidation of Bone Fragments Following Fracture. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*, 054101.
7. Wang, J.; Wei, J. Interpenetrating Network Hydrogels with High Strength and Transparency for Potential Use as External Dressings. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *80*, 460-467.
8. Yokoi, H.; Kinoshita, T.; Zhang, S. Dynamic Reassembly of Peptide RADA16 Nanofiber Scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, *102*, 8414-8419.
9. Gelain, F.; Bottai, D.; Vescovi, A.; Zhang, S. Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Cultures. *PLoS One* **2006**, *1*, e119.
10. Cormier, A. R.; Pang, X.; Zimmerman, M. I.; Zhou, H. X.; Paravastu, A. K. Molecular Structure of RADA16-I Designer Self-assembling Peptide Nanofibers. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7562-7572.
11. Wang, T. W.; Chang, K. C.; Chen, L. H.; Liao, S. Y.; Yeh, C. W.; Chuang, Y. J. Effects of An Injectable Functionalized Self-Assembling Nanopeptide Hydrogel on Angiogenesis and Neurogenesis for Regeneration of the Central Nervous System. *Nanoscale* **2017**, *9*, 16281-16292.
12. Yang, H.; Hong, N.; Liu, H.; Wang, J.; Li, Y.; Wu, S. Differentiated Adipose-Derived Stem Cell Cocultures for Bone Regeneration in RADA16-I in vitro. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 9458-9472.
13. Jeuken, R. M.; Roth, A. K.; Peters, R. J. R. W.; Van Donkelaar, C. C.; Thies, J. C.; Van Rhijn, L. W.; Means, P. J. Polymers in Cartilage Defect Repair of the Knee: Current Status and Future Prospects. *Polymers* **2016**, *8*, 219.
14. Toh, W. S.; Spector, M.; Lee, E. H.; Cao, T. Biomaterial-mediated Delivery of Microenvironmental Cues for Repair and Regeneration of Articular Cartilage. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 994-1001.
15. Han, L.; Wang, M.; Li, P.; Gan, D.; Yan, L.; Xu, J.; Wang, K.; Fang, L.; Chan, C. W.; Zhang, H.; Yuan, H.; Lu, X. Mussel-Inspired Tissue-Adhesive Hydrogel Based on the Polydopamine-Chondroitin Sulfate

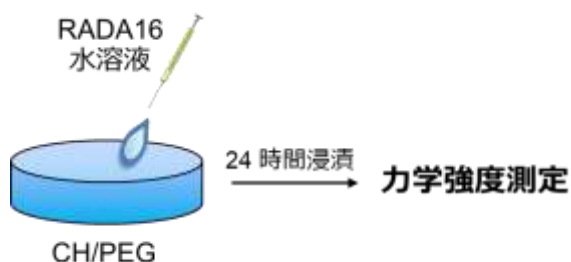
Complex for Growth-Factor-Free Cartilage Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2018**, 10, 28015-28026.

16. Armiento, A. R.; Alini, M.; Stoddart, M. J. Articular Fibrocartilage - Why does Hyaline Cartilage Fail to Repair? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, 146, 289-305.
17. Shepherd, D. E.; Seedhom, B. B. The 'instantaneous' Compressive Modulus of Human Articular Cartilage in Joints of the Lower Limb. *Rheumatology* **1999**, 38, 124–132.

# 補足

## 力学強度測定

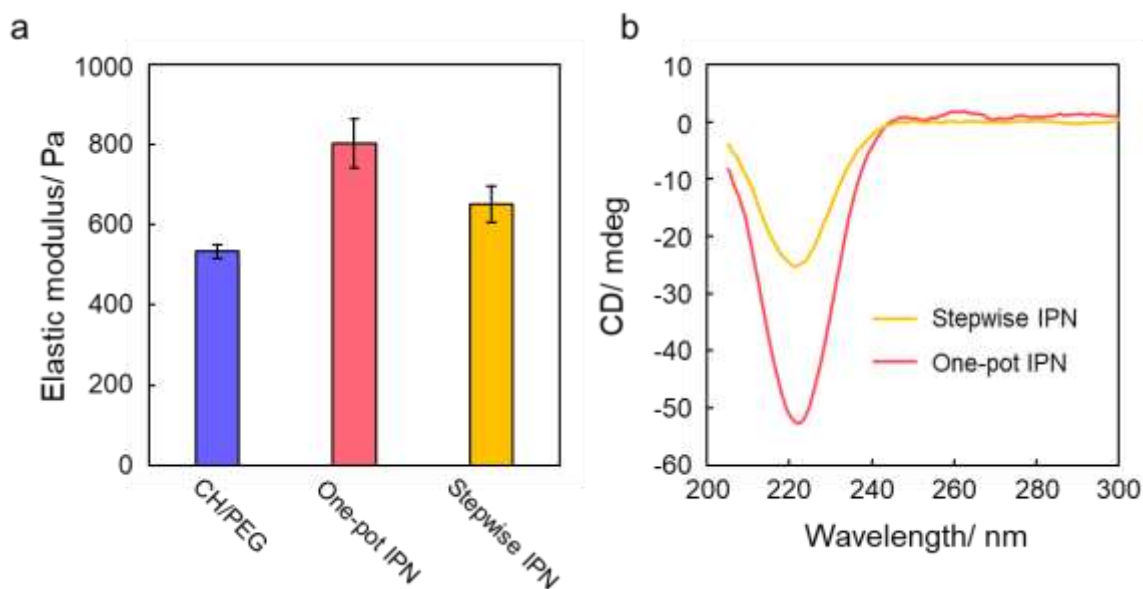
3.2.5 に倣い、225  $\mu\text{L}$  のディスク型 2.0/1.0 wt% CH/PEG を作成した。ゲル化させた後、75  $\mu\text{L}$  1.0 wt% RADA16 水溶液を上部に添加し、室温で 24 時間浸漬させた。3.2.5 と同様に動的粘弾性測定により応力-ひずみ曲線を作成し、ゲルの力学強度を算出した。



スキーム 4-4. Stepwise IPN ゲル作成手法

## CD スペクトル測定

450  $\mu\text{L}$  の 2.0/1.0 wt% CH/PEG を石英セルに作成した。ゲル化させた後、150  $\mu\text{L}$  1.0 wt% RADA16 水溶液を上部に添加し、室温で 24 時間浸漬させた。4.2.6 と同様に CD スペクトルを測定した。



補足. 多段階手法を介し作成した IPN ゲルの(a) 力学強度(n=2)、(b) CD スペクトル. 尚、one-pot IPN は 3 液を同時に混合しゲルを作成したサンプル、stepwise IPN は多段階手法により作成したサンプルを示す。

## 第 5 章

# 分解性インジェクタブル IPN ゲルの作成と 軟骨細胞機能評価

## 5.1 緒言

第4章では、インジェクタブル IPN ゲルを作成し、包埋するウシ膝軟骨細胞の機能を向上させる戦略を確立した。本章では、より一層細胞機能を向上させかつ、組織再生後に移植材料との置き換わりを実現する材料設計のため、第3章で提案したゲル分解性を、第4章で確立したインジェクタブル IPN ゲルに付与することを試みた。

分解性インジェクタブル IPN ゲルの設計には光照射を伴う手法が報告されているが、<sup>1</sup> 前章でも解説したように、この手法は細胞毒性を伴うため低侵襲を目的とする組織再生用途には適さない。筆者の知る限り分解性 IPN ゲルを *in-situ* で作成し、その中で軟骨組織再生を行った研究例はない。本章では、第3章で確立した分解性架橋剤(NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS) を、第4章の非分解性架橋剤(NHS-PEG-NHS) の代わりに用いた分解性インジェクタブル IPN ゲルを設計した。RADA16 は、IPN ゲル中ではネットワーク構造を保持していたものの、物理架橋を駆動力としネットワークを形成しているため、単独で長期にゲル状態を保持することはできない。ここに着目し、CH ネットワーク成分が分解性を持てば、全体として分解性をもつ IPN ゲルになると考えた。すなわち、CH/PEG-PLA-PEG の分解と共に、RADA16 ネットワークも分解されることが予想されるため、包埋する細胞の機能を、繊維性とゲル分解性との相乗作用により向上可能と予想した。RADA16 と CH/PEG-PLA-PEG との IPN 形成をレオメーターを用いた動的粘弾性測定により評価し、CD スペクトル測定により  $\beta$ -sheet 構造のゲル内安定性を評価した。さらに、生理条件下におけるゲル分解性を、重量損失挙動を追跡することで調査した。第4章と同様に包埋したウシ膝軟骨細胞のタンパク質産生量と遺伝子発現量を定量することで、本戦略の軟骨組織再生に対する有効性を調査した。

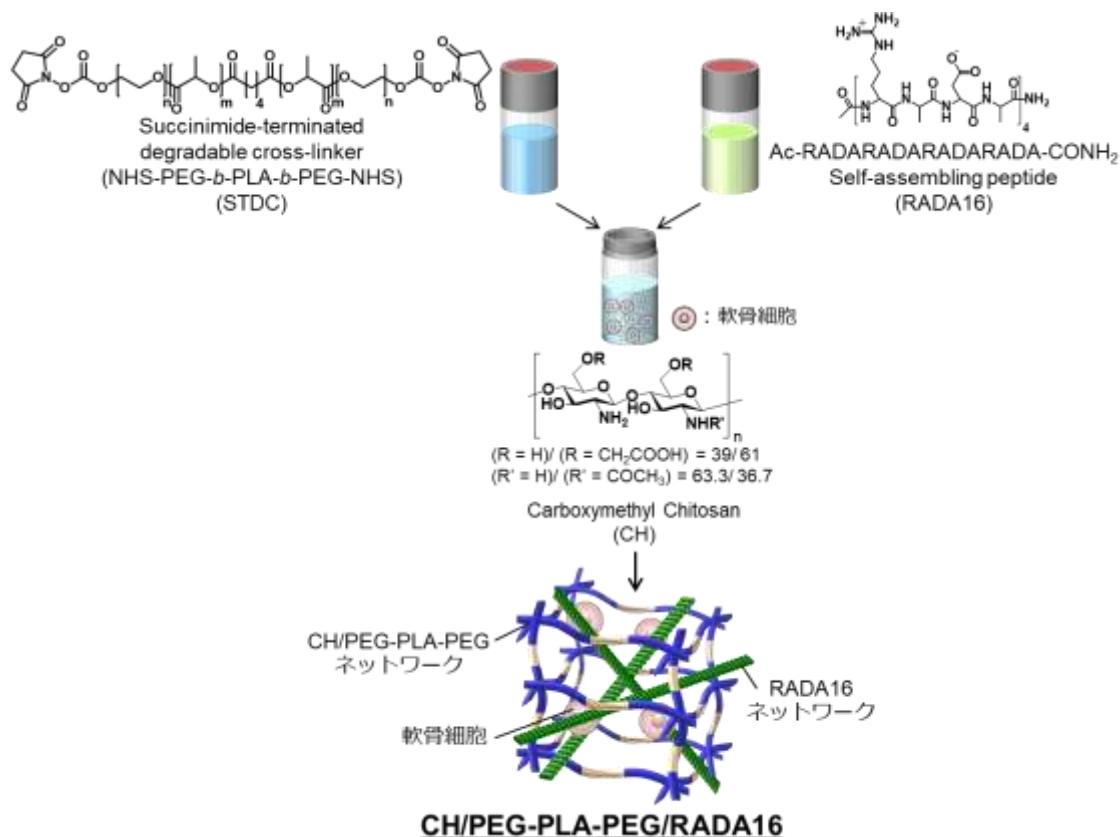


図 5-1. 本章における分解性 IPN ゲルの設計概略図.

