

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17104

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0381

研究課題名（和文）神経組織再生へのケイ素化合物の影響解明と新規神経組織再生材料の創製

研究課題名（英文）Clarification of the effect of silicon compound on nerve regeneration and preparation of ner nerve conduit

研究代表者

城崎 由紀（Shirosaki, Yuki）

九州工業大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：40533956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,600,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：ケイ素は人体に必須の微量元素であり、結合組織中ではオルトケイ酸として存在している。さまざまなシランカップリング剤、またはシリコンアルコキサイドを使用し、キトサン-シロキサン複合体を作製した。複合体からのケイ素を含む分解物の構造は、飛行時間型質量分析法で調べ、生物学的評価は骨芽細胞、神経細胞、およびマウス後根神経節によって実施した。ケイ素を含む分解物の構造は出発組成に依存し、高分子量の分解物は、グリア細胞の増殖を抑制し、マウス後根神経節の神経突起伸長は、低分子量の分解物によって促進された。これらの結果は、異なる構造のケイ素化合物が、それぞれの神経細胞・組織に対して異なる効果を示すことを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞の活性・分化や骨組織の再生に対するケイ素濃度の影響のみを議論している限り、シロキサン構造を有する足場材料に関して新しい材料設計指針を打ち立てることはできない。本研究結果から、シロキサン結合を含む複合体から溶出したケイ素化合物の構造を飛行時間型質量分析法によって、予測できることを示唆した。この構造の違いは、骨芽細胞の増殖・活性に大きく寄与した。一方、神経細胞の場合には、骨芽細胞ほど、構造の違いに対する細胞応答性は観察されなかった。このようなケイ素化合物の構造状態と細胞応答性の結果は、新しい材料設計指針および安全性の指標となり得る。

研究成果の概要（英文）：Silicon is an essential trace element in the human body and it exists in connective tissue as aqueous orthosilicic acids. We prepared solid porous chitosan-siloxane hybrids with different silane coupling reagents or silicon alkoxide. The structures of the degradation products with Si from the hybrids were examined by the time of flight mass spectrometry, and the biological assessments were conducted by osteoblastic cells, neuron cells, and ex-vivo explants of dorsal root ganglia. The structure of the degradation products with Si depended on the starting composition. Results showed that glial cell proliferation was lower in the medium with the higher molecular weight degradation products with Si. Moreover, motor cell line differentiation and neurite outgrowth of dorsal root ganglion explants were improved with the lower molecular weight degradation products with Si. The results obtained could be useful to design a new nerve regeneration scaffold including silicon components.

研究分野：生体材料学

キーワード：神経再生 ケイ素化合物 シュワン細 マウス後根神経節 モーター細胞 ヒドロゲル

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

ケイ素 (Si) は、ケイ酸 $[\text{SiO}_x(\text{OH})_{4-2x}]_n$ として鉱物や土壌中に極めて大量に存在する元素であるが、ヒト血漿内には、可溶性のケイ酸の形で通常約 0.5 mg/L 含まれている。1970 年代頃から各器官におけるケイ素、つまりケイ酸の存在が明らかにされ (Carlisle, *Science*, 1972 他)、特に骨置換を目的とした生体活性シリケートガラス (バイオガラス)、ケイ酸塩あるいはケイ素置換ヒドロキシアパタイトを用いた研究によって、その生化学的作用が明らかにされてきた (Hench, *Calcif Tissue Int* 2000 他)。例えば、ケイ酸ナトリウムを培地中に添加し、ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) を培養した研究では、1~25 μM の濃度において、骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) やオステオカルシン (OC)、タイプ I コラーゲン等の発現量を高めることが報告されている (Costa-Rodrigues, *Stem Cells, Int* 2016)。バイオガラスからの溶出物を用いた実験においても、培地中のケイ素濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の際にインシュリン様成長因子 II (IGF-II) や細胞外基質の遺伝子発現が高く、石灰化因子を必要としない細胞による石灰化が報告されている (Xynos, *J Biomed Mater Res* 2001)。

