

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19907

研究課題名（和文）新たな組織工学足場材料としてのメカノ・ケミグラジエントゲルの開発

研究課題名（英文）Mechano- and chem-gradient gel for novel scaffold using in tissue repair

研究代表者

中路 正（Nakaji-Hirabayashi, Tadashi）

富山大学・学術研究部工学系・准教授

研究者番号：10543217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究のキーポイントは、生体の軟骨組織が傾斜階層構造を有することに着目し、その軟骨組織を高分子ゲルをトリガーとして、生体外で人工組織として構築できる高分子ゲル材料を構築する点である。3年間の研究成果として、軟骨細胞の傾斜構造を構築させるためのトリガーとなるメカノグラジエントゲルの創製に成功した。今後、更なる改良・改善は必要であると考えられるが、本成果は、傾斜構造を有する軟骨組織の生体外での構築に向けての大きな一歩であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、変性軟骨疾患の再生医療の発展に貢献する可能性を秘めた萌芽的研究であり、社会的意義が非常に大きな研究であることはもちろんのこと、高分子ゲルと細胞を組み合わせ、生体組織にできる限り近づけた人工組織を、生体外で構築できる方法の提案につながる可能性を秘めており、再生医学・バイオマテリアル工学の発展にとっても非常に意義のある研究課題といえる。

研究成果の概要（英文）：The key point on the research is the construction of gel material for chondrocytes tissue having the hierarchical structure. In the research, we could develop the mechano-gradient gel to work as trigger for constructing the chondrocytes tissue having the hierarchical structure. Although this gel material need the improvement and optimization for effective differentiation from hMSCs to chondrocytes, we got the important and great achievement for the in vitro construction of the artificial cartilage.

研究分野：再生医工学

キーワード：メカノケミグラジエントゲル 軟骨再生 傾斜階層構造 人工組織体 高分子ゲル

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、社会の高齢化に伴い劇的な増加が予想され、その完治療法の確立が強く望まれており、細胞生物学 [Stem Cells Trans. Med., 2017, 6, 1295-1303]、組織工学 [Biomater. Sci., 2017, 5, 613-631] 両面から研究・開発が進められているが、継続的な治療や数年での再置換術を必要とし、根本治療法の確立には至っていない。その大きな原因は、組織の傾斜・階層構造 [Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24, 1317-1329] が再現できないことにあると考えられており、この問題を克服できる手法・技術の開発が完治療法の確立には不可欠とされている。また、軟骨組織が 0.08 ~ 2.1 MPa のヤング率を有する [J. Orthop. Res., 1997, 15, 499-506] という知見を踏まえたヒドロゲル設計に関する報告 [Biomaterials, 2012, 33, 6682-6690] もあるが、マクロの力学強度のみに焦点が当てられ、細胞が感知するミクロの力覚に関する視点が欠けている点も治療に結びついていない原因の一つと考えられる。

関節軟骨のみならず、生体内のほとんどの組織は、傾斜・階層構造を有しており [J. R. Soc. Interface, 2012, 9, 2749-66]、そのような構造の形成には、タンパク質やホルモン等の生化学的刺激のみならず、組織の構造的・力学的刺激が重要であるといわれる。つまり、力学的特性を深く理解しなければ、組織再生には直結しない。これまで代表者は、細胞移植用タンパク質担持ゲルによる細胞制御に関する研究を行ってきたが、細胞の厳密な制御には、力学的刺激の制御が不可欠であることを強く示唆する結果を得ており、力学特性制御の重要性は明らかである。

メカノバイオ領域において、材料のバルク硬度と組織制御 [Matrix Biol., 2011, 30, 363-368] や、ミクロ領域で一細胞が感知する硬度に関する知見 [Cell, 2006, 126, 645-647] が報告されている。それぞれ非常に有益な知見ではあるが、これらの知見を取り入れ材料設計を考えた場合、我々は、マクロの硬度とミクロ領域で一細胞が感じる硬さを同様に議論すべきか否かという問いに対する答えを見出せていない。マクロの硬さで議論される組織工学研究と、一細胞レベルでの力学に関するメカノバイオロジー研究では、考え方に乖離があると考えられる。しかしながら、ミクロとマクロの硬さと細胞制御との関係を統合的に理解する研究はほとんどない。

加えて、材料 - 細胞間、細胞 - 細胞間の関係性を解明しようとする研究のほとんどが力学的性質あるいは化学的性質のみに特化して議論されており [Can. J. Chem. Eng., 2010, 88, 899-911]、メカニカルとケミカルの両面を統合的に議論されることが少ないことも有効なバイオマテリアル創出が進まない原因であると考えられる。