## 5.2 実験

### 5.2.1 試薬、溶媒

第5章で用いる試薬、及び溶媒は表5-1の通りである。本章では前章で合成した NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を分解性架橋剤として用いた。他の試薬、溶媒に関しては、それ以上の精製をすることなく使用した。

表 5-1. 試薬、溶媒

試薬名	購入先
Carboxymethyl chitosan (CH)* <sup>1</sup>	Koyo Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Fetal bovine serum (FBS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
NHS-PEG- <i>b</i> -PLA- <i>b</i> -PEG-NHS* <sup>2</sup>	
Penicillin-streptomycin (PS)	Life technologies Corp. (Grand Island, NY, USA)
Poly(ethylene glycol) (PEG)* <sup>3</sup>	Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)
RADA16 (PuraMatrix™)* <sup>4</sup>	3-D Matrix Inc. (Cambridge, MA, USA)

※1  $M_w=100000$ ,  $M_n=47000$ ,  $M_w/M_n=2.1$ , Deacetylation degree, 63.3%; Degree of substitution, 61%

※2  $M_n=5,380$

※3  $M_n=4,580$

※4 Ac-RADARADARADARADA-CONH<sub>2</sub>. RADA16 は、(株) スリー・ディー・マトリックスの松田章博士より提供されたものである。

### 5.2.2 ゲル物性測定

本章におけるゲル物性評価は前3章のゲル物性解析(3.2.3-3.2.8)と同様に評価した。尚、CD スペクトル測定に際し、90  $\mu$ L PBS に懸濁させたウシ膝軟骨細胞( $1.0 \times 10^7$  cells/mL) に関しても同様な測定を行った。

### 5.2.3 ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価

分解性架橋剤を用いた細胞包埋型 IPN ゲルの作成も同様に、4.2.8 に記載した手順により合成した。ゲル作成条件、及び細胞包埋条件も同様である。また、ゲル内に包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価においては、前3章(3.2.10-3.2.17)と同様に評価した。尚、H&E 染色、及び AB 染色に関しては、東京理科大学薬学部生命創薬科学科樋上賀一教授、及び水之江雄平博士にご教授いただき、本学で実験を行った。

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 IPN ゲル形成評価

以降の説明においては、以下の略語を用い記述する。STC (succinimidyl terminated cross-linker; NHS-PEG-NHS)、STDC (succinimidyl terminated degradable cross-linker; NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS)、CP (CH/PEG)、CPR (CH/PEG/RADA16)、CPL (CH/PEG-PLA-PEG)、CPLR (CH/PEG-PLA-PEG/RADA16)。

CH、RADA16、STDC を混合し 20 分間室温で静置すると、先行の CPR と遜色ない透明なゲル形成が確認された(図 5-2a)。

PBS 中における STDC はその親-疎水構造に基づき、疎水性部位 PLA をコアとする会合体を形成し得る。<sup>2</sup> その会合体形成によりゲル化効率が阻害されないかどうかを確認するため、CH、STDC、RADA16 を混合しゲルを作成した際の理論重量との重量比を算出することで架橋効率を算出した(図 5-2b)。ゲルを作成し膨潤させ凍結乾燥後の重量と、ゲル作成時の全成分がゲル化した際の理論重量との重量比により算出される gel content (%) は、架橋剤に含まれる PLA や IPN 形成のための RADA16 の有無に依らず 80% と高かったことから、CH、STDC、RADA16 を混合した際の架橋は効率的に進行することが示唆された。この際、ゲルを乾燥させる前処理として超純水に浸漬させ無限希釈しているため、架橋せずミセル形成が優先的に進行するならばその処理によりミセルはゲル外に流出し gel content は顕著に減少するはずである。さらに、RADA16 もネットワークを形成しない、つまり疎水性 PLA の存在により疎水相互作用が働き自己組織化しないならば、RADA16 添加系において同様の gel content を示さないはずである。従ってこれらの結果は、これらの混合液中ではネットワーク形成が阻害されることなく双方のネットワークが形成していることが示唆される。また、図 3-13d、図 3-15a において示したように、RADA16 を含まないゲルでは未架橋分のゲル前駆体が流出することで約 20% の重量損失が観察されることを確認している。従って、CPLR においてもゲル前駆体のうち 80% は架橋剤と CH との両末端反応に基づくアミド結合形成により三次元ゲルを形成するが、残りの 20% は片末端反応、または未反応架橋剤がゲル外へ流出していることを示唆する。

網目複合化に基づくゲルの力学強度向上を確認するため、形成したゲルの硬さの指標となる貯蔵弾性率( $G'$ ) をレオメーターにより測定したところ、10 Hz における  $G'$  は CP、CPL、CPR、CPLR においてそれぞれ、 $311\pm 16$ 、 $230\pm 41$ 、 $473\pm 12$ 、 $445\pm 26$  Pa となった(図 5-2c)。この結果は、架橋剤の構造効果による強度減少傾向はあるものの分解性架橋剤のミセル形成や片末端反応の影響による顕著な力学強度減少なく、RADA16 を添加することで網目複合化に基づくゲル強度の向上が観察されたことから、STDC を架橋剤として用いても双方のネットワーク形成を阻害することなく IPN を形成していることが示唆される。

前述の IPN 形成をより具体的に観察するため、各溶液を混合した際の  $G'$  の時間変化を動的粘弾性装置により評価した。第 4 章において RADA16 は超純水との混合ではなく、PBS との混合により初めて、0.25 w% RADA16 のゲルを形成することを確認している。CH、STDC、RADA16 を混合した溶液において、溶液混合直後の  $G'$  は  $G''$  よりも高かったことから明確なネットワーク形成が確認された(図 5-3a)。この挙動は、RADA16 と PBS との混合系においても同様に観察され、この結果は RADA16 のネットワーク形成を示唆する。さらに  $G'$  は、約 400 秒程で急激に上昇した。



これは、RADA16 を含まない CPL におけるゲル化点と一致していることから、混合系においてもネットワーク形成は阻害されないことを示唆している。これらの挙動は、先行の CPR においても同様に観察され、その変曲点は約 200 秒で観察された(図 5-3a)。この変曲点の違いは、第 3 章でも述べたように架橋剤に含まれる PLA の寄与のためであるが、STDC を用いた際のゲル化阻害を示している訳ではない。従って、STDC を用いても RADA16 の物理架橋ネットワークと CPL の化学架橋ネットワークはそれぞれのネットワーク形成を阻害しないことを実証した(図 5-3b)。通常、分解性 IPN 形成にはモノマーの光架橋や分子浸透により形成する手法が最も一般的な方法であったが、本手法は細胞毒性を与える外部刺激を必要とせず分解性 IPN 形成を可能とするため、生体内への直接的な注入のための新規な分解性足場材料の作成手法となる。<sup>3-5</sup>

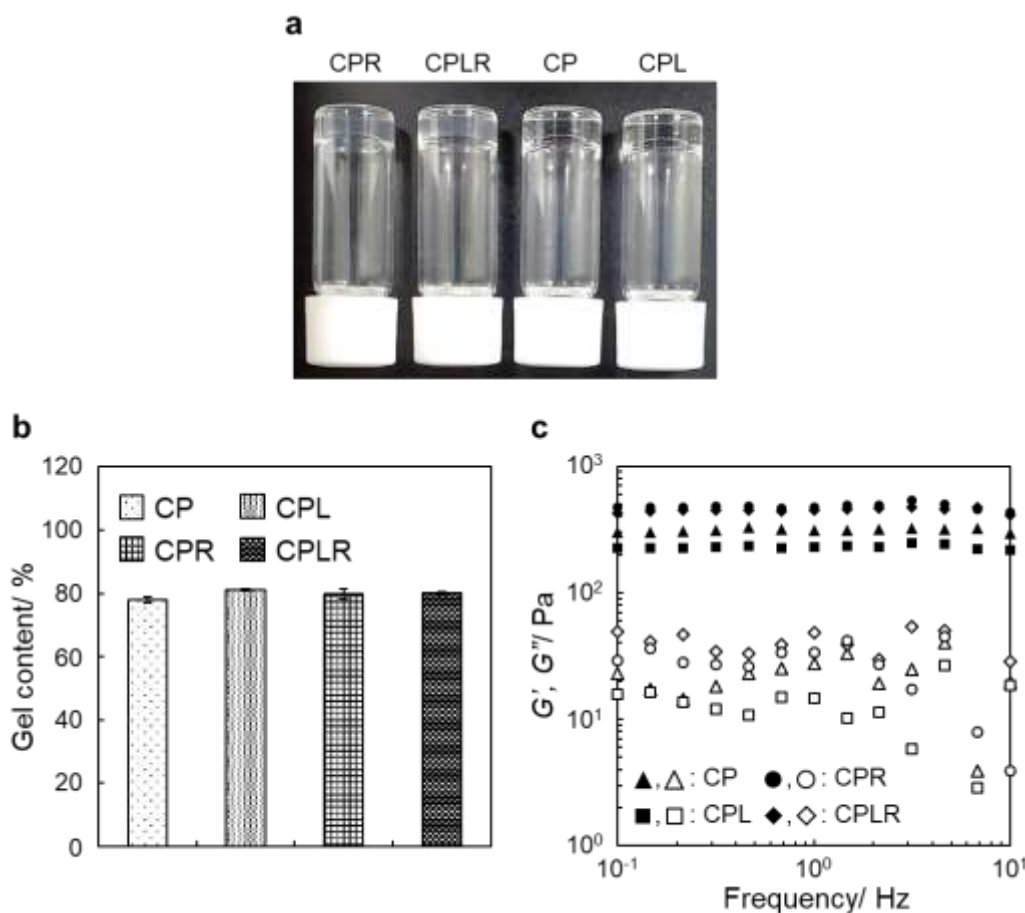


図 5-2. ゲル形成確認評価. (a) バイアル傾斜法によるゲル化確認. (b) ゲル化効率測定. (c) 周波数依存的な貯蔵弾性率測定: 塗りつぶしプロット、白抜きプロットは  $G'$ 、 $G''$  を示す。

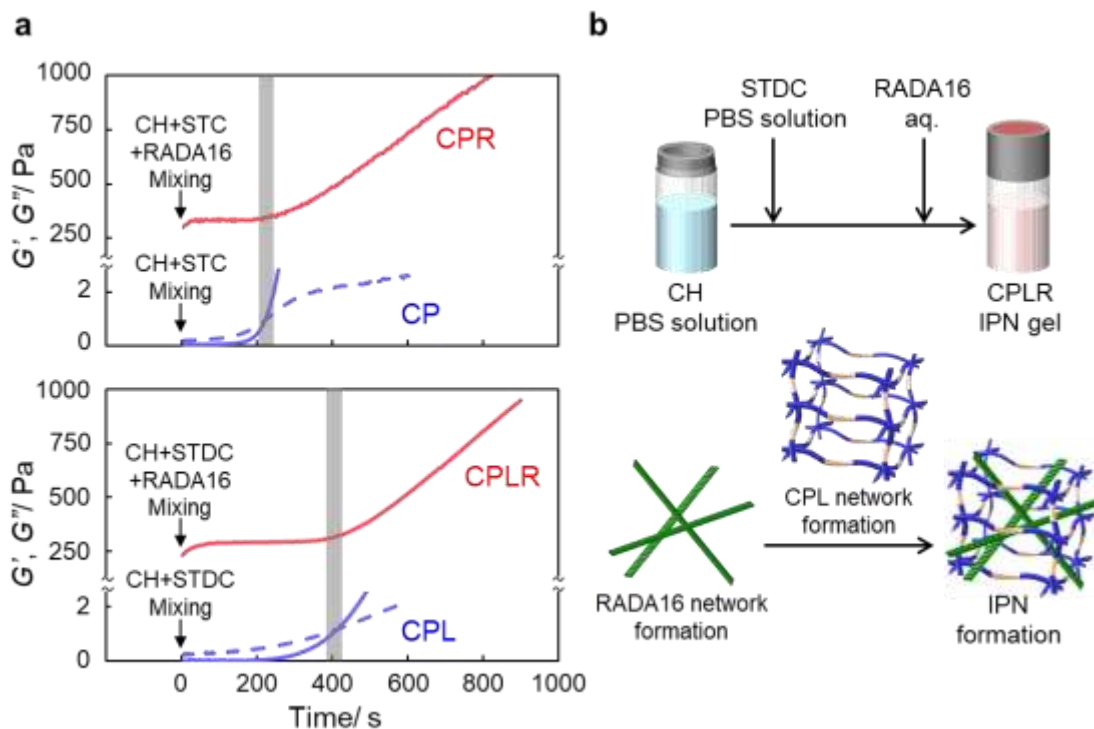


図 5-3. IPN 形成評価。(a)  $G'$  の時間依存変化. 実線は  $G'$  を、破線は  $G''$  を示し、RADA16 混合系については  $G'$  のみ示す。また、灰色領域はネットワーク形成時間を示す。(b) 想定される IPN 形成過程.