このようなケイ酸が生体組織、特に骨組織において重要な役割を持つという研究結果から (Henstock, *Acta Biomater*, 2015 他)、多くの研究者達がケイ素化合物と生分解性材料を複合化した骨組織再生足場材料の開発を試みてきた (Jones, *Acta Biomater*, 2015 他)。複合体内のケイ素周囲の重合構造は固体核磁気共鳴法 (固体 NMR) によって明らかにされ、その構造と複合体の生体内分解性や機械的強度との関係が議論されてきた。さらに、これら複合体に関しても分解後に培地中に溶出したケイ素濃度と細胞応答性に関して、0.075 mM から 7.2 mM の範囲で骨芽細胞に有効であると報告されている。

しかし、ケイ素濃度のみで細胞応答性の機構を議論している限りケイ素化合物の構造と組織再生との関係は不明なままで、新たな材料設計指針を提唱することはできない。例えば、材料の破壊強度・柔軟性あるいは分解性を制御するために、シロキサン ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$) 構造を含む複合体が多く研究されているが、複合体から溶出したケイ素化合物は、ケイ素周囲の構造がケイ酸とは異なり、その重合状態も種々多様で、ケイ酸と同様の機構で細胞と相互作用しているとは言えない。研究代表者らはこれまでにケイ素周囲に炭素を 1 つ、酸素を 3 つ有する 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GPTMS) とケイ素周囲すべてが酸素のテトラエトキシシラン (TEOS) を含むキトサン複合体の構造が、骨芽細胞の働きや各組織の応答性に、それぞれ異なる影響を与えることを明らかにしてきた (Shirosaki, *J Ceram Soc Jpn* 2010 他)。さらに、複合体から作製したヒドロゲルの研究から、出発原料組成比が異なると溶出したケイ素濃度が同じでも、骨芽細胞に異なる影響を与えるという結果を得た (Shirosaki, *J Biomed Mater Res Part A* 2015)。以上のことから濃度だけではなく溶出したケイ素化合物の重合構造が細胞応答性に影響を与えていることは間違いない。

この仮説を明らかにする為に、ケイ素周囲に炭素を 2 つ、酸素を 2 つ有する 3-グリシドキシプロピルジメトキシシラン (GPDMS) を上記の系に加え、異なる構造を有する複合体から溶出したケイ素化合物が骨芽細胞の応答性にどのような影響を与えるかということ調査した (日揮・実吉奨学会 2017 年度研究助成)。GPTMS, GPDMS とともに、キトサンに対する出発組成比が小さい場合に、骨芽細胞の増殖・早期の分化活性 (アルカリフォスファターゼ活性) に作用することが分かった。ケイ素化合物の出発原料組成比が小さいということは、培地中に溶出したケイ素化合物の重合度も低いと考えられ、溶出したケイ素化合物の分子量が異なる、つまり重合構造によって細胞応答性が異なるのではないかと予想している。

上記仮定を明らかにする為にこれまでに様々な分析技術を試行してきたが、培地中に存在するケイ素化合物は溶液中の濃度がケイ素換算で 0.3 mM 以下と大変希薄な為、構造決定には至っていなかった。一方、低分子量ケイ素化合物の構造の決定に、飛行時間型質量分析法 (TOF-MS) を用いた試みが報告されている (Nam, *J Mater Chem* 2010 他)。そこで、基課題研究にて、TOF-MS を用いた培地中のケイ素化合物の構造決定を試み (図 1)、さらにその構造と元々の複合体の重合構造との関係、細胞応答性との関係を明らかにする研究を進めている。医療分野におけるケイ素化合物の利用に関して大きな知見・指針となる。