2. 研究の目的

研究の『大目標』は、力学的・化学的な傾斜構造を有する三次元ヒドロゲル (メカノ・ケミグラジエントゲルと名付ける) の創製と、そのゲルの組織再生への応用である。特に、傾斜・階層構造を有する軟骨組織の再生を実現するためには、傾斜構造制御が可能な材料が強く求められている (図 1) ことから、本課題は、軟骨再生治療における最大の課題を克服することにつながると考えられる。

大目標の達成に向け、本研究課題は、傾斜構造を有する三次元ヒドロゲルの構築手法の確立 (できる限り簡便な手法により生体内での使用が可能な材料を構築する) を達成目標とする。本材料設計の最適化は、ナノ・ミクロレベルでの細胞が感じる力覚とマクロ・バルクでの材料力学強度との相関を統合的に理解し、グラジエントゲル中の軟骨細胞やその基となる間葉系幹細胞の分化や成熟化の制御の効率性を評価し、その知見を材料設計にフィードバックすることで行う。この傾斜ゲルは、次世代軟骨再生の根幹を担い、さらに再生医工学・組織工学・高分子ゲル科学を新たなステージへ導くことにもつながり、波及効果は極めて大きい。

3. 研究の方法

本課題の鍵は、傾斜ゲル構築のための高分子設計と、マクロとナノ・ミクロ硬度における細胞力覚の統合的理解であり、これまでの組織工学の考え方には無い挑戦的な戦略である。

【1】メカノグラジエントゲル構築

アイデア：高分子の分子量分布を応用した力学的傾斜構造を持つメカノグラジエントゲル創製

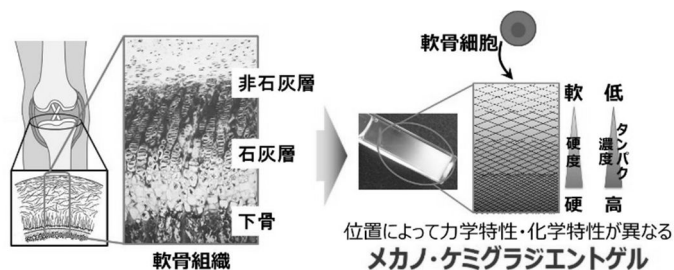


図 1. メカノ・ケミグラジエントゲル開発のコンセプト。

DNA や細胞の分離に用いられる密度勾配遠心分離法をヒントに着想した方法であり、超遠心分離により高分子の密度(分子量)を利用して傾斜を形成させる(図 2)。ゲル架橋点は、コイルドコイル形成ペプチドを採用する。側鎖に導入したペプチドは、静止環境で二量化し、逆に強い外力で解離する。この設計により力学強度の傾斜を有するゲルを構築できると考え、分子量・ペプチド架橋点数の制御により最適化を図る。

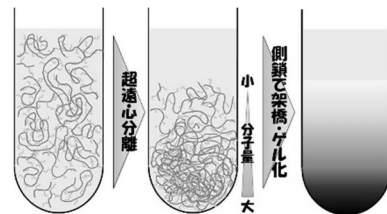


図 2. メカノグラジエントゲルの超遠心分離による調製。

【2】ナノ・マイクロの細胞力覚の理解, マクロの硬度と細胞挙動の相関調査

【3】ナノ~マクロの細胞力覚の統合的理解と材料設計へのフィードバック

アイデア: バルク (マクロ) 硬度と一細胞レベル (ナノ・マイクロ) の力覚との相関関係の解明

一細胞レベルが感じる力覚とバルクの硬さは異なると考えられるが、従来の組織工学では、ほとんど議論されていない。やはり、マクロレベルとナノ・マイクロレベルの細胞力覚の相関性に関する知見を踏まえた材料設計が必要であると考えられる。そこで、(1) 細胞外微小環境(ナノ~マイクロ)の力学環境下における一細胞/細胞集団の力覚の解明、(2) バルク(マクロ)環境における細胞力覚・