### 5.3.2 IPN 性に基づくゲル物性評価

形成したゲルの詳細な IPN 挙動を観察するため、応力-ひずみ曲線から算出されるヤング率と、ゲル膨潤重量と乾燥重量との重量比により算出される膨潤度を評価した。CP、CPL、CPR、CPLR におけるヤング率はそれぞれ、 $372 \pm 39$  Pa、 $757 \pm 7.9$  Pa、 $352 \pm 5.8$  Pa、 $654 \pm 23$  Pa であり、周波数依存測定で得た  $G'$  の挙動と類似していた(図 5-4a)。さらに膨潤度は、RADA16 を混合することで双方のゲルにおいて低下した(図 5-4b)。一般的に、複数の網目が独立に存在する IPN ゲルでは、シングルネットワークにより構成されるゲルと比較し、網目密度増大に伴いヤング率は向上、膨潤度は低下する。<sup>6,7</sup> 本 IPN システムにおいても、RADA16 を混合した CPLR において混合していない CPL と比較し、ヤング率が向上、膨潤度が低下し、さらにその変化率は架橋剤として PLA を含まない PEG 架橋剤を用いた IPN ゲルと比較してもほぼ同等であることから、CPLR において RADA16 ネットワークと CPL ネットワークの独立な形成を示唆し、疎水性 PLA の存在に依らず、ネットワーク形成を阻害することなく IPN を形成可能なことを実証した。自己組織化ペプチドは、pH や温度、電荷など外部環境変化に依存し、疎水性相互作用、水素結合、イオン結合を駆動としネットワークを形成するが、<sup>8-11</sup> STDC は疎水性の PLA を含むため、ゲル内部はその影響により僅かに疎水的になり、自己組織化が阻害されると考えられる。しかしその影響にも関わらず、自己組織化ペプチド RADA16 は CPL との共存においてもネットワーク形成が阻害されることなく、力学強度向上や膨

潤度低下など IPN 形成が明確に観察されたことから、本戦略においても IPN 構造を形成することが示唆された。

ペプチドの  $\beta$ -sheet 構造は包埋する細胞に対し、増殖・分化促進など、優れた細胞生息環境を提供する。<sup>8-12</sup> そこで、ゲル内  $\beta$ -sheet 構造の形成を観察するため CD スペクトル測定を行った。RADA16 の  $\beta$ -sheet 構造は、220 nm において負のコットン効果を示す。<sup>8-10</sup> CPLR における負のコットン効果は、先行の CPR と比較し同等のスペクトル強度が観察され、CPL との差スペクトルにおいても RADA16 のみの CD スペクトルと類似していたことから、CPLR における  $\beta$ -sheet 構造はゲル内で安定に保持されていることが示唆された(図 5-5a,b)。加えて、ウシ膝軟骨細胞を包埋し測定した CD スペクトルも同様に、220 nm における負のコットン効果は CPR と比較しても遜色なく観察され、それら差スペクトルも単独の RADA16 のスペクトルと類似していた(図 5-5c,d)。これらの結果は、上述のゲル化メカニズム測定、力学強度測定において考察された双方のネットワークが互いに相互作用しない IPN の形成を強く支持する。

分解性架橋剤を用い作成した IPN ゲルの分解挙動を確認するため、ゲルに PBS (150 mM, pH:7.4) を浸漬させ 37 °C に静置した際の、初期乾燥重量と経過時間毎の重量減少割合を算出した(図 5-6)。CPLR のゲル分解は、PLA を含まない CPR と比較し 14 日以降から顕著に観察され、結果として 60 日経過後に CPLR においては約 32%、CPR においては約 10% の重量減少が観察された(図 5-6a)。また、60 日経過後の力学強度減少割合は、CPR においては約 10% の強度減少が観察され、CPLR において約 40% の強度減少が観察されたことから、ゲルネットワーク密度の減少を示唆する(図 5-6b)。ここで、CPR でも 10% 程度の重量損失や力学強度減少が観察されているが、これは未架橋分のゲル前駆体の流出を示しており、ゲルの分解を示唆するものではないと考えられる。

実際、ゲルの内部構造を SEM を用いて観察すると、経時的な空隙の増大が CPLR において観察された(図 5-6c)。CPLR は PLA のエステル加水分解に基づきネットワークが分解するため、<sup>13-15</sup> 単独のネットワークでは構造維持能力に乏しい RADA16 も同時に崩壊するはずである。実際、分解に伴い 220 nm における負のコットン効果が減少したことから、RADA16 の  $\beta$ -sheet 構造もゲル分解に伴い崩壊することが示唆された(図 5-7)。従って、PLA のエステル加水分解に基づき分解する IPN ゲルの作成を実証した。

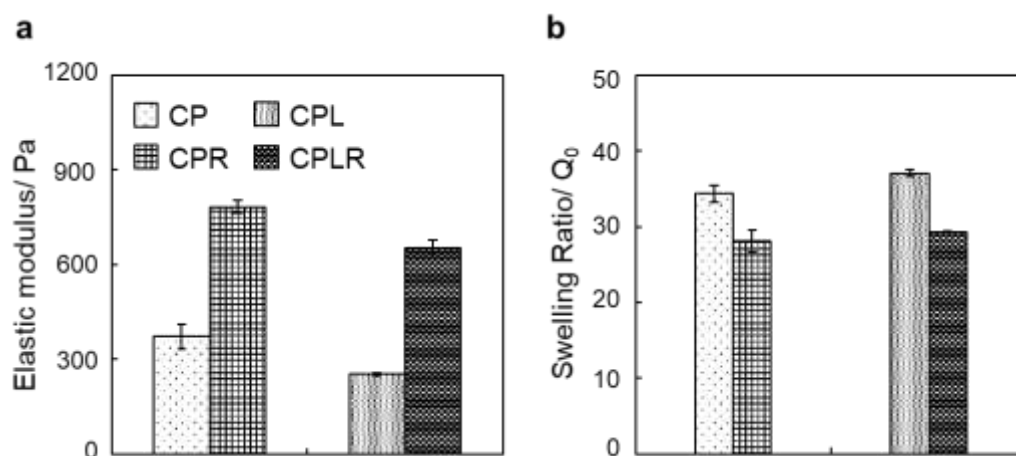


図 5-4. IPN 物性評価. (a) ヤング率. (b) 膨潤度. (n=2)

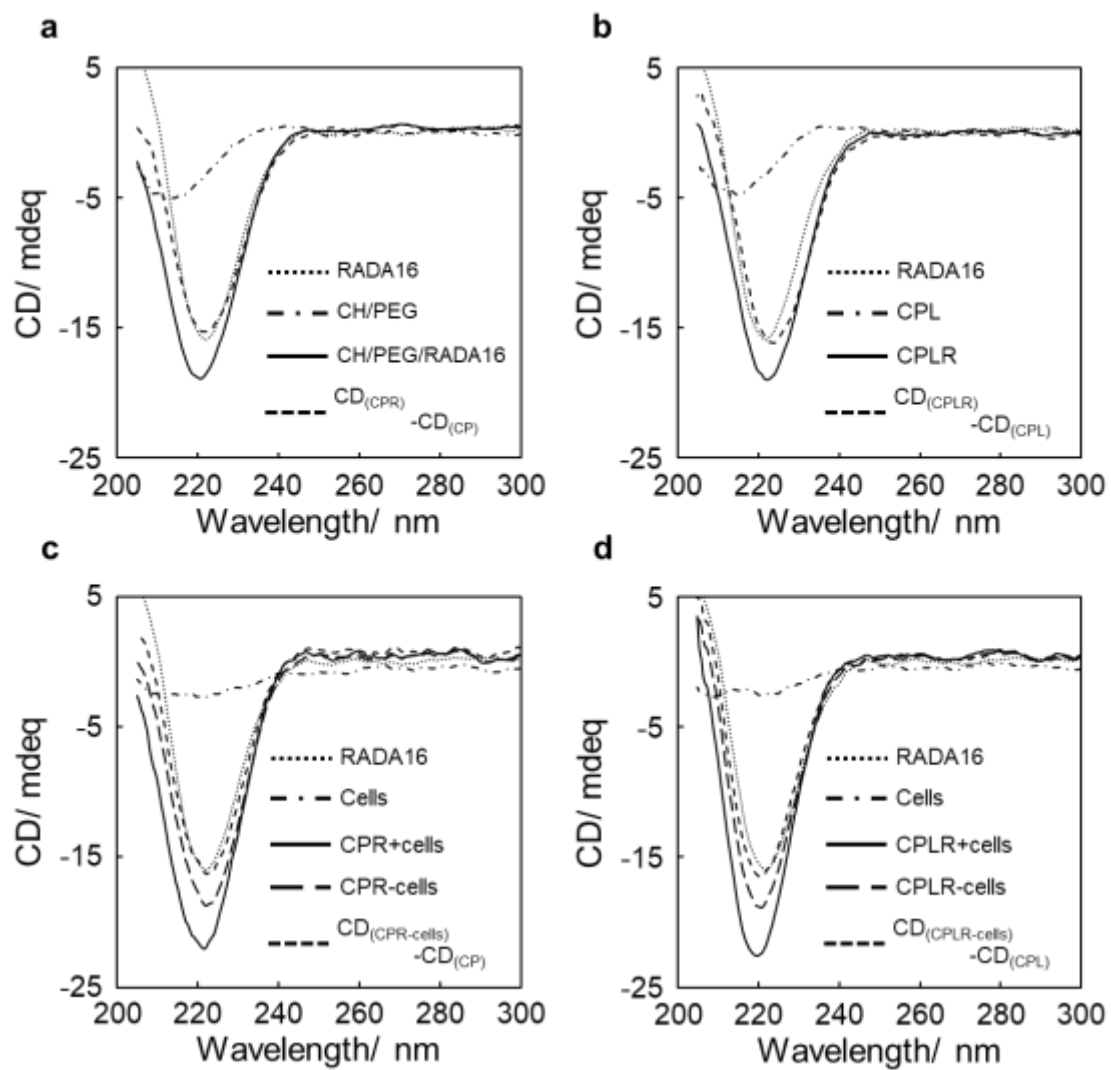


図 5-5. ゲル内  $\beta$ -sheet 保持性評価. (a) CPR (b) CPLR (c) CPR+cells (d) CPLR+cells における  $\beta$ -sheet 構造形成評価.

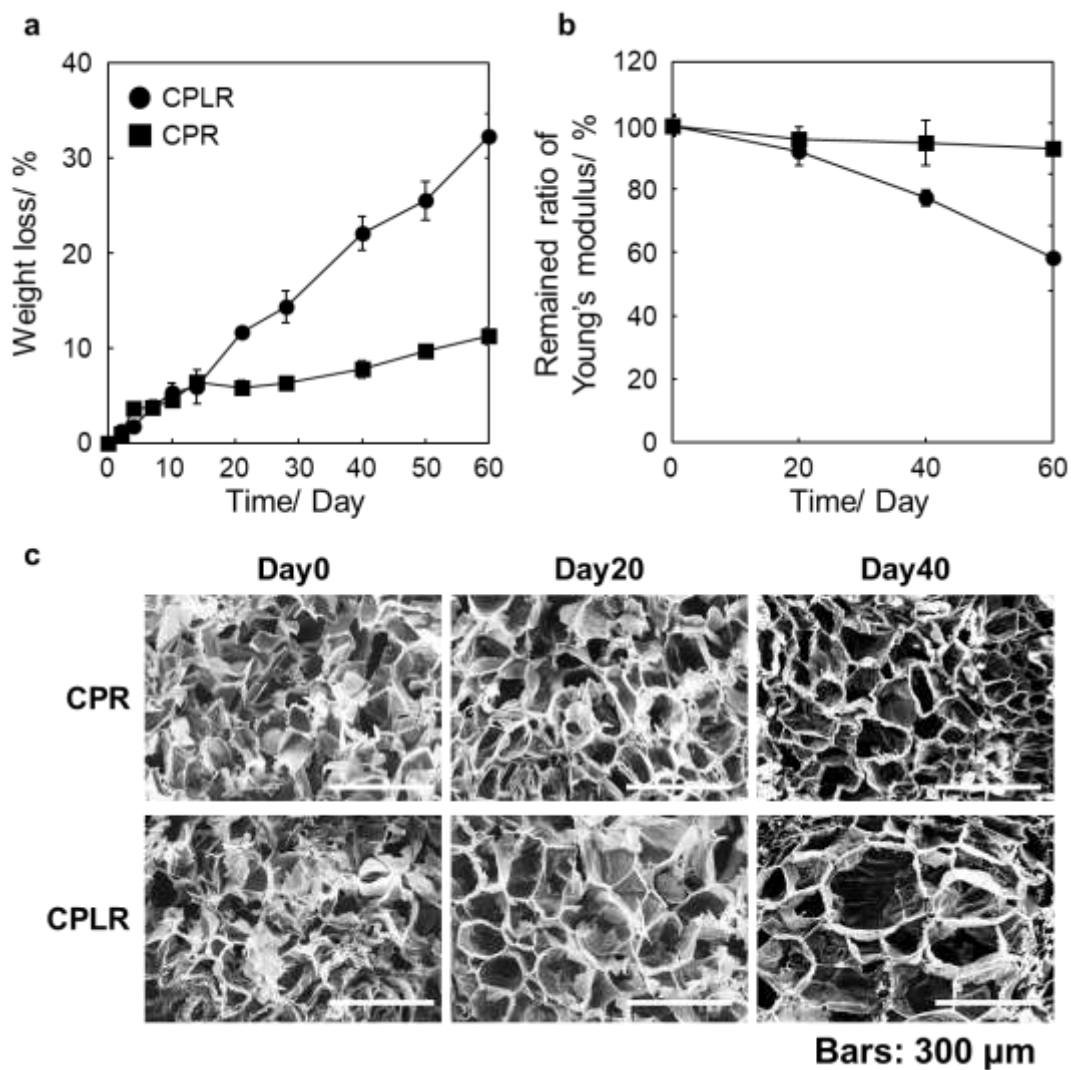


図 5-6. 分解挙動評価. (a) PBS (150 mM, pH:7.4) 浸漬下における分解挙動. (b) 力学強度減少割合. (n=2) (c) ゲルの内部構造評価.