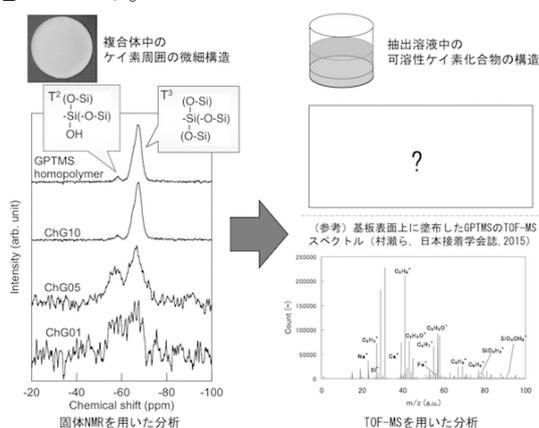


図 1 複合体中 (固体 NMR) と抽出液中 (TOF-MS) のケイ素周囲の構造を明らかにし、関係性を調べる。

2. 研究の目的

本国際共同研究では、*in vitro*における神経組織再生評価法を用いて、基課題の異なるケイ素化学種に対する神経細胞・神経組織の応答性評価および神経再生用チューブの作製をより迅速に進め、ケイ素化合物を含む新たなファイバーやDRG 培養用マトリックスとなるヒドロゲルの創製に発展させることを目的とした(図2)。神経組織再生に関する基礎および応用に繋がる評価技術を学び、各ケイ素化合物の構造と運動神経系の応答を示す運動神経細胞(NSC34)を用いた神経細胞の分化、およびマウス後根神経節(DRG: Dorsal Root Ganglion, 神経伝達機能に重要な軸索形成や神経細胞に栄養を伝達する機能を有す細胞を含む)を用いた神経再生との関係を見出す。また現在DRG用に用いられているマトリゲル(コーゲン製)は、ゲルの強度が弱く培養後のDRGを固定する際にゲルが壊れ、試料を得るのに高度な技術を必要とする。抽出液の実験から得られた結果にて複合体組成を決定し、DRGを複合体から作製したヒドロゲル中で培養することも試みる。なおファイバーに関しては、紡糸がうまく実施できず、細胞培養に使用できる材料を作製できなかったため、本報告では結果を示さない。

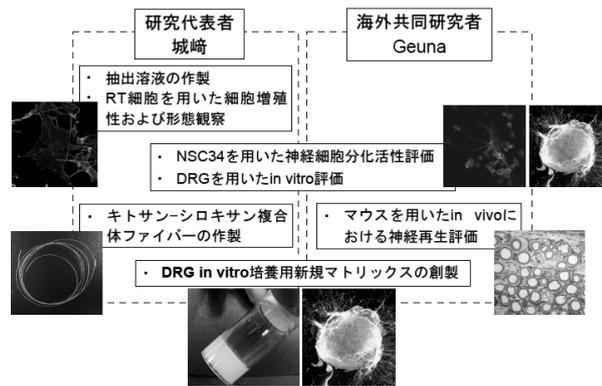


図2 共同研究体制。研究代表者がケイ素周囲の構造を同定し、Geuna 教授らの *in vitro* 評価法を用いて、神経細胞や神経組織に対するケイ素化合物の構造の有用性を明らかにする。その結果を踏まえて複合体ファイバーや新規ヒドロゲルマトリックスを創製する。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

キトサン/酢酸水溶液に各種シランカップリング剤(3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン: GPTMS, 3-グリシドキシメチルジメトキシシラン: GPDMS, トリメトキシシランアルデヒド: TMSA) またはアルコキシシラン(テトラエトキシシラン: TEOS)を添加し、ゾル溶液を作製した。緻密膜は、得られたゾル溶液をポリプロピレン容器に流し入れ、60°Cで熟成した後、60°Cで乾燥させた。多孔質体は、ゾル溶液をポリスチレン容器に流し入れ、-20°Cで凍結した後、凍結乾燥させた。得られた緻密膜および多孔質体は過剰の酢酸を取り除くために、水酸化ナトリウム水溶液および蒸留水にて洗浄させ、それぞれ乾燥させ試料を得た。得られた試料は全てエチレンオキシドガス滅菌によって滅菌した。

(2) Si を含む溶液の作製および構造決定

所定量の試料を超純水に浸漬し、37°Cで1週間静置した。上澄溶液を採取し、シリンジフィルターで濾過滅菌し、抽出溶液を得た。抽出溶液中のSi(IV)濃度が1 μ Mとなるように超純水で希釈した。飛行時間型質量分析計を用いて、溶液中の分解物の分子量を測定し、分子構造を推定した。

(3) Si を含む培地の作製および細胞培養評価

培地中のSi(IV)濃度が所定量となるように、抽出液で培地を作製した。得られた培地を用い、ラットシュワン細胞由来神経細胞RT4-D6P2T, 運動神経細胞NSC34を培養し、細胞増殖性および活性を調べた。