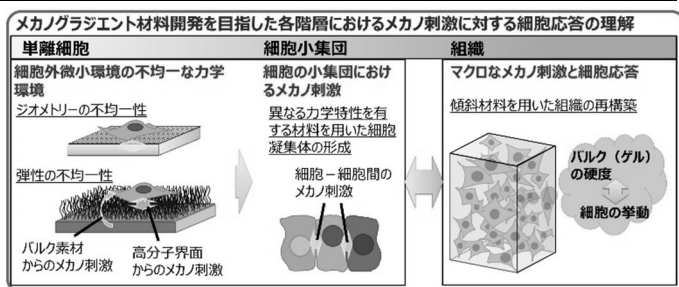


図 3. ミクロとマクロのメカノ刺激と細胞応答を統合的に理解するための研究コンセプト。

機能評価により、ナノからマクロの細胞力覚を階層的に調査して統合的に理解し、傾斜構造ゲルの構築にフィードバックする。特に、細胞が感じる力覚を時間応答(細胞の力覚の感知時間軸とシグナル伝達や細胞変化のタイムスケール)と空間応答(材料硬度のレンジ、細胞の硬さ認識と動き・遊走)の観点から考察し、ミクロとマクロ刺激の関係性理解につながる張力ホメオスタシスに関する知見を集積する。

【4】メカノ・ケミグラジエントゲル構築, in vitro 傾斜軟骨モデル構築

アイデア: タンパク質アンカーリング技術を応用したメカノ・ケミグラジエントゲルの創製

細胞への化学的シグナル伝達能を有するゲルへの拡張は、タンパク質・機能性ペプチドのアンカーリングにより行う(図 4)。これにより、高分子網目密度に比例したタンパク質濃度のグラジエントを形成できる。ゲルのベース素材は、ヒアルロン酸やコラーゲン、生体物質非応答性を有する双性イオン型高分子を候補とする。よって、ファージディスプレイ法により結合ペプチドを探索する。一方、細胞制御因子は、軟骨への初期・中期・後期分化に作用するタンパク質を複数種選定する。in vitro におけるゲル中での細胞挙動を調査し、傾斜・階層構造細胞組織体の構築を進める。

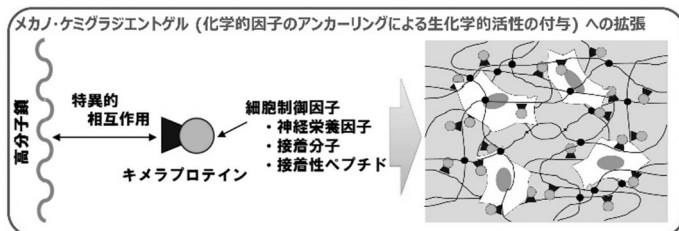


図 4. メカノ・ケミグラジエントゲル創製の鍵を握るタンパク質アンカーリング技術。

4. 研究成果

本研究課題では、軟骨損傷の根本治療法の確立に大きく貢献することのできる細胞-材料複合人工軟骨組織の構築を最終目標に掲げ、これまでには困難とされてきた軟骨の傾斜階層構造を模倣した人工軟骨を構築することを目的として研究を進めた。ここで、傾斜階層構造の構築を実現させるアイデアとして、「メカノ・ケミグラジエントゲル」を創生し、それをトリガーとして分化軟骨組織体の傾斜構造を誘起させようと考えた。メカノ・ケミグラジエントゲルの創製およびそれを用いた人工軟骨組織体の構築に向けて以下の研究成果を挙げてきた。

【細胞の捕捉・ゲル内での制御を担う機能性ペプチド・タンパク質の合成】

最終的に構築するメカノ・ケミグラジエントゲルには、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) を選択的に捕捉・生存させることのできる機能、分化を誘導する機能を付与することを考えた。

そこで、hMSC を捕捉するために、CD44 に特異的に相互作用することのできるペプチド配列をファージディスプレイ法を利用して決定した(図 5, 6)。ファージディスプレイ法により CD44 に特異的に相互作用するペプチドは 8 種類見つかったが、この結果から、N 末端に Gln (Q) が存在すること、および Trp (W) と Phe (F) が存在することが重要ではないかと考えられた(図 5)ことから、図 6 のように、一部異なるアミノ酸が含まれるペプチド配列で hMSC の接着につい

て評価した結果, QQGWFP の配列が hMSC を捕捉する上で最も効果的なペプチド配列であることが見出された。このペプチドを高分子に担持できるように 図 7(a) に示すような CD44 の末端にビニルモノマーを有する CD44 結合ペプチドモノマー (PP) を合成し, 高分子への導入を行った (詳細は後述する)。