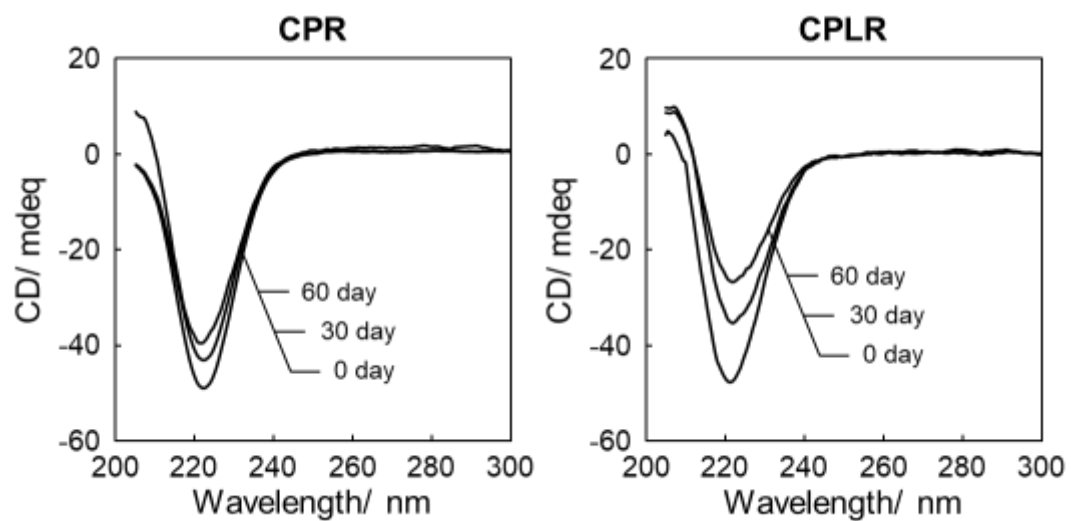


図 5-7. 経時的なゲル内  $\beta$ -sheet 性評価.

### 5.3.3 ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能評価

CPLR の細胞足場としての機能の評価するため、ゲル内にウシ膝軟骨細胞を包埋し培養した際の細胞機能の評価した。細胞のゲル内包埋には、4 wt% の CH 溶液に対しウシ膝軟骨細胞( $5.0 \times 10^5$  cells)を懸濁させた後、上述したゲル作成操作と同様の手法で細胞包埋ゲルを作成した。共焦点レーザー顕微鏡観察により細胞包埋後におけるゲル内の細胞生存性を評価したところ、双方のゲルにおいて死細胞よりも生細胞が多く観察されたことから、分解性 IPN ゲルへの細胞埋過程は生体適合性に優れていることが示唆された(図 5-8)。同様に、細胞核を hoechst33342、f-actin を alexa fluor™ 594 phalloidin で染色し観察したところ、ゲル内細胞の均一分散が確認されたことから、組織再生に有効に機能することが示唆された(図 5-8)。

図 5-9 に、ゲル内にウシ膝軟骨細胞を培養した際の細胞分散挙動、及び細胞形態を示す。全培養期間においてゲル内細胞は、双方のゲルにおいて球状、または楕円形を保持していたことから(図 5-9)、関節軟骨分化性、つまり繊維軟骨ではなく硝子軟骨への分化能に優れていることが示唆された。一般的に、軟骨細胞を二次元平面プレートで培養すると、その形状は繊維状を帯び結果として力学的に弱い軟骨である繊維軟骨へと分化していく。<sup>16,17</sup> 一方でハイドロゲルなどの三次元足場材料に細胞を包埋すると細胞は球形態をとり、硝子軟骨へと優先的に誘導される。<sup>17</sup> 従って、本システムにおいても細胞の球形態が一貫して観察されたことから、関節軟骨組織再生足場として有効に機能することが示唆される。

ウシ膝軟骨細胞機能の評価するため、ゲル内に包埋し培養した細胞の機能を、DMMB assay による sGAG 定量、hydroxyproline assay による COL 定量により評価した。上述のように軟骨組織は柔軟性に寄与する sGAG、剛直性に寄与する数種の COL により構成されており、これらタンパク質産生量は足場材料の軟骨組織形成性に直結し、その産生量を増加させることは軟骨組織再生足場として十分に機能するための重要な特徴の一つである。ゲル内に蓄積した sGAG、及び COL 産生量は、分解性 IPN ゲルにおいて非分解性 IPN ゲルと比較し、ゲル分解が顕著に進行する培養 30 日以降有意に向上し、培地中に放出されたこれらのタンパク質も同様な挙動が観察された(図 5-11)。以上の結果は、IPN ゲルに分解性を付与することで、包埋したウシ膝軟骨細胞の軟骨形成能力向上を示唆する。前述したように、ゲル内に包埋した細胞の細胞機能は、多孔性、空隙率など、内部構造に強く依存し、特にゲル内部の空間的な大きさが、蓄積可能な ECM 量を左右する。<sup>18-21</sup> 本システムにおいては、架橋剤の PLA 部位に由来するエステル加水分解によりゲル分解が進行し、図 5-6 に示すように非分解性ゲルと比較し内部空間がより大きくなる。加え、そのゲル分解と同時に RADA16 も流出するが、一部の RADA16 はゲル内に残存し  $\beta$ -sheet 構造を保持する。従って、本分解性 IPN ゲルにおいては、ゲル分解と  $\beta$ -sheet によるゲル内細胞への相乗的な軟骨形成能向上の両者が働くため非分解性ゲルと比較し、包埋するウシ膝軟骨細胞の軟骨組織形成能力を増大させたと考えられる。

さらに詳細に代表的な軟骨タンパク質である sGAG を可視化しゲル内蓄積を確認するため、培養 40 日において組織学的評価を行った(図 5-12)。包埋したウシ膝軟骨細胞を H&E により染色し観察したところ、分解性 IPN ゲルでは硝子軟骨組織において観察される二核のウシ膝軟骨細胞が観察された。<sup>20</sup> さらに sGAG 蓄積は、双方のゲルにおいて細胞周辺に強く観察されたが、分解性

IPN ゲルでは非分解性ゲルと比較し、ゲル全体に蓄積が強く観察された。これらの結果は、上述した空間的なネットワークの大きさが、ECM 蓄積を有意に促進することを強く実証している。

最後に、培養したウシ膝軟骨細胞の細胞機能をさらに詳細に観察するため、RT-PCR を用いた軟骨特有遺伝子の発現を評価した(図 5-13)。軟骨組織にはアグリカンとコラーゲン分子が豊富に存在し、関節軟骨にはII 型コラーゲン、繊維軟骨にはI 型コラーゲンが多く観察される。<sup>21</sup> 従って、関節軟骨組織再生のためには、包埋する細胞のアグリカン遺伝子とII 型コラーゲン遺伝子の発現を向上させ、I 型コラーゲン遺伝子の発現を抑制させることが望ましい。培養 20 日における *ACAN* 発現量は、双方のゲルにおいて初期のウシ膝軟骨細胞と比較し有意に向上したが、それらの値は同等であった。この結果は、ゲルに包埋することで軟骨組織形成性を有意に促すことを示唆する。さらに培養 40 日における発現量は、非分解性ゲルと比較し約 1.3 倍向上した。これらの結果は、前述の sGAG 産生量の定量結果と相関している。さらに *COL2A1* 発現量も *ACAN* と同様な挙動が観察され、本分解性足場材料は軟骨形成に有意に働くことを示唆する。一方で、*COL1A1* 発現量は、双方のゲルにおいて初期のウシ膝軟骨細胞と比較し低下したことから、三次元培養における優位性を確認している。さらに培養 20 日、40 日における遺伝子発現量は、分解性 IPN ゲルにおいて約 2 倍低下した。結果として、*COL2A1/COL1A1* は、分解性 CPLR において約 2 倍有意に向上した。これらの結果は、ゲルに分解性と RADA16 に由来する微細ネットワークとの相乗特性を付与することで軟骨組織再生に特に重要な COL 産生を向上させ、結果として硝子軟骨への優先的な分化を促進することを強く示唆する。

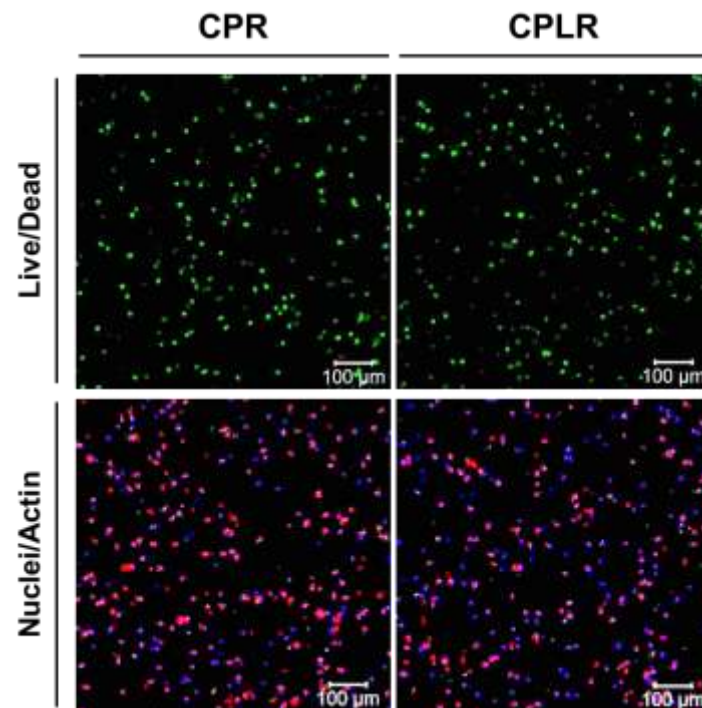


図 5-8. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞包埋後におけるゲル内細胞生存率評価と細胞形態評価. 生細胞: Calcein-AM (緑)/死細胞: Ethidium homodimer-1 (Et1), 細胞核: hoechst33342 (青)/f-actin: alexa fluor<sup>TM</sup> 594 phalloidin (赤). Scale bar: 100  $\mu$ m.

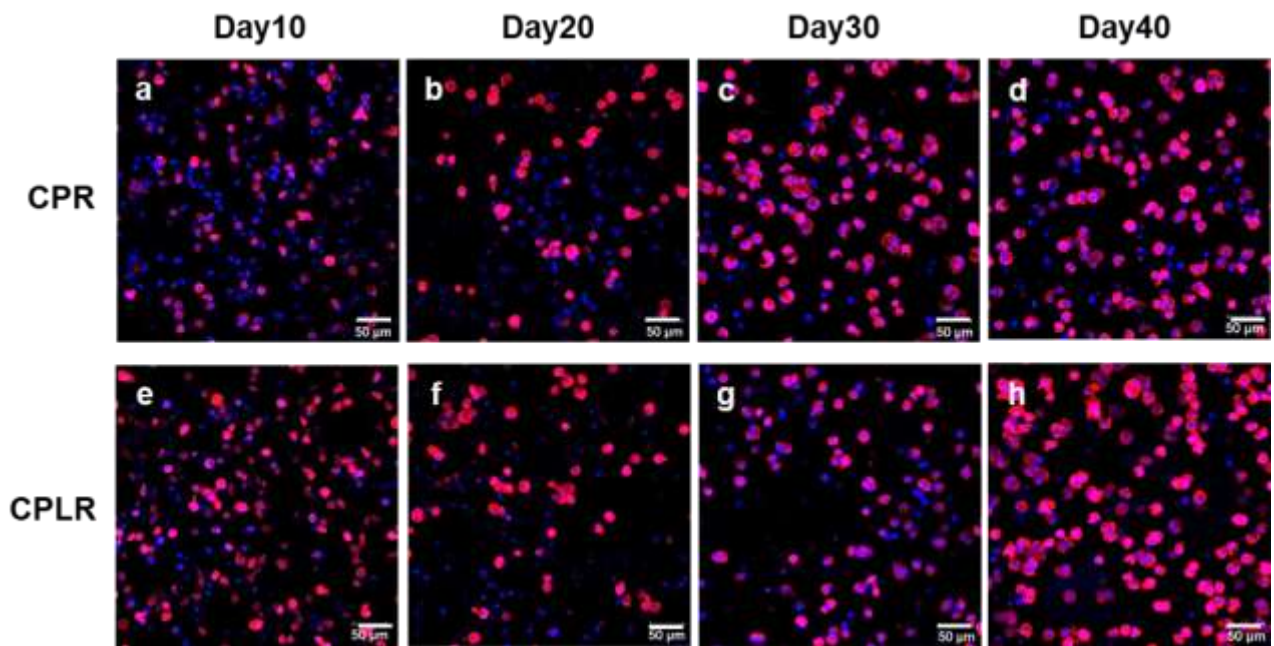


図 5-9. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた経時的な細胞形態観察. 細胞核: hoechst33342 (青)/f-actin: alexa fluor<sup>TM</sup> 594 phalloidin (赤). Scale bar: 100 μm.

