

氏名（本籍） 石川昇平（神奈川県）
学位の種類 博士（理学）
学位記番号 甲第1209号
学位授与の日付 2020年3月17日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目 関節軟骨再生を志向した足場材料設計：シリカ不織布と機能性患部注入型ゲル

論文審査委員 (主査) 教授 鳥越 秀峰
教授 椎名 勇 教授 下仲 基之
教授 佐々木健夫 教授 由井 宏治

論文内容の要旨

組織工学的手法が多様化する昨今において、生体外と生体内での応用を志向とする再生医療材料の開発が急務である。特に、自己修復能に乏しい関節軟骨組織の再生は人々の Quality of Life (QOL) 向上に直結する最重要課題の一つであり、組織再生用の細胞源確保やその細胞を培養する足場設計が不可欠である。本研究では関節軟骨組織再生のため、第一に生体外での応用を志向とし、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC) の軟骨分化を達成することで生体外における関節軟骨細胞源の確保を目的とした(第二章)。そして第二に生体内での応用を志向とし、組織欠陥患部に直接注入可能な低侵襲性の軟骨細胞包埋型足場材料を設計し、in-situ で効率的に軟骨組織を再生可能な技術の確立を目的とした(第三章、第四章、第五章)。

本論文は全六章により構成される。第一章では、軟骨組織再生に係る生体外、及び生体内での組織再生技術について提示すると共に、現時点での課題と組織工学的用途のため必須となる検討事項を論じ、本論文の目的について述べた。

第二章では、生体外での組織再生手法の一つとして注目を集めつつあり、今後の技術展開に有望なシリカ不織布(Silica nonwoven fabrics; SNFs, Cellbed®) を用い、間葉系幹細胞(MSC) からの軟骨分化挙動を追跡することで、関節軟骨細胞採取のための細胞源を確保することを目的とした。SNFs は、生体内の extracellular matrix (ECM) に模倣したファイバーの相互侵入構造により、培養する細胞のタンパク質産生向上、遺伝子発現向上など、生化学的シグナルを活性化するため、組織工学への有効性が実証されている。本章では、このような再生医療に有効な特性を有する SNFs の軟骨組織再生への応用性を検討するため、

SNFs の物性評価、MSC からの軟骨分化挙動を調査した。FITC-dextran を用いた物質透過性試験により、SNFs の物質透過性は非常に高く、酸素や栄養素などの培養因子他、軟骨分化培地に含まれる TGF- β などの成長因子も SNFs 中を自由に透過可能であり、MSC の軟骨分化に有効に機能することが示唆された。この優れた物質透過性は SNFs の高い空隙率 (95% 以上) にあり、scanning electron microscope (SEM) 観察においても SNFs の相互侵入構造と均一なファイバー構造が明確に観察されたことから、培養する細胞の三次元的な細胞伸展を可能とし、生体内での立体構造の再現を実現する。実際に、MSC を SNFs に播種し培養すると、MSC は二次元平面で観察される接触障害を伴うことなく、細胞が深さ方向に伸展し増殖したことから、この挙動に基づき MSC の軟骨分化を促進すると予想される。期待通り MSC の軟骨分化は、臨床応用済のアテロコラーゲンゲルと同様に促進されたが、SNFs の無機材料に由来する炎症非惹起性、構造維持性の観点を考慮すると、これら課題を有するアテロコラーゲンゲルと比較し SNFs の生体外での軟骨分化誘導性が強く実証された。これらの挙動は、生体内 ECM 構造との高い類似性、かつその硬さにより、MSC からの軟骨分化を促進したと考えられる。以上より、SNFs 中における MSC からの軟骨分化は、生体外における有効な軟骨細胞回収手段であり、その細胞供給源としての利用可能性が示唆された。