また, 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化を担うタンパク質として, TGFβ がよく知られていることから, 大腸菌を用いた遺伝子工学技術を利用して, C 末端側に (Gly-Ala)₃-AHA リンカーとヘキサヒスチジンリンカー (His₆) を有する TGFβ キメラタンパク質を合成した。大腸菌発現は, シャペロン共発現系 (BL21 (DE3) codonplus - pGro7 co-expression) を用いて行い, 可溶性成分として得た TGFβ-(Gly-Ala)₃-AHA-His₆ を His Trap カラムおよび分子量分画により精製した。得られたタンパク質は, SDS-PAGE 分析により純度が 85% であることが分かった。また, リコンビナント TGFβ (Wako Chemical Industries, Inc.) と比較対照として, hMSC から軟骨細胞への分化誘導効率により評価した。その結果, リコンビナント TGFβ に比べ, 若干活性は低かった ($75.2 \pm 5.5\%$, $n=3$) が, 現状では使用できると判断し, 今後のメカノ・ケミグラジエントゲルにおいて使用することとした。

【ペプチド担持高分子の創製】

まず, hMSC を捕捉し増幅できる足場材料の基となる高分子を合成した。この高分子は, 細胞接着を抑制することが分かっているヒドロキシプロピルアクリルアミド (HPA) 高分子鎖を架橋しゲル化させることのできるベンゾフェノンアクリルアミド (BPA), CD44BP を側鎖に有するモノマー (PP) の三元共重合体である。

オリゴペプチドが維持される状態での重合を行うため, VA-44 開始剤を用いて, 反応温度を 45 °C としてフリーラジカル重合により高分子を得た。BPA の含有率を 1% に固定し, PP の含有率を変化させた高分子を得た。モノマー組成比, および分子量は表 1 に示す通りである。後述するように, まず二次元平面上での本ポリマーの hMSC 捕捉能, および最適な高分子組成比を見出すための評価を行った。

【ペプチド担持高分子素材上での細胞捕捉および軟骨分化】

ゲル作製のベースポリマーの性能を評価するべく, 二次元平面上での種々特性評価を実施した。

二次元表面は, まずスピニング法により種々高分子をガラス基板または PET シート上にコーティングし, その後 UV 照射を 4 min 行うことにより架橋を行うことにより作製した。生理食塩水または細胞培養液に浸漬させた前後で膜厚が変化しないことを確認することによって, 安定な架橋高分子フィルムが形成できているかを評価している (表 1, Thickness を参照)。

作製した各種架橋高分子フィルムへの hMSC の選択捕捉能を評価するために, 図 8 に示すように, HepG2 細胞および HEK293 細胞を対照細胞として用いて, その接着状態を調査した。その結果, CD44BP の含有率が増加するに伴い hMSC の捕捉数が増加し, 且つ CD44BP の存在有無に関わらず, HepG2 細胞および HEK293 細胞の接着を抑制することができることが明らかとなった。また, CD44BP 担持モノマーの組成が 8 ~ 16 mol% が最適 (8 mol% と 16 mol% の架橋高分子フィルム上への hMSC 接着数に有意差はなかった) であると考えられる結果を得た。これらの結果から, グラジエントゲル調製では, CD44BP 担持モノマーの組成比を 8 mol% に固定して実験を行うこととした。

CD44BP 担持モノマー 8 mol% 含有の架橋高分子フィルム上での軟骨への分化誘導について評価した。実験を進める上で, 我々は, hMSC から軟骨細胞へ分化させると, CD44 は細胞膜から消失するため, 細胞が剥離するのではないかという懸念を持っていたが, 分化誘導後でも細胞が剥離せず, 架橋高分子フィルム上で培養できることが示された。この考察の詳細は, 成果論文に記載したが, 簡潔に説明すると, HPA ユニットは, 生体物質非応答性を発現することで知られているが, その効果は培養初期では発揮され, hMSC のような CD44 抗原を有する細胞以外は接着できず排除される一方で, hMSC が接着・増殖した後に分化誘導を行うと, 分化細胞の足場タンパク質が吸着することにより, 分化後も細胞が接着し続けていると考えられる。これを裏付け