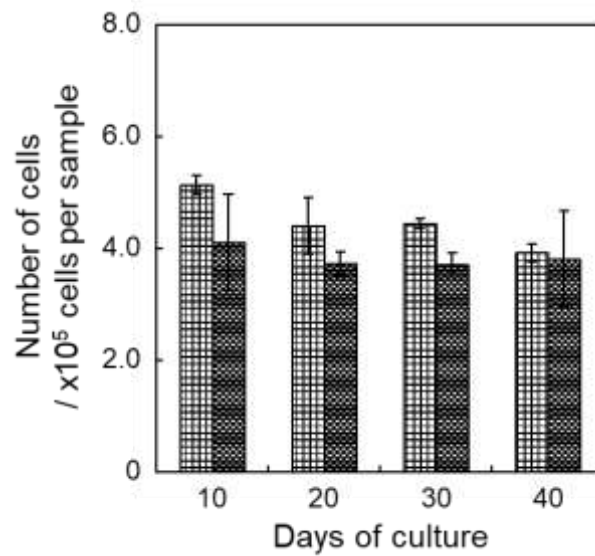


図 5-10. ゲル内細胞数. (n=3)



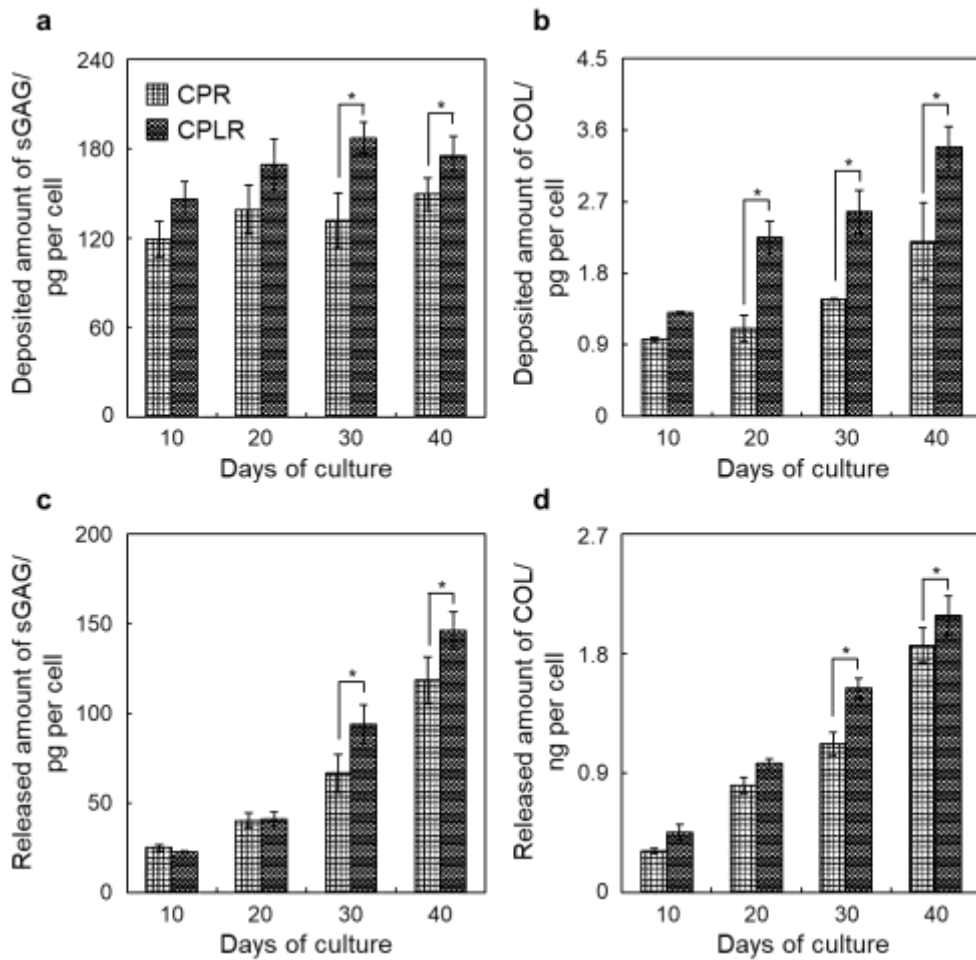


図5-11. ゲル内培養細胞機能. (a) 蓄積された sGAG 量, (b) 蓄積された COL 量, (c) 放出した sGAG 量, (d) 放出した COL 量. (n = 3, \*p < 0.05 (Student's *t*-test))

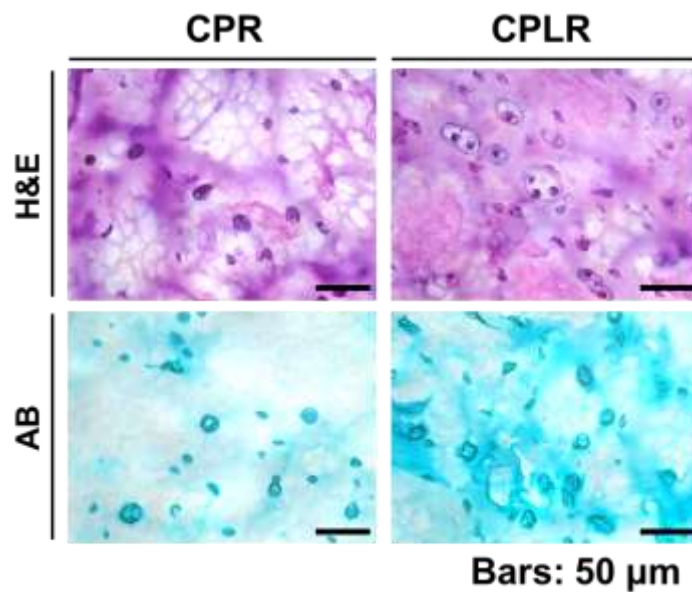


図 5-12. 培養 40 日における組織学的評価.

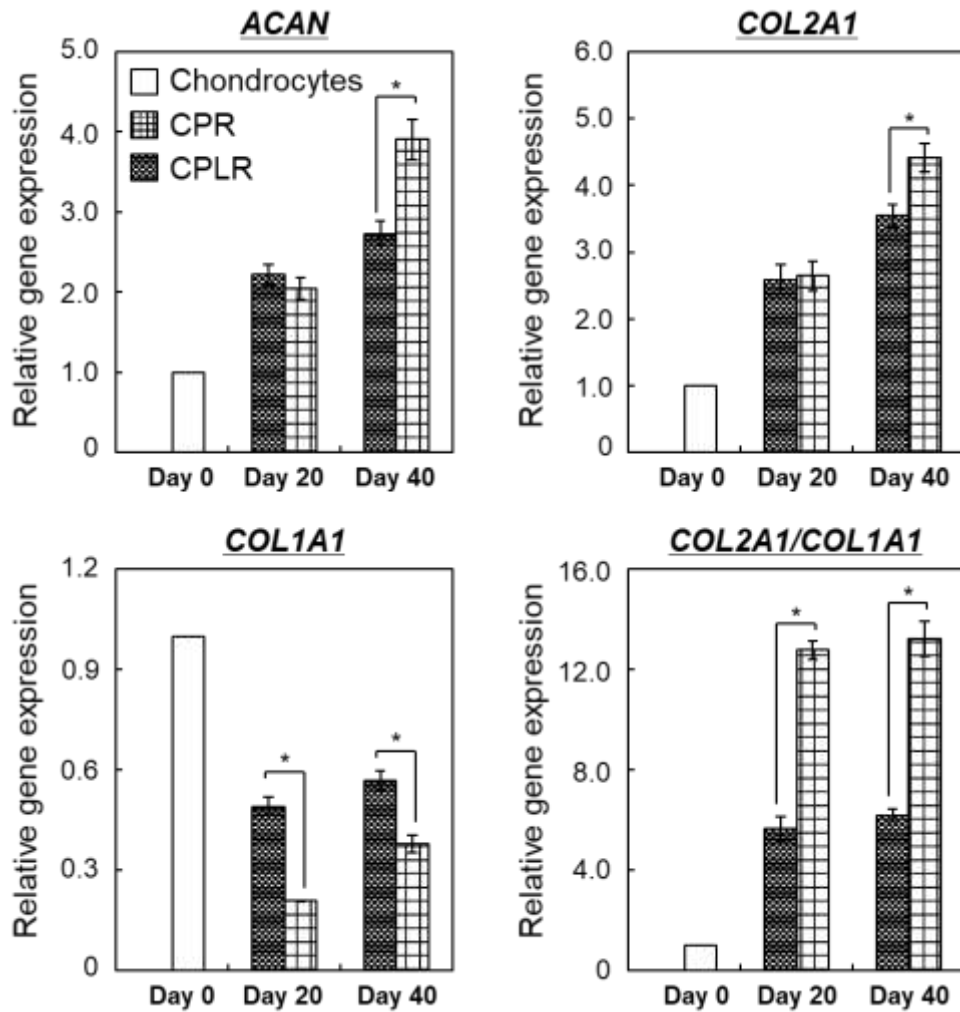


図 5-13. ウシ膝軟骨細胞ゲル内培養後の mRNA 発現量. (a) Aggrecan (*ACAN*) 遺伝子, (b) II 型コラーゲン遺伝子(*COL2A1*), (c) I 型コラーゲン遺伝子(*COL1A1*) (d) *COL2A1/COL1A1* 比. 各遺伝子発現量を *GAPDH* にて規格化した後、Day 0 におけるウシ膝軟骨細胞から抽出した遺伝子発現量との相対比を示している。(n = 3, \*p < 0.05 (Student's *t*-test))

## 5.4 結論

本章では、第3章で確立した分解性架橋剤 STDC を用いた CH を主骨格とする分解性インジェクタブルゲル形成メカニズムと第4章で確立したゲル化メカニズムとゲル化速度の違いに基づく IPN 形成システムとを複合することで、RADA16、CH、STDC から構成される分解性インジェクタブル IPN ゲルを作成した。三成分を混合し動的粘弾性測定により貯蔵弾性率  $G'$  の時間依存的な変化を観察すると、 $G'$  は多段階的に変化し、さらにそれらの変曲点は RADA16、及び CPL のゲル化点と一致したことから、先行の IPN ゲルと同様に、三成分を混合するだけで時限的にネットワークを形成する IPN ゲルの作成を確認した。形成したゲルの力学強度測定により、RADA16 非混合系と比較し力学強度の向上が観察され、さらに CD スペクトル測定により、ゲル内で RADA16 の  $\beta$ -sheet 構造形成に由来する負のコットン効果が観察されたことから、本材料選択においても双方のネットワーク形成を阻害せず、各々のネットワーク特性を十分に発揮可能な IPN ゲル形成を確認した。さらに分解挙動評価により、作成した IPN ゲルにおいて非分解性のゲルと比較し、顕著な分解挙動が観察されたことから、架橋剤の PLA エステル加水分解に由来し分解する分解性インジェクタブル IPN ゲルの形成を確認した。これらゲルにウシ膝軟骨細胞を包埋し培養した後、各種評価により細胞機能を評価すると、軟骨組織の大部分を占める sGAG、及び COL 産生量が、非分解性ゲルと比較し向上し、さらに遺伝子発現評価においても、アグリカン遺伝子 (ACAN)、及び II 型コラーゲン遺伝子 (COL2A1) 発現量が向上し、I 型コラーゲン (COL1A1) 遺伝子発現量が低下したことから、関節軟骨の主成分である硝子軟骨への組織形成能力に優れていることが示唆された。これらの結果は、分解特性によるネットワーク増大効果と、RADA16 の繊維性による相乗効果に起因するものである。以上の結果より、光照射による従来の分解性 IPN ゲル合成手法では適わない、混合するだけで作成可能な分解性 IPN ゲルの作成技術を確認した。本材料が低侵襲かつ効率的に関節軟骨組織を再生する足場作成手法として用いられることを期待する。