第三章では、生体内における関節軟骨組織再生に焦点を当て、欠陥患部に直接足場材料を作成可能な低侵襲性の分解性インジェクタブルゲルの作成を目的とした。ゲルを作成する材料として、生体適合性に優れたバイオマテリアルとして多様な chitosan (CH) を主骨格とする高分子と、人工合成材料の poly(ethylene glycol) (PEG) と poly(DL-lactide) (PLA) から構成されるトリブロック型高分子の末端を NHS で機能化した分解性架橋材 NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS を選択し、これら二成分を生理条件下で混合するだけで作成可能なインジェクタブルゲルの設計を着想した。設計されるゲルは架橋材に含まれる PLA のエステル加水分解によりゲル分解を誘起し、その分解性がゲルに包埋する細胞の機能を向上させると予想した。分解性架橋剤の合成手法も新規であり、分解性架橋剤 NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS は、2-tetrahydropyranyl (THP) で片末端保護した THP-PEG-OH を開始剤とする DL-lactide の開環重合と adipoyl chloride との縮合反応により THP-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-THP を合成し、引き続き THP の脱保護と NHS の末端機能化による最終生成物として合成した。合成した NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS と CH を混合すると、アミド結合の形成に基づく化学架橋を介したインジェクタブルゲルの形成が観察され、形成したゲルは、PLA のエステル加水分解に基づき緩やかに分解した。同時に、分解に伴い網目密度は時間経過毎に減少したことから、包埋する細胞に由来する ECM 蓄積増加などの組織再生を促す特性付与に成功したことを明確にした。実際の軟骨細胞を包埋し培養後の細胞機能は、関節軟骨再生への有意な向上が観察され、ECM 蓄積量も分解性ゲルにおいて向上したことから、分解性ゲルによる優れた軟骨組織再生性を確認した。以上の結果より、架橋剤に対し分解性を付与することで CH を主骨格とする分解性インジェクタブルゲルの作成に成功し、その分解に伴う網目密度増大効果により包埋する細胞の組織再生能力が向上することを実証した。本システムは生体内においても容易に達成可能であり、高侵襲な

切開手術を介することなく生体内に直接投与可能な再生医療技術である。

第四章では、軟骨細胞機能をより向上させるため、微細構造により細胞機能を向上可能な自己組織化ペプチドネットワークとの複合化に基づく相互侵入高分子(Interpenetrating polymer network; IPN) ゲルの one-pot 合成について述べた。自己組織化ペプチドは、生理条件下に暴露されると物理架橋形成に基づき、生体内 ECM を模倣した三次元ネットワーク構造を迅速に形成する。その構造が生体内 ECM と類似しているため組織再生効率を向上させる一方、力学強度に乏しく生体内での応用を志向した軟骨組織再生には適さない。そこで第三章の CH ゲルとペプチドゲルを組み合わせれば、ネットワークの複合化によりペプチドの安定性が担保され、さらに、これらゲル化成分の同時混合が、双方のゲル形成メカニズムと速度の相違に基づき、二種ネットワークの時限的形成を介したインジェクタブル IPN ゲルの one-pot 合成が期待される。本章ではまず上記の仮定を実証するため IPN ゲルを形成する材料として、自己組織化ペプチド(RADA16)、CH、NHS-PEG-NHS を選択し、それらを生理条件下にて同時混同することでインジェクタブル IPN ゲルの設計を試みた。各々単独のネットワーク形成挙動を動的粘弾性測定により詳細に評価したところ、RADA16 は超純水中ではなく生理条件下(PBS 150 mM, pH 7.4) において初めて電荷中和を介し迅速に自己組織化ネットワークを形成する一方、CH と NHS-PEG-NHS を混合した CH/PEG においては、溶媒環境に依存せず二成分間の縮合反応を介した緩やかなネットワーク形成が確認された。興味深いことにこれら三成分を同時混合すると、各々のネットワーク形成を阻害することなく多段階なネットワーク形成が観察されたことから、双方ネットワークのゲル形成メカニズムと速度の相違が、本 IPN の one-pot 形成を誘発することが実証された。さらに RADA16 の自己組織化に由来し形成する β -sheet 構造は IPN ゲル中で安定に長期間保持され、IPN ゲルの力学強度も、単独の RADA16 ゲルでは強度に乏しく脆弱だが、IPN 化することで二ヶ月間安定に維持していたことから、本材料選択による IPN ゲルの形成を強く支持し、包埋する細胞へ RADA16 の繊維構造に由来し組織再生効率を向上させるであろう。実際に CH 溶液に軟骨細胞を包埋し、上述と同様の手順で IPN ゲルを合成すると、細胞毒性無く IPN ゲルに軟骨細胞が均一に包埋され、40 日間培養後のその機能は、RADA16 を含まない CH/PEG よりも、IPN ゲル中に包埋した軟骨細胞から産生されるタンパク質産生量が向上し、さらに関節軟骨組織特有の遺伝子発現も観察されたことから、ペプチドの繊維ネットワークに起因し本 IPN ゲルは軟骨組織再生に向け有用な足場となることが実証された。以上の結果より、本戦略を用いた IPN ゲルは通常の合成法では実現しない特性を容易に付与可能なこと、さらに本国において非常に需要の高い関節軟骨組織再生への生体内応用を可能とすることを明確にした。

