

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月12日現在

シグナル因子と三次元構造材料を統合する「四次元足場システム」の創製

Development of “4-dimensional scaffold system” that integrates signaling factors and 3-dimensional structural biomaterials

課題番号：16H06312

鄭 雄一（TEI, YUICHI）

東京大学・大学院工学系研究科・教授



研究の概要（4行以内）

シグナル因子を保持して足場素材への空間的配置を可能にし、かつ、望みの時間に分解してシグナル因子を標的細胞に最適タイミングで届けることができる高機能ハイドロゲルユニットを開発し、シグナル因子と足場素材を統合することで、局所細胞の分化・増殖を時空間制御し、効率的な再生誘導を行う「四次元足場システム」を新たに創製する。

研究分野：複合領域

キーワード：再生医工学

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞生物学の進歩により、組織・臓器再生のシグナルネットワークは急速に解明されつつあり、シグナル因子を標的細胞に送達する方法も開発が進んでいる。また、三次元プリンターの登場で、足場素材の三次元形状制御技術が急速に発展している。しかし、これらの要素単独では臨床的な再生を実現するには不十分であり、両者を統合するインターフェースとなるユニットの開発が不可欠である。

2. 研究の目的

シグナル因子を保持して足場素材への空間的配置を可能にし、かつ、望みの時間に分解してシグナル因子を標的細胞に最適タイミングで届けることができる高機能ハイドロゲルユニットを開発し、シグナル因子と足場素材を統合することで、局所細胞の分化・増殖を時空間制御し、効率的な再生誘導を行う「四次元足場システム」を新たに創製する。

3. 研究の方法

第1に、骨・軟骨再生を誘導するシグナルネットワークと、目的に応じたモダリティーでのシグナル因子の送達を最適化する。第2に、骨・軟骨用足場素材について、様々なスケールで三次元形状を制御し、性能を最適化する。第3に、これまで研究開発してきたハイドロゲルの設計・製造方法に基づき、シグナル因子と足場素材の統合インターフェースとして要求される：①水中での膨潤制御、②水中での力学的強度保持、③網目サイズの制御、

④網目サイズの制御と協調した分解性制御、⑤生体適合性という5つの要求特性の全てを満たす高機能ハイドロゲルユニットを新規開発し、細胞の分化・増殖の時空間制御を可能にする「四次元足場システム」を試作する。第4に、試作した四次元足場システムを骨・軟骨欠損動物モデルに埋植し、その機能を検証するとともに、再生メカニズムの詳細な解析を行う。

4. これまでの成果

骨・軟骨再生誘導シグナルネットワークとシグナル因子送達法最適化：マウス胚性幹細胞由来の中胚葉細胞を、Hhシグナル活性化剤SAGと骨形成性低分子TH（ヘリオキサンチン類縁体）で処理することで、骨芽細胞が三次元培養中で誘導され、骨組織様オルガノイドを形成できることを見出した（Zujur et al., 2017）。マウス骨折モデルにおいてSAGの局所投与が仮骨形成を促進することも確認した（Kashiwagi M et al., 2016）。また、THに関してはin silicoスクリーニングから標的分子候補を絞り込み、in vitro キナーゼアッセイによって検証を行った結果、Wntシグナル経路調節因子であるグリコーゲン合成酵素3 α と β （GSK3 α/β ）のキナーゼ活性を抑制するGSK3阻害剤であると示唆された（投稿準備中）。軟骨形成性低分子化合物TDが転写因子Runx1の発現を誘導する知見に基づき、Runx1による軟骨修復促進効果を確認した（Aini H et al., 2016）。