## 参考文献

1. Choi, B.; Kim, S.; Lin, B.; Wu, B. M.; Lee, M. Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 20110-201021.
2. Ishikawa, S.; Matsukuma, D.; Iijima, K.; Iijima, M.; Osawa, S.; Otsuka, H. *N*-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 5759-5769.
3. Ingavle, G. C.; Dormer, N. H.; Gehrke, S. H.; Detamore, M. S. Using Chondroitin Sulfate to Improve the Viability and Biosynthesis of Chondrocytes Encapsulated in Interpenetrating Network (IPN) Hydrogels of Agarose and Poly(ethylene glycol) Diacrylate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 157-170.
4. de Lima, G. G.; Elter, J. K.; Chee, B. S.; Magalhães, W. L. E.; Devine, D. M.; Nugent, M. J. D.; de Sá, M. J. C. A Tough and Novel Dual-Response PAA/P(NiPAAM-co-PEGDMA) IPN Hydrogels with Ceramics by Photopolymerization for Consolidation of Bone Fragments Following Fracture. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*, 054101.
5. Wang, J.; Wei, J. Interpenetrating Network Hydrogels with High Strength and Transparency for Potential Use as External Dressings. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *80*, 460-467.
6. Zhang, J.; Wang, J.; Zhang, H.; Lin, J.; Ge, Z.; Zou, X. Macroporous Interpenetrating Network of Polyethylene Glycol (PEG) and Gelatin for Cartilage Regeneration. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*, 035014.
7. Tsaryk, R.; Gloria, A.; Russo, T.; Anspach, L.; De Santis, R.; Ghanaati, S.; Unger, R. E.; Ambrosio, L.; Kirkpatrick, C. J. Collagen-Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Semi-Interpenetrating Network Loaded with Gelatin Microspheres for Cell and Growth Factor Delivery for Nucleus Pulposus Regeneration. *Acta Biomater.* **2015**, *20*, 10-21.
8. Yokoi, H.; Kinoshita, T.; Zhang, S. Dynamic Reassembly of Peptide RADA16 Nanofiber Scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, *102*, 8414-8419.
9. Gelain, F.; Bottai, D.; Vescovi, A.; Zhang, S. Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Cultures. *PLoS One* **2006**, *1*, e119.
10. Cormier, A. R.; Pang, X.; Zimmerman, M. I.; Zhou, H. X.; Paravastu, A. K. Molecular Structure of RADA16-I Designer Self-assembling Peptide Nanofibers. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7562-7572.
11. Wang, T. W.; Chang, K. C.; Chen, L. H.; Liao, S. Y.; Yeh, C. W.; Chuang, Y. J. Effects of An Injectable Functionalized Self-Assembling Nanopeptide Hydrogel on Angiogenesis and Neurogenesis for Regeneration of the Central Nervous System. *Nanoscale* **2017**, *9*, 16281-16292.
12. Yang, H.; Hong, N.; Liu, H.; Wang, J.; Li, Y.; Wu, S. Differentiated Adipose-Derived Stem Cell Cocultures for Bone Regeneration in RADA16-I in vitro. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 9458-9472.
13. Pan, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) Porous Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Interface Focus.* **2012**, *2*, 366-377.
14. Li, W. J.; Laurencin, C. T.; Caterson, E. J.; Tuan, R. S.; Ko, F. K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 613-621.

15. Lü, J. M.; Wang, X.; Marin-Muller, C.; Wang, H.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2009**, *9*, 325-41.
16. Toh, W. S.; Spector, M.; Lee, E. H.; Cao, T. Biomaterial-mediated Delivery of Microenvironmental Cues for Repair and Regeneration of Articular Cartilage. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 994-1001.
17. Han, L.; Wang, M.; Li, P.; Gan, D.; Yan, L.; Xu, J.; Wang, K.; Fang, L.; Chan, C. W.; Zhang, H.; Yuan, H.; Lu, X. Mussel-Inspired Tissue-Adhesive Hydrogel Based on the Polydopamine-Chondroitin Sulfate Complex for Growth-Factor-Free Cartilage Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2018**, *10*, 28015-28026.
18. Nicodemus, G. D.; Bryant, S. J. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2008**, *14*, 149-165.
19. Zustiak, S. P.; Leach, J. B. Hydrolytically Degradable Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Scaffolds with Tunable Degradation and Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 1348-1357.
20. Kong, H. J.; Smith, M. K. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials*, 2003, **24**, 4023-4029.
21. Armiento, A. R.; Alini, M.; Stoddart, M. J. Articular Fibrocartilage - Why does Hyaline Cartilage Fail to Repair? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *146*, 289-305.

## 第 6 章

### 総括

## 6.1 本論文の総括

本研究では、関節軟骨組織再生のため必須となる低侵襲性技術を用い、細胞源確保と軟骨細胞と共に生体内に注入可能な足場材料設計に際し、SNFs 中での MSC の軟骨分化と *in-situ* 型のインジェクタブルゲル作成を目的とし研究を行った。具体的には、第一に日本バイリン(株)より購入した SNFs を用い、MSC の軟骨細胞分化機能を評価することで関節軟骨再生のための細胞源を設計した。第二に生体内での応用に目を向け、RADA16、CH、NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を用い、生体内でも低侵襲に組織再生足場を作成可能かつ、その材料中で効率的に軟骨組織を再生可能な分解性インジェクタブル IPN ゲルを合成することで、足場材料設計のための指針を提供した。

第2章では、生体内環境の三次元ネットワークを再現する SNFs の MSC からの軟骨分化機能に関する研究について記述した。足場材料の設計に不可欠な物質透過性を、FITC-dextran を用いた SNFs の透過試験により評価したところ、SNFs の物質透過は、栄養素や酸素などの因子を十分に透過可能な特性を有し、分化培地などに含まれる成長因子の浸透を阻害することなく、SNFs 中に培養する MSC の分化を十分に促すことが示唆された。さらにその内部構造を SEM により観察したところ、ファイバーネットワークが相互侵入する均一な三次元構造を有していたため、細胞の三次元伸展に不足なく機能することも示唆された。また、SNFs に MSC を播種し培養すると、二次元平面培養では接触阻害を誘発し細胞増殖が阻害された一方、SNFs では指数関数的な細胞増殖挙動が観察されたことから、MSC は SNFs 内で伸展し増殖したと考えられる。実際に、SNFs 内の MSC の細胞伸展挙動を共焦点レーザー顕微鏡により観察すると、培養につれ MSC は分化因子の有無に依らず三次元的に伸展する挙動が観察された。従って本足場材料は、細胞が異方的に伸展するような生体内と類似した細胞挙動を誘発可能であり、SNFs の構造によるその挙動が、組織再生効率を高めることが期待される。軟骨分化培地を用い MSC を SNFs 中で培養すると、関節軟骨細胞への選択的な分化が観察された。臨床実績のあるアテロコラーゲンゲルの炎症惹起性や収縮性を鑑みると、<sup>1,2</sup>SNFs 中での MSC の関節軟骨細胞分化は安全にかつ安定に達成されると期待される。従って SNFs の構造特性が、組織再生に重要な因子である細胞-細胞間相互作用や、細胞-ECM 相互作用を促し、MSC からの軟骨細胞分化を誘導することが示唆された。以上の結果より、関節軟骨再生のための細胞供給源として SNFs は有効な材料であることが示唆された。

第3章では、生体内で直接軟骨組織の代替を設計可能な技術に着目し、*in-situ* 型分解性インジェクタブルゲルの作成を検討した。本設計として、バイオマテリアルとして幅広く使用される CH と、生体適合性に優れた材料であり FDA にも承認されている PEG と PLA から成る分解性架橋剤の二成分を用い、それらを混合することで作成される分解性インジェクタブルゲルに関する研究について述べた。分解性架橋剤は、THP-PEG-OH を開始剤とする DL-lactide の開環重合と、引き続き adipoyl chloride を用いた高分子末端同士の縮合反応によりトリブロックな高分子を作成し、それらを機能化するため THP の脱保護と NHS の末端機能化により分解性架橋剤(NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS)を作成した。作成した分解性架橋剤と CH との混合により、PLA を含まない非分解性架橋剤(NHS-PEG-NHS)と遜色ないゲル化が確認され、そのゲル分解は、非分解性架橋剤を用い作成したゲルと比較し有意に観察されたことから、CH を主骨格とする分解性インジェクタブルゲルの作成を確認した。実際、ゲル内部のネットワーク構造を SEM により観察したところゲル分解に伴い網目サイズが増大したことから、包埋する細胞の活性化を導きさらに、産生するタンパク質は

分解性ゲル中でより多く蓄積することが示唆された。ウシ膝軟骨細胞を包埋し培養するとその機能は、sGAG、COL の双方のタンパク産生量が促進され、遺伝子産生量も硝子軟骨形成を支持したことから、NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を用い作成した分解性インジェクタブルゲルは有意に軟骨形成を促進することを実証した。

第4章では、自己組織化ペプチドとの複合化による細胞機能向上を目指し、IPN インジェクタブルゲルの合成に関する研究について記述した。本 IPN ゲルを作成するに当たり、ゲルネットワークの形成駆動力、形成速度に着目し材料選択を行ったところ、生理条件下に暴露すると水素結合や疎水性相互作用により迅速に微細ネットワークを形成する RADA16 の物理架橋ネットワークと、CH のアミノ基との縮合反応性を示す両末端架橋剤(NHS-PEG-NHS) との化学架橋ネットワークを組み合わせたゲルを作成することを着想した。各ネットワーク単独のゲル化メカニズム評価、及び動的粘弾性装置を用いそれら構成物を同時混合した際のゲル化速度評価により、3種のゲル前駆体を混合すると第一に RADA16 の自己組織化ネットワークが形成され、第二に CH と PEG の化学架橋ネットワークが独立に相互作用すること無く形成されることを見出した。ゲルに包埋したウシ膝軟骨細胞の機能に関しては、軟骨組織形成タンパク質である sGAG 及び COL のタンパク産生量の増大と硝子軟骨形成性遺伝子である *ACAN*、*COL2A1* の発現量の向上が観察されたことから、本材料は優れた軟骨組織再生足場となることが実証された。

第5章では、第3章で作成した分解性架橋剤と第4章の材料設計戦略を組み合わせた、分解性インジェクタブル IPN ゲルの合成に関する研究について記述した。分解性架橋剤を用い自己組織化ペプチド RADA16 と CH との混合により設計されるゲルは、第4章で観察された多段階的なネットワーク形成と同様な挙動が観察されたことから、本系においても RADA16 の迅速なネットワーク形成と引き続く CH/PEG-PLA-PEG ネットワーク形成が独立に相互作用すること無く形成されることを見出した。ゲルの分解も非分解性の NHS-PEG-NHS を用いた非分解性 IPN ゲルと比較し有意に観察されたことから、分解性インジェクタブル IPN ゲルの作成を確認した。その分解に伴いゲル網目が増大し、さらにゲル内の RADA16 に由来する負のコットン効果も減少したことから、ゲル分解と RADA16 の微細構造による包埋細胞への共刺激が期待される。実際に、包埋したウシ膝軟骨細胞の機能は、非分解性 IPN ゲルと比較し、硝子軟骨形成性のタンパク質産生及び、遺伝子発現性が確認されたことから、分解性 IPN インジェクタブルゲルの有効性が実証された。

以上、第2章で生体外での応用、第3章、第4章、第5章で生体内での応用を志向とし、多段階的な研究戦略によって提案された本研究は、細胞供給源の確保や組織再生のための新たな材料設計指針を提供することが期待される。

1. Nagai, N.; Mori, K.; Satoh, Y.; Takahashi, N.; Yunoki, S.; Tajima, K.; Munekata, M.; In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3201-3212.
2. Charriere, G.; Bejot, M.; Schnitzler, L.; Ville, G.; Hartmann, D. J. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. *J. Am. Acad. Dermatol* **1989**, *21*, 1203-1208.