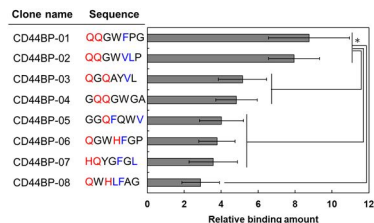


図5. ファージディスプレイ法を利用して, CD44固定基板に相互作用するファージの定量結果および, そのクローンが持つアミノ酸シーケンス。

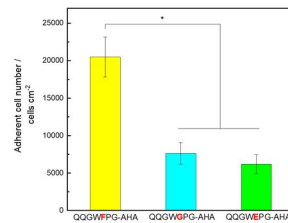


図6. CD44 に特異的に結合するペプチド候補3種類を担持させたガラス基板への hMSC の接着数。

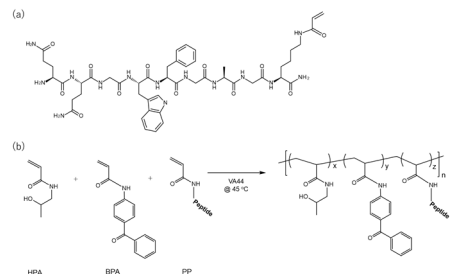


図7. (a) CD44結合ペプチド (CD44BP) の構造。 (b) CD44BP担持高分子 (HPA-BPA-PP) の合成反応式。この高分子は, UV (200 ~ 400 nm) を短時間照射すると, 炭化水素鎖 (R/P/A-主鎖) と架橋できる BPA を有しており, この BPA を架橋点としてゲルを作製する。

表1. 各種高分子の組成比, 分子量・分子量分散度, 高分子でコーティングした二次元表面のペプチド存在量, 膜厚および水濡れ接触角。

HPA:BPA:PP ^a	M_n	M_w/M_n	Peptide amount ^b / nmol cm ²	Thickness ^c / nm	Contact angle ^d / degrees
99:1:0	138000	1.7	0.88 ± 0.05	37.6 ± 7.5	38.4 ± 0.6
97:1:2	151000	1.6	1.55 ± 0.06	34.3 ± 1.9	40.7 ± 0.6
95:1:4	123000	1.6	1.55 ± 0.06	27.4 ± 2.6	43.4 ± 0.6
91:1:8	110000	1.6	2.18 ± 0.08	27.5 ± 5.1	46.6 ± 0.6
83:1:16	73000	1.4	2.33 ± 0.02	23.5 ± 4.0	51.6 ± 0.8

^aInitial monomer feeding ratio. ^bPeptide amount displaying on the coating surface. ^cDry thickness. ^dStatic contact angle obtained using a water droplet. A bare PET film (68.9 ± 1.1°).

るために、架橋高分子フィルムを長期間（3 週間）分化誘導培地に浸漬させておくと、タンパク質吸着量が増加する結果を得た。この結果から、HPA ユニットは培養初期ではタンパク質吸着を抑制するが、長期間のタンパク質吸着は抑制できない、つまり逆に言えば、HPA ユニットを用いていることから、分化誘導細胞については、足場タンパク質が吸着することで、CD44BP によって選択的に捕捉した細胞を分化させることができることが明らかとなった。我々は、hMSC を選択捕捉し、軟骨細胞へ誘導させる段階でも足場となりうる高分子素材とするべく、軟骨細胞捕捉能を新たに高分子に付与する改良をせねばならないと考えていたが、上記の結果からその必要がなく、選択的に hMSC を捕捉、そして軟骨分化ができる材料として本高分子素材が非常に優れていることが分かった。

【メカノグラジエントゲルの創製】

前述に示す通り、hMSC を選択的に捕捉できるゲル構成素材の創出、そしてその素材上での軟骨分化が可能であることを見出した。それらの結果を踏まえ、我々は、メカノグラジエントゲルの創製を進めた。

研究構想でも記載した通り、我々は、ポリマーの分子量分布を利用することで硬度のグラジエントを有するゲルの作製を目指した。ま

ずゲル前駆高分子である 8 mol% PP を含む三元共重合体について、合成後再沈殿精製のみとし、分子量分画精製を行わないことで、分子量分布が 3.0 以上の高分子を得た ($M_w = 89000$, $M_w/M_n = 3.48$)。その高分子を 1% DMSO を含む水に溶解 (30 wt% 高分子溶液) させ、石英製の遠沈管に添加 (5 mL, 直径 15 mm × 高さ 30 mm の円筒状のゲルを得られるよう遠沈管および溶液量を選定した) し、遠心分離 (16000 rpm, 30 min) を行った後、UV 照射 (20 min) を行い架橋を行った。その結果、遠沈管の底部ではゲル化が進行していたが、上部ではほとんどゲル化が行われず、明確に硬度の異なる円筒状ゲルは得ることができなかった。また、遠心分離の条件を 16000 rpm で時間を変更し、また 8000 ~ 16000 rpm に変化させ時間を 30 min として行う等、様々な条件でのゲル化を試みたが、目標とする円筒状ゲルを得ることができなかった。これらの結果から、遠心分離の速度および時間の最適化、またゲル前駆高分子の分子量および分子量分布の関係、さらには架橋点となる BPA の含有率の最適化が必要であると考えられ、研究期間終了後も引き続き条件探索を進めていく。