第五章では、第三章で合成した分解性架橋剤と第四章で確立した IPN ゲルの合成法とを融合した分解性 IPN ゲルの one-pot 合成について述べた。分解性 IPN ゲルの合成も三成分を同時混合することにより達成され、第四章と同様に、多段階なネットワーク形成プロセスを介し IPN ゲルが形成され、さらに形成したゲルは非分解性ゲルと比較しても遜色無い IPN 性を有していたことから、ゲル化メカニズムと速度が異なれば IPN を阻害無く形成可能なことを示唆する。さらに形成した分解性 IPN ゲルは、生理条件下において徐々に分

解し、分解に呼応し網目密度も減少したことから、PLA のエステル加水分解に基づき分解する IPN ゲルの one-pot 合成を実証した。さらに β -sheet 構造は分解に伴い減少したことから、残存する繊維構造とゲル分解特性により包埋する細胞の機能はこれらの相乗作用により顕著に向上することが期待される。実際に、分解性 IPN ゲルに軟骨細胞を包埋し細胞機能を評価すると、軟骨由来のタンパク産生量と遺伝子発現量が非分解性 IPN ゲルと比較し顕著に向上したことから、当初の目論見通り、IPN ゲルに分解性を付与することで軟骨細胞機能をより効率的に向上させ、低侵襲な次世代材料として本分解性 IPN ゲルは機能することを実証した。

第六章では第二章から第五章の内容の総括と今後の展望について述べた。第一に生体外での応用を志向とし SNFs 中での MSC の軟骨分化挙動を評価することで軟骨細胞回収源としての足場材料有効性を実証し、第二に生体内での応用を志向とし、ゲル化メカニズムとゲル化速度に焦点を当て分解性インジェクタブル IPN ゲルを作成するという画期的な戦略は、再生医療材料開発のための新展開であり、組織再生に向け新たな基礎学術を提供するであろう。

論文審査の結果の要旨

昨今、高齢化に伴い関節軟骨疾患の患者数が増加傾向にある。現在実行されている治療は患者への侵襲性が高く、より低侵襲に治療する方法の探索が患者の QOL 向上のため急務である。低侵襲な軟骨疾患治療法としては、軟骨細胞を軟骨組織欠損部に直接注入することが着目されているが、この方法の達成には、患者由来の軟骨細胞を確保すること、そして軟骨細胞と共に移植可能でかつ軟骨細胞の組織形成を促す足場材料を設計することが必要である。本研究においては、患者由来の幹細胞、特に脂肪組織や骨髄より得られる間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSC) から軟骨細胞に分化誘導することで安全かつ大量に軟骨細胞が確保できると考え、MSC を軟骨細胞へ効率的に分化誘導することが可能な細胞培養担体を提案している。また、軟骨細胞とともに移植する材料として、軟骨組織に豊富に含まれるグリコサミノグリカンと類似した構造を持つカルボキシメチルキトサン(CH) を主骨格に用いたハイドロゲルで、かつゲル前駆体を混合するだけで作成可能なインジェクタブルゲルを設計している。