## 6.2 今後の展望

本研究では、「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」と題し、関節軟骨組織再生に向けた細胞足場材料の開発を行った。近年、iPS 細胞 を主導とし、疾患・欠陥組織の再生ため多種多様な再生医療材料が人々の QOL を高めるべく開発され、それらを用いた臨床試験も行われつつある。例えば、加齢黄斑変性や角膜上皮幹細胞疲弊症などの難治性疾患に対し、iPS 細胞と岡野教授らが開発した温度応答性の細胞シートとの組み合わせにより作成された代替材料の世界初の移植実験が日本で試みられ、炎症反応や拒絶反応なく元の機能を取り戻すことに成功している。日本においては現在まで、医療機器として保険適用され上市されている再生医療製品は、株式会社ジャパンティッシュエンジニアリングの自家培養皮膚(ジェイス)、自家培養軟骨(ジャック)、JCR ファーマ株式会社のヒト骨髄由来間葉系幹細胞(テムセル HS 注)、テルモ株式会社のヒト骨格筋由来細胞シート(ハートシート) の計 4 種に止まり、これほど再生医療に関する研究が数々行われているにも関わらず、未だにその適用数は増えない。この原因は恐らく安全性や望むほどの治療効果が得られない点、さらには材料合成や適用法の複雑性にあると私は考える。このように、組織工学の 3 要素のうち細胞に関する研究は十分に行われているが、成長因子や足場材料に関する研究は未だに発展途上にある。生体内に足場材料を移植した後には外部からの栄養補給は止まるため、包埋した細胞の活性を促し組織形成するよう成長因子の利用が不可欠となるが、足場材料に添加した際にその活性が損なわれてしまうことが多々あり、未だに有効な利用法は提案されていないことが、現状での成長因子に関する問題点であると私は考える。しかしながら、本研究により提案した足場材料は単純に成分を混合するだけで、生体内を再現したネットワーク構造を作成可能であり、その形成にも毒性を与えるような外部刺激を経由しないことから、成長因子の包埋も活性を損なうことなく達成され、生体内への移植や効率的な組織再生も簡便に実現すると予想される。さらに足場材料作成のため用いる原料は、バイオマテリアルとして幅広く応用されている CH、FDA にも認証されている PEG や PLA からなる簡便な構造の架橋剤、さらには合成ペプチドから成るため、原料としても単純成分であり、それら成分を簡便に混ぜるだけで作成可能なため、複雑な材料合成や処置法を伴うことなく、医療従事者も簡便に扱うことが可能であると推測する。以上のように、本研究にて提案した細胞源の確保と移植材料の設計は、組織工学の 3 要素を十分に満たす研究戦略であり、今後の再生医療への展開に有望な基盤技術を確立するものと考えられる。

# 研究業績

## 論文

1. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Kohei Sasaki, Mineo Hashizume, Masaaki Kawabe, and Hidenori Otsuka. Cartilage Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Silica Nonwoven Fabrics. *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 1398. DOI: 10.3390/app8081398.
2. Kazutoshi Iijima, **Shohei Ishikawa**, Kohei Sasaki, Mineo Hashizume, Masaaki Kawabe, and Hidenori Otsuka. Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Electrospun Silica Nonwoven Fabrics. *ACS Omega*, **2018**, *3*, 10180-10187. DOI: 10.1021/acsomega.8b01139.
3. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Kohei Sasaki, Masaaki Kawabe, and Hidenori Otsuka. Improvement of Hepatic Functions by Spheroid Formation and Culture with Fibroblasts in 3D Silica Nonwoven Fabrics. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 3326-3333. DOI: 10.1166/jnn.2019.16103.
4. Kazutoshi Iijima, Seiko Ichikawa, **Shohei Ishikawa**, Daisuke Matsukuma, Yusuke Yataka, Hidenori Otsuka, and Mineo Hashizume. Preparation of Cell-Paved and -Incorporated Polysaccharide Hollow Fibers Using a Microfluidic Device. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 5688-5697. DOI: 10.1021/acsbomaterials.8b01500.
5. **Shohei Ishikawa**, Daisuke Matsukuma, Kazutoshi Iijima, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa, and Hidenori Otsuka. *N*-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 5759-5769. DOI: 10.1021/acsbomaterials.9b00218.
6. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Daisuke Matsukuma, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa, and Hidenori Otsuka. Enhanced Function of Chondrocytes in a Chitosan-based Hydrogel to Regenerate Cartilage Tissues by Accelerating Degradability of the Hydrogel via a Hydrolysable Cross-Linker. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *137*, 48893. DOI: 10.1002/app.48893.
7. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Kohei Sasaki, Masaaki Kawabe, Shigehito Osawa and Hidenori Otsuka. Silica-based Nonwoven Fiber Fabricated by Electrospinning to Promote Fibroblast Functions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* DOI: 10.1246/bcsj.20190318.

## 著書

1. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Yuta Yahagi, and Hidenori Otsuka. Fabrication of Stimuli-Triggered Polypeptide-Based Hybrid Biomaterials for Biomedical Application. *Advances in Chemistry Research*, Volume 45 (Ed. Stella Rosa), Nova Science Publishers, 77-108, 2018.
2. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, and Hidenori Otsuka. Nanotechnology for three-dimensional cell and tissue culture to mimic body-function. *Micro- and Nanotechnologies in Biomedical Engineering* (Ed. Alexandru Mihai Grumezescu), Elsevier, in press.

3. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, and Hidenori Otsuka. Nanofabrication technologies to control cell and tissue function for biomedical applications. *Nanobiomaterials Nanostructured Materials for Biomedical Applications* (Ed. Roger Narayan), Elsevier, 385-410, 2017.

## 解説

1. **石川昇平**「ペプチド繊維と糖鎖から形成される相互侵入高分子網目構造(IPN) ゲルへの生分解性付与と組織再生足場への応用」、*Colloid & Interface Communication* (依頼原稿)、公益社団法人日本化学会コロイドおよび界面化学部会、43, 41-44, 2018.
2. Kazutoshi Iijima, **Shohei Ishikawa**, and Hidenori Otsuka. Fibrous Materials in Regenerative Medicine. *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, Japan Society of Colour Material, 91, 274-277, 2018.
3. Hiro Yamaguchi, **Shohei Ishikawa**, Shigehito Osawa, and Hidenori Otsuka. Stimuli-responsive Fluorescent Nanoparticle for Efficient Intracellular Delivery. *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, Japan Society of Colour Material, 91, 404-409, 2018.

## 受賞、表彰等

1. 2015年3月 東京理科大学 優秀学生表彰(化学系) 優秀賞
2. 2016年9月 SPSJ Poster Award (第65回高分子討論会)
3. 2016年11月 優秀ポスター賞(第6回CSJ 化学フェスタ)
4. 2017年9月 若手口頭講演賞(第68回コロイド・界面化学討論会)
5. 2018年12月 IPC2018 Young Scientist Poster Award
6. 2019年10月 The support for the students/postdocs (Okinawa Colloids 2019)

## 国内学会発表

- ・査読無し-口頭発表-
1. 山口紘・**石川昇平**・大澤重仁・飯島道弘・大塚英「インシュリン様成長因子を化学固定した IPN ゲルの作製と固定化剤の長さ制御による軟骨細胞機能向上」第 69 回高分子討論会、福井大学、2019 年 9 月
  2. 大澤重仁・**石川昇平**・飯島一智・飯島 道弘・大塚英典「加水分解性リンカーを用いたハイドロゲル構築とその 分解性が誘起する軟骨細胞足場材としての機能向上」第 69 回高分子討論会、福井大学、2019 年 9 月
  3. **Shohei Ishikawa**, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. Acceleration of Articular Cartilage Regeneration in Degradable and Injectable IPN Hydrogel Containing Growth Factor. 日本化学会 第 99 回春季年会、甲南大学、2019 年 3 月

4. Kazutoshi Iijima, **Shohei Ishikawa**, Mineo Hashizume and Hidenori Otsuka. Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Electrospun Silica Nonwoven Fabrics. 第 28 回日本 MRS 年次大会、北九州国際会議場、2018 年 12 月
5. **石川昇平**・飯島一智・大澤重仁・飯島道弘・大塚英典「キトサン/PEG/RADA16 で構造化した相互侵入高分子網目ゲルへの生分解性付与と軟骨組織再生足場への応用」第 68 回高分子討論会、北海道大学、2018 年 9 月
6. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Daisuke Matsukuma, Mineo Hashizume, Michihiro. Iijima and Hidenori Otsuka. Fabrication of Biodegradable and Injectable IPN Hydrogel Consisting of Self-assembling Peptide and Chitosan. 日本化学会第 98 春季年会(2018)、慶応義塾大学、2018 年 3 月
7. 飯島一智・市川聖子・大山峻・**石川昇平**・大塚英典・橋詰峰雄「マイクロ流体技術を用いた細胞担持多糖中空ファイバーの一段階作製」つくば医工連携フォーラム 2018、産業技術総合研究所、2018 年 1 月
8. Kazutoshi Iijima, **Shohei Ishikawa**, Daisuke Matsukuma, Mineo Hashizume and Hidenori Otsuka. Regeneration of Hyaline Cartilage from Mesenchymal Stem Cells in Interpenetrating Polymer Network Gels Consisting of Chitosan, Polyethylene Glycol and Peptides. 第 27 回日本 MRS 年次大会、横浜市開港記念会館、2017 年 12 月
9. **石川昇平**・飯島一智・橋詰峰雄・飯島道弘・松隈大輔・大塚英典「ペプチドと糖鎖からなる再生組織置換型生分解性インジェクタブルゲルの創製」第 66 回高分子討論会、愛媛大学、2017 年 9 月
10. **石川昇平**・飯島一智・橋詰峰雄・飯島道弘・松隈大輔・大塚英典「ペプチド繊維と糖鎖から形成される相互侵入高分子網目(IPN)ゲルへの生分解性付与と組織再生足への応用」第 68 回コロイド・界面化学討論会、神戸大学、2017 年 9 月
11. 飯島一智・市川聖子・大山峻・**石川昇平**・松隈大輔・大塚英典・橋詰峰雄「同軸二層流を用いたポリイオンコンプレックス型多糖チューブの作製と細胞の担持」第 27 回バイオ高分子シンポジウム、東京工業大学、2017 年 7 月

・査読無し-ポスター発表-

1. 宍倉拓実・**石川昇平**・大澤重仁・大塚英典「アミノ基数を増やしたゼラチンを基本骨格とする生体環境での長期培養を志向したインジェクタブルゲル」第 41 回日本バイオマテリアル学会大会、つくば国際会議場、2019 年 11 月
2. 工藤和樹・**石川昇平**・大澤重仁・大塚英典「動的共有結合を導入した Chitosan/PEG/RADA16 IPN ゲルの作製とその自己修復性評価」第 9 回 CSJ 化学フェスタ、タワーホール船堀、2019 年 10 月
3. 宮永紘汰・**石川昇平**・大澤重仁・大塚英典「軟骨組織再生のためのスフェロイド三次元ゲル培養および組織形成能評価」第 9 回 CSJ 化学フェスタ、タワーホール船堀、2019 年 10 月
4. **石川昇平**・山口紘・大澤重仁・飯島一智・飯島道弘・大塚英典「分解性による空間固定された成長因子の運動促進を伴う IPN 型インジェクタブルゲルの軟骨再生足場としての機能向上」第 29 回バイオ・高分子シンポジウム、東京工業大学、2019 年 7 月