遠心分離を利用したグラジエントゲルの創製について、条件探索が必要になったのを受け、均一なゲル前駆高分子溶液で UV 照射時間を変化させることによるグラジエントゲルの作製についても検討を開始した。石英基板上にシリコンシートでウェル (30 mm × 20 mm × 5 mm) を構築し、ゲル前駆溶液 (30 wt%) を添加して UV 照射 (30 min) を行った。UV 照射を行うさい、遮光板を少しずつずらし照射時間を変化 (シャッター移動速度: 1.2 mm/min) させてゲル化させることによりグラジエント構造を持つゲルの作製を試みた。その結果、図 9 に示す通り、硬度が異なるゲルの作製に成功した。また、ゲル前駆高分子を完全に分散させるため (BPA ユニットが水中では凝集するため、架橋反応の進行が悪化する) 添加している DMSO を除去した後でもしっかりしたゲルが作製されていることが示された。

また、このゲル作製の条件において、hMSC に問題がないかを調査するべく、前述の条件 (30 min) で hMSC に UV 照射を行い、その後の増殖および分化を調査した。その結果、UV 照射直後の生存率は $72.4 \pm 8.1\%$ ($n = 3$) であり、その細胞のダブリングタイムは、 29.8 ± 3.3 h (未処理の hMSC は 27.4 ± 1.9 h, $n = 3$) であった。また骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞への分化を未処理細胞と比較したところ、ほぼ優劣は無く多分化能も維持されていることが分かった。よって、細胞を内包させた状態でグラジエントゲルを作製することができると判断し、現在、hMSC を内包させたメカノグラジエントゲルの創製に取り組んでいる。

【今後の展望】

本研究課題は、まだまだ道半ばではあるが、メカノケミグラジエントゲルの創製に向けて足掛かりとなる重要な成果を挙げることができたと考えており、本研究課題を科学研究費・基盤研究に昇格させ研究を継続していきたいと考えている。

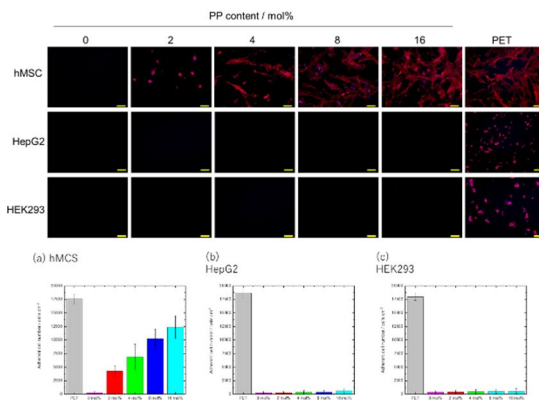


図8. 各種CD44BP含有率の異なる架橋高分子フィルム上への細胞接着評価。CD44BP による選択捕捉を評価するため、hMSC、HepG2 細胞および HEK293 細胞を用いて、それぞれの細胞の接着を評価した。また、CD44BP の最適含有率を評価した。

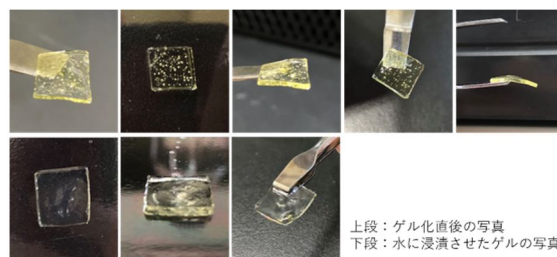


図9. UV 照射時間を変更させて作製したメカノグラジエントゲルの状態。ゲル化時に DMSO を添加していることから、最終的に水で洗浄・置換を行いゲルの状態を観察した。(下段写真)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Chiaki, Nakaji-Hirabayashi Tadashi, Nishijima Nanami, Nonsuwan Punnida, Toh Rou Jun, Kowalczyk Wioleta, Thissen Helmut	4. 巻 120
2. 論文標題 Ultra-low fouling photocrosslinked coatings for the selective capture of cells expressing CD44	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 111630 ~ 111630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.msec.2020.111630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松村 和明 (Matsumura Kazuaki) (00432328)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (13302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストリア	CSIRO Manufacturing		