足場素材の三次元形状制御方法の最適化：三次元プリンターを用いた臨床ニーズに即し

た詳細な検討を行った結果、粉体粒径 10 μm、粘度はコンドロイチン硫酸 4%、pH5.5、液滴量 25pL を採用した。

高機能ハイドロゲルユニットの開発と四次元足場システムの創製：非膨潤性のゲルである臨界ゲルの開発 (Fujiyabu T et al., 2017, 2018; Nish K et al., 2017; Hayashi K et al., 2017 など多数) を進める中で、再生医療用足場材料として有用な「Tetra-PEG スポンジ」の開発に世界で初めて成功した (投稿準備中)。Tetra-PEG スポンジは、親水性のポリエチレングリコール (PEG) のみからなるものの、同様に PEG からなる Tetra-PEG ゲルとは全く異なる構造・細胞親和性を有する。Tetra-PEG スポンジは μm オーダーの構造を有し、PEG が密な構造と PEG がほとんど存在しない粗な構造の二相からなる。Tetra-PEG スポンジに細胞 (ATDC5) を播種したところ、旺盛な接着・伸展挙動が確認され、さらに、Tetra-PEG スポンジをラット背部の皮下に 2 週間埋植したところ、極めて旺盛な線維性組織の浸潤・血管誘導が確認された。このように、PEG 単体からなるゲルにおいて、構造を制御することで細胞接着性・細胞浸潤性の機能を誘起することに世界で初めて成功した。**骨再生効果と再生メカニズムの検証**：成獣マウス頭蓋部に作製した臨界骨欠損 (直径 4 mm) を on site gelation により Tetra-PEG スポンジで被覆し、無処置群、Tetra-PEG ゲル被覆群と比較して、12 週間にわたって骨再生効果を検証した (投稿準備中)。X 線マイクロ CT 解析において、術後 4 週より Tetra-PEG スポンジ群でのみ旺盛な骨再生が認められ、その量は経時的に増加した。Tetra-PEG スポンジ群においては、細胞がスポンジ内部に侵入し、骨再生がスポンジ周囲のみならずスポンジ内においても誘導されていた。以上より、Tetra-PEG スポンジがシグナル因子と三次元足場素材を融合する統合インターフェースとして、四次元足場システムの基幹素材となりうると考えられたため、1. で同定した SAG や TH といったシグナル因子を搭載する実験を開始している。

5. 今後の計画

足場素材の三次元形状制御方法の最適化・高機能ハイドロゲルユニットの開発と四次元足場システムの創製：Tetra-PEG スポンジの形成過程を高分子物理として理解することで、ポアサイズなどの制御が可能になると考えられる。スポンジ構造の精密な制御を目指しつつ、その構造と細胞・組織との相互作用を調査し、四次元足場材料として最適な材料を創製する。SAG と TH を搭載した骨再生用四次元足場システム、及び TD を搭載した軟骨再生用四次元足場システムとしてデバイスの試作品を作製する。

動物実験による四次元足場システムの機能

検証と再生メカニズムの解析：A) マウスにおける基礎評価と再生メカニズムの解明については、大腿骨骨・軟骨欠損モデル (1 mm 径) を作成し、欠損作製直後に骨・軟骨再生用四次元足場システムを移植し、術後に組織学的解析及び各種軟骨分化マーカーの発現解析により骨・軟骨再生を評価する。また、上記の検討で良好な骨・軟骨再生効果が認められた場合は、遺伝子改変マウスを用いて、材料とのインターフェースに出現する細胞の性質とその出現の時間的・空間的パターンを明らかにする。さらに、各細胞集団を特異的に取得し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析と ChIP-seq によるエピゲノム解析を行う。B) ビーグル犬における検討においては、ビーグル犬において、直径 3 mm、深さ 1 mm の大腿骨関節軟骨欠損を作製し、骨・軟骨再生四次元足場システムを移植して、CT 撮影と血液検査を行うとともに、組織切片を作製し、各種染色による骨・軟骨再生評価を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

原著論文 (査読有)

1. Fujiyabu T, Toni F, Li X, Chung UI, Sakai T*: Three Cooperative Diffusion Coefficients describing Dynamics of Polymer Gels. *ChemComm* 54: 6784, 2018
2. Nishi K, Fujii K, Chung UI, Sakai T*: Experimental observation of two features unexpected from the classical theories of rubber elasticity. *Phys Rev Lett* 119: 267801, 2017.
3. Fujiyabu T, Li X, Shibayama M, Chung UI, Sakai T*: Permeation of Water through Hydrogels with Controlled Network Structure. *Macromolecules* 50: 9411, 2017.
4. Zujur D, Kanke K, Lichtler AC, Hojo H, Chung UI, Ohba S*: Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. *Sci Adv* 3(5):e1602875, 2017.
5. Hayashi K, Okamoto F, Hoshi S, Katashima T, Zujur D, Li X, Shibayama M, Gilbert EP, Chung UI, Ohba S, Oshika T, Sakai T*: Fast-forming hydrogel with ultralow polymeric content as an artificial vitreous body. *Nat Biomed Eng* 1:44, 2017

他、総数 35 編

(論文 1, 2, 3 の謝辞に課題番号 16746899 と記載しているが、正しくは 16H06312 である)

7. ホームページ等

<http://www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp/>