本論文は全 6 章からなる。第 1 章では、組織工学で用いられるバイオマテリアルの設計、間葉系幹細胞について概説し、関節軟骨組織再生に係る足場材料の構築と効率的に関節軟骨組織を再生する手法について述べ、本論文の目的を概説している。

第 2 章では、MSC からの軟骨細胞確保を志向し、日本バイリーン(株)により提供されたシリカ不織布(SNFs) を培養単体として用い、MSC の増殖及び軟骨細胞分化挙動について評価している。SNFs は、既存のファイバー材料と比較し空隙率は 95% と高く、かつ網目サイズも 7.6 μm と小さいことから、優れた培養担体であると期待される。SNFs

での MSC 培養においては、SNFs 深部まで細胞が伸展、増殖している様子が見られている。また、軟骨分化培地を用い培養した際の遺伝子発現解析により、SNFs 培養は従来培養法と比較して、肥大軟骨細胞や繊維軟骨細胞への分化が抑制されることを示している。以上の結果より、SNFs は MSC の関節軟骨細胞への分化を効率的に行う細胞培養担体として有望で、軟骨細胞を確保するための材料として適していることを主張している。

第 3 章では、生体内に軟骨細胞とともに移植する足場材として、CH を主骨格とする加水分解性インジェクタブルゲルの設計について述べている。加水分解性であるポリ乳酸を含む架橋剤を設計し、これにより CH を架橋した分解性ゲルを得ている。ゲルの分解性については、生理条件下において数十日間静置した場合の重量損失により実証している。ウシ膝軟骨細胞を包埋して培養したところ、分解性ゲルは非分解性ゲルと比較してタンパク質産生量が有意に高いこと、さらに関節軟骨への分化の指標となる遺伝子の発現亢進も確認されており、足場材に分解性を付与する有効性を実証している。

第 4 章では、CH を主骨格とするゲルに他のネットワークを複合化することで、より高機能な軟骨細胞足場材を構築することを志向している。ここでは、2 種類以上のネットワークが互いに独立して存在し、各ネットワークの特性を複合可能な相互侵入高分子網目(Interpenetrating polymer network; IPN) 型ゲルを、*in-situ* かつ *one-pot* で構築することに焦点を当てている。具体的には、自己組織化ペプチドの物理架橋ネットワークを CH を主骨格とする化学架橋ネットワークに複合化する設計を行なっている。粘弾性測定によるゲル化挙動と、CD スペクトル測定から、コンセプト通り IPN ゲルの *in-situ* かつ *one-pot* での構築を確認している。IPN ゲル内で軟骨細胞を培養した場合、軟骨細胞由来のタンパク質産生量の有意な向上、さらに関節軟骨への分化の指標となる遺伝子の発現亢進も確認されており、本戦略の有効性を主張している。

第 5 章では、第 4 章で設計した IPN ゲルに分解性を付与することで、IPN ゲルのさらなる高機能化を志向している。第 3 章で設計した分解性架橋剤を用いることで、分解性 IPN ゲルの構築を達成している。この分解性 IPN ゲルに細胞を包埋し培養すると、非分解性 IPN ゲルと比較して軟骨細胞由来のタンパク質産生量と関節軟骨への分化の指標となる遺伝子の発現亢進が確認されており、コンセプト通り軟骨組織形成足場として有用な分解性 IPN ゲルの構築を主張している。

第 6 章では以上の本論文の内容を総括している。

以上、本論文では、低侵襲な関節軟骨疾患治療を開拓すべく、軟骨細胞の確保に関する技術と、軟骨細胞と同時に移植可能な足場材料の構築に焦点を当て、バイオマテリアルの選択及び設計を行なっている。本論文により達成された成果は、今後高齢化の進行に伴い需要の高まる関節軟骨疾患の治療に対して大きな影響を与えることと考えられる。よって本論文は、博士(理学) の学位論文として十分に価値のあるものと認められる。