5. 宮永紘汰・石川昇平・大澤重仁・大塚英典「軟骨組織再生のための軟骨スフェロイド三次元ゲル培養および細胞機能評価」第 48 回医用高分子シンポジウム、産業技術総合研究所、2019 年 7 月
6. 石川昇平・山口紘・飯島一智・大澤重仁・飯島道弘・大塚英典「成長因子固定型分解性インジェクタブル IPN ゲル中における軟骨組織再生機能」第 68 回高分子年次大会、大阪府立国際会議場、2019 年 5 月
7. 工藤和樹・石川昇平・大澤重仁・大塚英典「シッフ塩基由来の架橋を含むキトサン/PEG/RADA16 からなる IPN ゲルの作製とその自己修復性評価」第 68 回高分子年次大会、大阪府立国際会議場、2019 年 5 月
8. 山口紘・石川昇平・大澤重仁・飯島道弘・大塚英典「成長因子固定型インジェクタブル IPN ゲルの作製と固定化剤の長さ制御による軟骨再生足場材としての機能向上」日本化学会第 99 春季年会(2019)、甲南大学、2019 年 3 月
9. 市川聖子・大山峻・石川昇平・飯島一智・大塚英典・橋詰峰雄「内表面に細胞層を有する多糖中空ファイバーの作製」第 28 回 日本 MRS 年次大会、北九州国際会議場、2018 年 12 月
10. 飯島一智・市川聖子・石川昇平・大塚英典・橋詰峰雄「マイクロ流体技術を用いた中空状細胞ファイバーの作製」日本動物実験代替法学会第 31 回大会、崇城大学、2018 年 11 月
11. 宍倉拓実・石川昇平・大澤重仁・大塚英典「組織再生足場としての長期安定化を目指したゼラチン IPN ゲルの創製」第 8 回 CSJ 化学フェスタ 2018、タワーホール船堀、2018 年 10 月
12. 岡野泰幸・石川昇平・飯島一智・家高佑輔・大塚英典・橋詰峰雄「ヒドロキシアパタイト複合化シリカファイバー不織布の組織工学的評価」第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、大阪大学、2018 年 9 月
13. 山口紘・石川昇平・大澤重仁・飯島道弘・大塚英典「成長因子固定型インジェクタブル IPN ゲルの作製と固定化剤の長さに依存した軟骨細胞機能応答」第 67 回高分子討論会、北海道大学、2018 年 9 月
14. 石川昇平・飯島一智・橋詰峰雄・飯島道弘・大塚英典「生分解性 IPN ゲルのネットワーク構造に依存した軟骨組織再生挙動」第 67 回高分子年次会、名古屋国際会議場、2018 年 5 月
15. 岡野泰幸・石川昇平・飯島一智・大塚英典・橋詰峰雄「ヒドロキシアパタイトーシリカファイバー不織布複合細胞培養担体の作製」日本化学会第 98 春季年会(2018)、慶応義塾大学、2018 年 3 月
16. 石川昇平・大塚英典「細胞内環境に応答し分解するイメージング蛍光ナノ粒子の作製」総合研究院トランスレーショナルリサーチ(TR) センター 第 8 回シンポジウム、東京理科大学、2018 年 1 月
17. 市川聖子・大山峻・飯島一智・石川昇平・大塚英典・橋詰峰雄「マイクロ流体技術を用いて作製した多糖中空ファイバー中に担持された細胞の培養」第 27 回日本 MRS 年次大会、横浜市開港記念会館、2017 年 12 月、
18. Taro Mashimo, Shohei Ishikawa and Hidenori Otsuka. Functionalities of Fibrous Network in IPN-type Injectable Hydrogel Consisting of Self-assembling peptide and Chitosan for Cartilage Tissue Engineering. 第 27 回日本 MRS 年次大会、横浜市開港記念会館、2017 年 12 月

19. 飯島一智・石川昇平・橋詰峰雄・大塚英典「シリカ不織布における骨髄由来間葉系幹細胞の骨分化挙動の解析」日本動物実験代替法学会第30回大会、大田区産業プラザ、2017年11月
20. 石川昇平・高橋雄樹・佐々木皓平・川部雅章・大塚英典「三次元シリカナノファイバーを用いた非実質細胞との共培養における肝細胞高機能化メカニズム解析」日本動物実験代替法学会第30回大会、大田区産業プラザ、2017年11月
21. 市川聖子・大山峻・飯島一智・石川昇平・大塚英典・橋詰峰雄「マイクロ流体技術を用いて作製した多糖中空ファイバーの表面への細胞接着とゲル部への細胞担持」第7回CSJ化学フェスタ2017、タワーホール船堀、2017年10月
22. 市川聖子・大山峻・飯島一智・石川昇平・松隈大輔・大塚英典・橋詰峰雄「マイクロ流体技術を用いた一段階での細胞担持多糖中空ファイバーの作製」第66回高分子討論会、愛媛大学、2017年9月
23. 石川昇平・松隈大輔・大塚英典「細胞内pH制御可能なイメージング蛍光ナノ粒子の作製」総合研究院トランスレーショナルリサーチ(TR)センター第7回シンポジウム、東京理科大学、2017年9月
24. 石川昇平・飯島一智・橋詰峰雄・飯島道弘・松隈大輔・大塚英典「軟骨組織再生を促す持続的薬物除法型生分解性ハイブリッドインジェクタブルゲルの開発」第46回医用高分子シンポジウム、産業技術総合研究所、2017年7月
25. 市川聖子・大山峻・飯島一智・石川昇平・松隈大輔・大塚英典・橋詰峰雄「マイクロ流体技術による細胞接着性を有する多糖中空ファイバーの作製」第66回高分子年次会、幕張メッセ、2017年5月
26. 石川昇平・飯島一智・橋詰峰雄・飯島道弘・松隈大輔・大塚英典「相互侵入高分子網目構造を有する生分解性インジェクタブル型ハイドロゲルの作製と軟骨組織再生」第66回高分子年次会、幕張メッセ、2017年5月

## 国際会議発表

1. Hiro Yamaguchi, Shohei Ishikawa, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima and Hidenori Otsuka “Fabrication of Insulin-like Growth Factor-1 Conjugated IPN gel and Controlling Length of the Conjugation Linker for Enhancement of the Embedded Chondrocytes Function. Materials Research Meeting 2019 (MRM2019), Yokohama, Japan, Dec. 2019.
2. Shohei Ishikawa, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. “Enhanced Function of Chondrocytes in Degradable IPN gel by Accelerating Spatial Motility of Chemically Conjugated Growth Factor via PEG Linker in Hydrogel” OKINAWA COLLOIDS 2019, Okinawa, Japan, Nov. 2019.
3. Kazuki Kudo, Shohei Ishikawa, Shigehito Osawa, Hidenori Otsuka. “Controlling self-healing rate of chitosan-based hydrogel using both of Schiff base and amide bonds for crosslinkinG” OKINAWA COLLOIDS 2019, Okinawa, Japan, Nov. 2019.
4. Kota Miyayaga, Shohei Ishikawa, Shigehito Osawa, Hidenori Otsuka. “Fabrication of micropatterned substrate for forming and collecting spheroids based on phase transition of spincoated thermo-responsive

polymer” OKINAWA COLLOIDS 2019, Okinawa, Japan, Nov. 2019.

5. Yasuyuki Okano, **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Yusuke Yataka, Hidenori Otsuka, Mineo Hashizume. “Preparation of Hydroxyapatite-Nonwoven Silica Fiber Composite Substrates and Their Effects on Mesenchymal Stem Cells as Bone-Like Scaffolds” OKINAWA COLLOIDS 2019, Okinawa, Japan, Nov. 2019.
6. **Shohei Ishikawa**, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. “Chemical Conjugation of Growth Factor Having Spatial Motility with Degradable IPN gel for the Promotion of Cartilage Tissue Regeneration” TERMIS-AP + ABMC7 2019 Congress, Australia, Oct. 2019.
7. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. Preparation of Injectable and Biodegradable Hydrogel with Interpenetrating Polymer Network Based on Self-assembling Peptide and Chitosan for Promoting Cartilage Tissue Regeneration. The 12<sup>th</sup> SPSJ International Polymer Conference, Hiroshima, Japan, December 2018.
8. **Shohei Ishikawa**, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. “Articular Cartilage Regeneration Using Growth Factor Installed, Degradable and Injectable Hydrogel with Interpenetrating Polymer Network” 1st G’L’owing Polymer Symposium in KANTO, Tokyo, Japan, December 2018.
9. Hiro Yamaguchi, **Shohei Ishikawa**, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima and Hidenori Otsuka Preparation of Growth Factor Conjugated Injectable IPN Hydrogel and the Effect of Conjugation-Linker Length on Improvement of Embedded Chondrocyte Function. 1st G’L’owing Polymer Symposium in KANTO, Tokyo, Japan, Dec. 2018.
10. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Mineo Hashizume, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. “One-pot Synthesis of Injectable and Biodegradable Hydrogels with Interpenetration Polymer Network for Tissue Engineering Application” 5th TERMIS World Congress-2018 Kyoto, Kyoto, Japan, September 2018.
11. Kazutoshi Iijima, **Shohei Ishikawa**, Daisuke Matsukuma, Mineo Hashizume and Hidenori Otsuka. Regeneration of Hyaline Cartilage from Mesenchymal Stem Cells Using Interpenetrating Polymer Network Gels of Polysaccharides and Peptides. 5th TERMIS World Congress-2018 Kyoto, Kyoto, Japan, September 2018.
12. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. Injectable and Biodegradable IPN Hydrogel Consist of Self-assembling peptide and Chitosan for Cartilage Tissue Regeneration. Water on Materials Surface 2018, Tokyo, Japan, July 2018.
13. Yasuyuki Okano, **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Hidenori Otsuka and Mineo Hashizume. Functionalization of Silica Nonwoven Fabrics by Hydroxyapatite and Behaviors of Mesenchymal Stem Cells Thereon, Water on Materials Surface 2018, Tokyo, Japan, July 2018.
14. **Shohei Ishikawa**, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. Articular Cartilage Tissue Regeneration in Degradable and Injectable Hydrogel with Interpenetrating Polymer Network Consist of Self-assembling peptide, Chitosan and PEG-PLA-PEG. International Symposium of Tokyo University of Science, Translational Research Center, Tokyo, Japan, July 2018.

15. Seiko Ichikawa, Shun Ohyama, Kazutoshi Iijima, **Shohei Ishikawa**, Daisuke Matsukuma, Hidenori Otsuka and Mineo Hashizume. Preparation of Cell-laden Polysaccharide Hollow Fibers Using Microfluidic Techniques. IUMRS-ICAM 2017, Kyoto univ. Aug. 2017

## その他

1. 2017年, 2018年, 2019年 私学事業団学術研究振興基金獲得
2. 2017年 日揮・実吉奨学金獲得
3. 2019年6月 日本学生支援機構奨学金全額免除

## 職歴

1. 2017年4月-2019年3月  
東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 トランスレーショナルリサーチセンター リサーチアシスタント
2. 2019年4月-2020年3月  
日本学術振興会特別研究員(DC2) 東京理科大学 大塚研究室  
「軟骨組織再生を志向し成長因子の空間運動性を最適化したインジェクタブル IPN ゲル」



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、実験計画や日々の研究ディスカッション、並びにプレゼンテーション方法など、研究に関するアプローチを様々ご教授いただきました、指導教員である理学部第一部 応用化学科 大塚英典教授に大いに感謝致します。研究のみならず論文執筆や著書出版など、様々な体験をさせていただきました。この場を借りて、感謝を述べさせていただきます。

博士論文の執筆に当たり、東京理科大学 理学研究科 化学専攻 鳥越秀峰教授、佐々木健夫教授、椎名勇教授、下仲基之教授、由井宏治教授には、お忙しい中大変お世話になりました。特に、主査を引き受けていただきました鳥越秀峰教授に深く感謝いたします。

小山高等工業専門学校 飯島道弘教授には、私が研究室に所属してから今日まで、様々なご指導いただきました。特に高分子合成に関し、たくさんのご助言いただきありがとうございます。

東京大学大学院医学系研究科 星和人教授には、第 4 章の論文執筆に際し、大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

東京理科大学工学部工業化学科 橋詰峰雄教授には、第 2 章の論文執筆に際し、大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

横浜国立大学 工学研究院 飯島一智准教授には、東京理科大学所属時に多くの共同研究でお世話になりました。特に遺伝子発現評価に関し、ご指導いただき誠にありがとうございました。

東京理科大学理学部第一部応用化学科大澤重仁助教には、本内容に関する論文執筆に際し大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

東京大学大学院医学系研究科 浅輪幸代特任助教には、第 4 章の論文執筆に際し、大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

研究室の助教であった松隈大輔博士にも、研究デザインを一からご指導いただき、誠にありがとうございました。この場を借りて感謝致します。

株式会社スリー・ディー・マトリックス松田範昭氏には、RADA16 のご提供に際し大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

日本バイリーン株式会社 川部雅章氏、及び同株式会社 佐々木皓平氏には、SNFs のご提供に際し大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

国立成育医療研究センター・小児・血液腫瘍研究部の清河信敬部長にはリアルタイム PCR 使用に際し大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

東京理科大学薬学部生命創薬科学科樋上賀一教授、及び水之江雄平博士には、H&E 染色、及び AB 染色実験に際し大変お世話になりました。この場を借りて感謝致します。

最後に、私の生活を支えて下さった両親に感謝致します。金銭面から精神面まで、全てにおいて多大な支援を行っていただきました。我儘な私ですが、今後も自分にできることをしていこうと思います。最後まで見守って下さり、誠にありがとうございました。

今後は大塚研究室での経験を活かし、自身の実力で道を切り拓いていきたいと思っております。

本研究は、日本学術振興会、私学事業団学術研究振興基金、東京理科大学研究推進機構総合研究院トランスレーショナルリサーチセンター、東京理科大学研究推進機構総合研究院ウォーターフロンティアサイエンス&テクノロジー研究センターから研究費の補助をいただき行ったものである。