

令和元年5月28日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05908

研究課題名(和文)凍結保存材料への応用を目指した生体吸収性ナノファイバーの物性解析と生体適合性評価

研究課題名(英文)Characterization of biodegradable nanofibers for cryopreservation

研究代表者

藤田 聡 (FUJITA, SATOSHI)

福井大学・学術研究院工学系部門・准教授

研究者番号：60504652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ポリ(3-(R)-ヒドロキシ酪酸-3-(R)-ヒドロキシヘキサン酸)(PHBH)ナノファイバーに着目し、その高分子物性と生体適合性に関して研究をすすめ以下のことを見出した。(1) PLLAではフィルムと比べてナノファイバーでは高い結晶化度を示したのに対して、PHBHでは結晶構造に顕著な差はなかった。(2) PHBHナノファイバーの炎症性はPLLAより低かった。また、生体中での分解様式のマカニズムを提案した。(3) PHBHナノファイバー表面へ接着した細胞は冷却・低温処理においても剥離しにくいことから直接凍結可能な細胞足場材料として利用できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PHBHの生分解性挙動から、埋込材料として有効であることが示された。PHBH基材は、冷却および凍結後も細胞接着を維持できる材料であることも示された。さらに凍結融解によって低い細胞生存率、接着細胞数を示したPLLAおよびPS基材は、低温で収縮した細胞の接着が弱くなり、凍結融解によって細胞が剥離、収縮による物理的ストレスがかかるメカニズムが示された。PHBHは微生物由来の天然ポリマーであることから、PLLA等の合成ポリマーに代わる有望な材料のひとつとして、本研究での成果を軸に今後の医療応用や産業利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study is focused on the application to culture scaffolds for cell cryopreservation by using poly (3-(R)-hydroxybutyric acid-3-(R)-hydroxyhexanoic acid) (PHBH) nanofibers. As a result of the investigation of the physical properties and biocompatibility of PHBH, the following results were obtained. (1) Regarding crystal structure and thermal properties, PLLA showed high crystallinity in nanofibers but low in films, whereas PHBH showed no significant difference between nanofibers and films. There was no remarkable difference in the crystal structure of. (2) The inflammation after the implantation of PHBH nanofibers was lower than PLLA. In addition, the mechanism of degradation mode in the physiological condition was proposed. (3) The cells adhered to the surface of PHBH nanofibers were less likely to exfoliate than PLLA and maintained the extended shape even in low temperature. It was available as a cell scaffold material that can be directly frozen with PHBH nanofibers attached.

研究分野：生体高分子

キーワード：ナノファイバー 生体分解性 細胞凍結 細胞接着 エレクトロスピンニング スキャフォールド PHBH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生体吸収性高分子を利用した組織工学と幹細胞生物学の融合的発展により、再生医療の実現化が期待されている。再生医療の普及には、細胞の長期保管技術や運搬技術が不可欠である。現在、細胞の長期保管は、細胞を一旦剥離し、単個細胞や凝集塊に分散させ、ここに凍害保護剤を添加し、液体窒素中で凍結する方法が用いられている。申請者は、エレクトロスピニング法で作製したポリウレタン(PU)ナノファイバー基材上で培養した細胞を直接凍結することで、細胞を接着状態のまま凍結させることに成功した(特願 2014-079207)。伸縮性のあるPUのようなポリマーで作製されたナノファイバーは、凍結時や融解時の物理的な収縮ストレスを基材が緩和し、そのため、細胞凍結時の足場材料に用いることで、細胞の剥離が軽減され、生存率が高まると考えられた。PUと同様の物性に加え、生体吸収性を兼ね備えた材料があれば、生体組織に類似構造体をナノファイバーで作製しておき、これに細胞を播種して育成し、凍結保存することで、必要時にすぐに解凍して使用できる。