(4) マウス後根神経節を用いた神経組織への適合性評価

(3)と同様にSiを含む培地中で、マトリゲルで固定したマウス後根神経節を培養し、神経突起伸展を観察した。

(5) ハイドロゲルの作製と材料特性評価

塩化物キトサン水溶液に3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、またはトリメトキシシランアルデヒドを添加し、前駆ゾル溶液を作製した。得られた溶液を4°Cに冷却した後、低温を維持したまま所定濃度のグリセリン酸水溶液を加え、ゾル溶液のpHを7.0に調製した。最終混合溶液を37°Cで静置し、所定時間毎に45°傾け、液面が傾かなくなる時間をゲル化時間と定義した。37°Cで24時間静置したハイドロゲルを以後の評価に使用した。圧縮強度は押し込み試験により評価した。ハイドロゲル表面の微細構造を走査電子顕微鏡で観察した。さらに、ハイドロゲル中に存在する官能基をX線光電子分光法によって調べた。培地中に1日間浸漬したハイドロゲルの表面あるいはハイドロゲルからの溶出物存在下でRT4-D6P2T細胞を培養し、細胞応答性を評価した。

4. 研究成果

(1) 緻密膜を用いた評価

GPTMS を含む試料からの抽出液では主に分子量 100~400, GPDMS では 100~400, TEOS では 100~300, TMSA では 100~300 のピークがそれぞれメインピークとして検出された。各メインピークを詳細に分析すると, GPTMS, GPDMS, TEOS を添加した場合の抽出溶液には, 出発原料由来の単量体に近い構造の分解物が, TMSA を添加した場合の抽出溶液には, キトサンと TMSA が結合したままの分解物が多く含まれていると考えられた。各 GPTMS, GPDMS, TMSA を添加した場合の抽出液中で, RT4-D6P2T の増殖は抑制された。しかし, 細胞形態は全て紡錘状を示し, 接着や活性への影響は観察されなかった。以上のことから, オルトケイ酸の構造に近い, TEOS 単量体由来の分解物は, 神経細胞の増殖に影響しないが, 有機鎖が存在する GPTMS, GPDMS, TEOS 由来の分解物は, 神経細胞の増殖を抑制すると思われる。これら分解物の細胞内への取り込みを Si(IV)の濃度変化から調べたが, いずれの場合にも細胞内に取り込まれていないという結果は得られなかった。

(2) 多孔質体を用いた評価

多孔質の系は, GPTMS の添加量を変えた系に関して実施した。キトサンのアミノ基に対して, モル比で 1 あるいは 0.5 の GPTMS を添加した試料を作製した。多孔質からのケイ素を含む分解物の構造は, ①の緻密体の場合とは異なり, キトサンと GPTMS が結合した構造が多く含まれていた。つまり, 多孔質体の場合には, キトサンユニット間の-O-が分解の起点となっていると考えられる。これらの培地中で培養した RT4-D6P2T 細胞は, Si 濃度, 分解物の種類に関わらず, 樹状突起を伸ばして, 増殖した。樹状突起を伸ばしている細胞数は, 通常培地中よりも分解物を含む培地中の方が多く観察された。このことから, 多孔質体のケイ素を含む分解物は, RT4-D6P2T 細胞の活性を促進すると思われる。一方, 運動神経細胞である NSC-34 の分化は, モル比 1:1 の組成からの分解物が存在する際に, より促進された。ただし, 細胞の増殖はモル比に関係なく分解物によって抑制された。このことから, 多孔質体のケイ素を含む分解物は, NSC-34 細胞の増殖を抑制して分化を促進することが分かった。DRG に対しては, あまり大きく影響を与える分解物の構造は確認できなかった。