生体材料で利用するナノファイバーの伸縮性を考慮するにあたり、ポリマーのガラス転移温度(T_g)が重要になる。代表的な生体吸収性高分子であるポリ乳酸(PLA)やポリグリコール酸(PGA)は、生体温度より高いガラス転移温度(T_g)を有する。このため、生体環境中では硬質で脆く伸縮性が低い。一方、柔軟な生体吸収性高分子としてはポリ- ϵ -カプロラクトン(PCL)やポリジオキサノン(PDO)がよく知られている。これらの高分子の T_g は体温より低いために、生体中でも柔軟なゴム弾性を有し伸縮性に富むが、強度に欠けるといふ問題がある。そこで本課題では、細胞の凍結保管に利用可能な生体吸収性足場材料としてバイオマス由来の微生物産生ポリエステル poly((R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)に着目する。PHBHは poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB)から成る結晶性の高いブロックと、poly-(R)-3-hydroxyhexanoate (PHH)から成る柔軟なブロックで構成される共重合体であり、PLAとPCLの中間の硬さと柔軟性を兼ね備え、かつ T_g が 0°C ないしはそれより低い。このため、細胞凍結時の足場材料としての利用が期待できる。例えば、この材料上であらかじめ培養した生体組織を凍結保存しておき、これを解凍してすぐに生体に埋め込むという使い方が想定される。

この目的に対し、PHBHの柔軟さを最大限に活用するために、直径 $1\ \mu\text{m}$ 以下のナノファイバーを用いる。ナノファイバーをシート化することで、柔軟さ、強度、力学的な異方性を併せ持つ、生体組織に類似した物性の材料が得られ、これを用いた細胞の凍結保存技術の開発が期待される。

2. 研究の目的

凍結可能な細胞足場材料として用いるためには、使用する高分子材料の熱的特性と生体中での分解・吸収特性に関する統合的な理解が必要となる。高分子材料の熱的特性や分解性は結晶化度に大きく影響を受ける。これまでにPHBHはナノファイバー化することで、結晶化状態が変わることが報告されている。したがって、ナノファイバー化すると熱的特性と生体中での分解挙動も大きく変化すると考えられる。PHBHの熱的性質としては、成形加工の観点から、高温域での知見はあるものの、凍結温度付近の低温域での知見はほとんどない。さらに、PHBHは生分解性材料として農業・土木用途に利用されているが、これまで医療用途としての利用例はないため、生体中での分解・吸収挙動と分解産物が引き起こす炎症反応等に関する知見もほとんどない。そこで本研究では、ナノファイバー化したPHBHの結晶、配向、幾何構造などの構造が、凍結・融解温度付近の熱的性質と生体中での分解性と細胞に与える生理的な影響を詳細に解析し、凍結可能な生体吸収性足場材料の実現に向けた基礎的知見を集積する。

3. 研究の方法

(1) PHBH ナノファイバーの結晶構造と熱的性質の解析

ナノファイバーについてはフィルム状態とは結晶化度が異なるという報告がある。そこで、エレクトロスピニング法で作製したナノファイバーの繊維径と結晶化度および熱的性質の関係を解明するため、ポリ-L-乳酸(PLLA)を比較対照としてすずめ、電子顕微鏡(SEM, TEM)、X線回折(WAXD)、熱分析(DSC)、動的粘弾性測定(DMA)をおこなった。

(2) PHBH ナノファイバーの生分解性・生体吸収性・炎症性の評価

PHBH ナノファイバーの生体中での分解・吸収挙動については十分わかっていない。分解産物である(R)-3-hydroxybutyrate (3HB)や(R)-3-hydroxyhexanoate (3HH)は、乳酸やグリコール酸より酸性度が低いため、炎症性が低いと予想される。そこで生体吸収性について、生理条件下での分解試験、およびラットへの埋込試験をおこない、分解速度や分解様式等の詳細な分析を実施し、前項目で得られた高分子物性に関する知見と関連づけて解析する。

(3) PHBH ナノファイバー表面への細胞接着性解析

PHBHを医療材料として応用するにあたり材料表面への細胞接着は重要である。PHBHは疎水性の高い高分子であるため、細胞が接着しにくい表面を有するが、酸素プラズマ処理等で改質することで細胞接着が改善されることをこれまでに見出している。本課題では、定量的にPHBHファイバーの表面へのタンパク質の吸着および細胞接着に関する検討を高分子構造の観点から実施し、適切な表面処理方法を検討することで、細胞接着足場材料および凍結用基材としての利用の可能性を探る。

(4) PHBH ナノファイバーを利用した凍結可能な細胞足場材料に関する研究

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

得られた知見を活かし、PHBH ナノファイバーの医療材料への応用、とくに細胞凍結時の足場材料としての有効性を検証する。これに関しては PHBH ナノファイバーを用いた生体埋込可能な培養基材の設計と、これの細胞凍結条件の検討をおこなう。

4. 研究成果

(1) PHBH ナノファイバーの結晶構造と熱的性質の解析

PHBH ナノファイバーの高分子構造・物性に関する分析をおこなったところ、PHBH ではナノファイバーとフィルム状に成形した場合では高分子の結晶構造に顕著な差がないと考えられた。一方で PLLA では両者に大きな違いが見られ、ナノファイバーでは高い結晶化度を示した。

(2) PHBH ナノファイバーの生分解性・生体吸収性・炎症性の評価

生体環境下での長期試験に相当する加速試験により分解性・炎症性について検討をおこなった。得られたデータをこれまでの WAXD, DSC, GPC 測定により得られた高分子構造に関する知見と統合し、生体中では PHBH では生体中で高分子主鎖がランダムに開裂していくという分解様式に関するメカニズムを提案した。この分解様式は PLLA とは異なっていた。また、ラットへの最大 6 ヶ月間の埋込試験を実施し、中・長期の生体中での挙動(分解性・吸収性・炎症性)を、GPC, WAXD, DSC, 免疫染色により、分子量分布、結晶化度、炎症性について評価し、PLLA と比較した。その結果、PHBH では PLLA より炎症性が低いことが示された。

(3) PHBH ナノファイバー表面への細胞接着性解析

PHBH および比較材料(PLLA, PU, PS)についてフィルムおよびナノファイバーの加工形態で基材を作成し、それぞれの基材への細胞接着、細胞増殖、およびこれらを細胞凍結足場材料として使用した場合の細胞生存率を評価した。基材を凍結させず、20 または 4 に冷却した際の細胞の剥離の様子を観察した。PU, PHBH 基材上でファイバーに沿って伸長している細胞は、20 に静置しても 37 の状態と変わらず細胞が伸長していたままであったが、PLLA, PS 基材上で培養した細胞は、室温では細胞が収縮していた。さらに、4 に静置したところ、PLLA 上では、さらに収縮し、PS 上では細胞は剥離し、凝集塊を形成した。

(4) PHBH ナノファイバーを利用した凍結可能な細胞足場材料に関する研究

3T3 細胞を用いた凍結・融解後の生存率評価の解析より、凍結保存足場材料としての性能評価をおこなった。PS ナノファイバーと比較し、ポリマーのガラス転移温度が足場材料としての性能に影響している可能性を見出した。また 3 次元的な足場材料の設計をおこなった。

37 で培養した細胞を基材上で凍結し、凍結前後の細胞の生存率を測定したところ、融解直後の生存率は PU および PHBH 基材では、80% の高い細胞生存率を示したのに対し、PLLA および PS 基材は、50% と低い細胞生存率を示すことがわかった。

3T3 細胞を用いた凍結・融解後の生存率評価の解析より、これまでに当研究室が検討してきた PU ナノファイバーと同様に凍結保存足場材料として利用できることを見出した。

以上の結果から、PHBH の生分解性挙動から、埋込材料として有効であることが示された。PHBH 基材は、冷却および凍結後も細胞接着を維持できるため凍結基材として有用であると期待された。さらに凍結融解によって低い細胞生存率、接着細胞数を示した PLLA および PS 基材は、低温で収縮した細胞の接着が弱くなり、凍結融解によって細胞が剥離、収縮による物理的ストレスがかかるメカニズムが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- (1) Y. Wakuda, S. Nishimoto, S. Suye, S. Fujita, Native collagen hydrogel nanofibres with anisotropic structure using core-shell electrospinning, *Sci. Rep.*, 8, 6248, 10p (2018), 査読有
DOI: 10.1038/s41598-018-24700-9
- (2) O. Batnyam, S. Suye, S. Fujita, Direct cryopreservation of adherent cells on an elastic nanofiber sheet featuring a low glass-transition temperature, *RSC Adv.* 7 51264-51271 (2017), 査読有
DOI: 10.1039/C7RA10604A
- (3) 加藤 新, 末 信一郎, 藤田 聡, エレクトロスピンニング法により作製したコラーゲン/ポリ乳酸ナノファイバーの芯鞘構造の形成効率の評価, *高分子論文集*, 73, 366-369 (2016), 査読有
doi: 10.1295/koron.2015-0086

[学会発表](計 1 1 件)

- (1) S. Fujita, Electrospun Co-axial Nanofibers as DDS Matrix for Tunable Release, 2018, Taiwan-Japan- Korea Trilateral Conference on Nanomedicine, 2018

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

- (2) T. Hibino, S. Suye, S. Fujita, PLLA-based core-shell nanofibers for long-term drug release, 2018, 5th TERMIS World Congress
- (3) S. Fujita, N. Marubuchi, T. Nakaji-Hirabayashi, Y. Kimura, S. Furukawa, H. Kitano, S. Suye, Degradation and inflammatory response of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) under physiological conditions, Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress, Montreal (2016)
doi: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00515
- (4) 日比野 隼也, 末 信一郎, 藤田 聡, 生分解性ナノファイバーからの薬剤放出挙動の解析, 平成 30 年度高分子学会北陸支部研究発表会, 2018
- (5) 丸山 拓人, 末 信一郎, 藤田 聡, ナノファイバー基材上での接着細胞の直接凍結保存の影響の解析, 平成 30 年度繊維学会秋季研究発表会, 2018
- (6) 日比野 隼也, 末 信一郎, 藤田 聡, 芯鞘ナノファイバーを用いた薬剤徐放の時間的制御, 平成 30 年度繊維学会秋季研究発表会, 2018
- (7) 日比野 隼也, 末 信一郎, 藤田 聡, 長期薬剤放出制御を目的とした担持ナノファイバーの創製, 第 67 回高分子学会年次大会, 2018
- (8) 丸山 拓人, 小暮 麻心, 末 信一郎, 藤田 聡, ナノファイバーシートを用いた接着細胞の直接凍結による細胞培養の高効率化, 日本バイオマテリアル学会第 6 回北信越研究発表会, 2017
- (9) 丸淵 那々, 中路 正, 北野 博巳, 藤田 聡, 末 信一郎, ポリ(3-(R)-ヒドロキシ酪酸-3-(R)-ヒドロキシヘキサ酸)(PHBH)の生体吸収性の評価, 日本バイオマテリアル学会第 5 回北陸信越若手研究発表会, 長岡 (2016)
- (10) 日比野 隼也, 末 信一郎, 藤田 聡, 薬剤徐放のためのコラーゲン/PLLA 芯鞘ナノファイバーの創成と機能評価, 平成 28 年度高分子学会北陸地区若手研究会, 福井 (2016)
- (11) 日比野 隼也, 末 信一郎, 藤田 聡, 薬剤徐放のためのコラーゲン/PLLA 芯鞘ナノファイバーの創成と機能評価日本バイオマテリアル学会第 5 回北陸信越若手研究発表会, 長岡 (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。