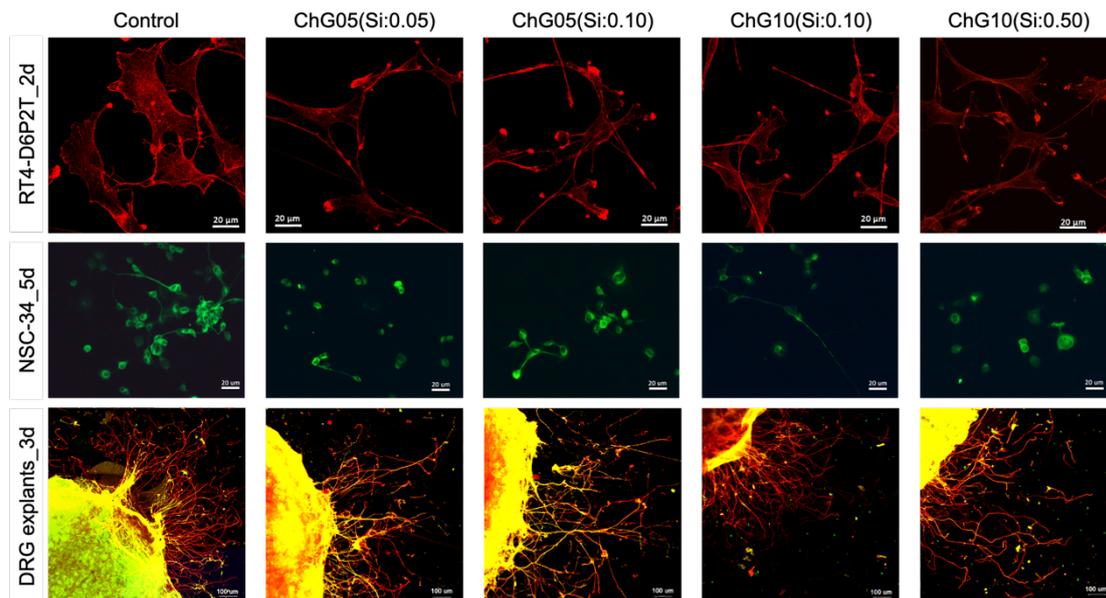


図3 多孔質体の分解物を含む培地中で培養した, RT4-D6P2T, NSC-34, DRG の蛍光顕微鏡像

(3) 新規ハイドロゲルの作製とその評価

GPTMS, TMSA いずれを添加した場合にも, 添加していない場合よりもゲル化時間は短縮された。特に TMSA は塩化物キトサンのアミノ基に対してモル比で 0.05 以上添加すると, 市販のマトリゲルと同程度の時間内にゲル化した。ガラス表面にハイドロゲルを接着させたものを培地中に浸漬させておくと, 市販のマトリゲルは7日以内にガラスから剥離したが, GPTMS あるいは TMSA を添加したハイドロゲルは, 剥離することなく安定にその形状が維持された。ニンヒドリンとの反応および XPS の結果より, シランカップリング剤の各有機官能基は, キトサンのアミノ基との反応が確認できた。また, アルコキシ基は加水分解していた。この加水分解によって形成したシラノール基がガラスと反応し, 溶液中でも剥離することなく安定にゲル状態を維持できたと考えられる。また, 溶液内に維持しても, ハイドロゲルの表面 pH は中性を保っていた。

細胞培養の結果から, RT4-D6P2T 細胞は, TMSA を添加したハイドロゲル表面で接着および増殖することが分かった。TMSA は, 少量添加でゲル化しており, その表面には多くのアミノ基が

残存している。そのため、それらが培地中で正に帯電し、細胞接着を促進したと考えられる。TMSAの有機官能基はアルデヒド基であるが、アルデヒド基が残存しないモル比でキトサンと反応させているため、ハイドロゲル表面は細胞毒性を示さなかった。しかし、増殖した細胞は樹状突起を伸展させず、凝集した(図4)。一方で、ハイドロゲルからの抽出溶液を含む培地中では、RT4-D6P2T細胞は通常培地中と同様に増殖・伸展した。その為、溶出成分ではなく、ハイドロゲル表面の何らかの特性が神経細胞の伸展に影響していることは間違いないが、現時点では解明できていない。

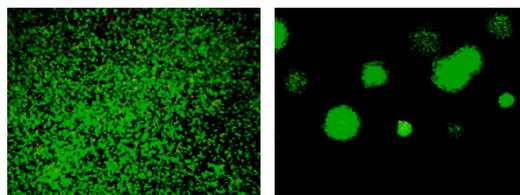


図4 TMSAで架橋したキトサンハイドロゲル表面で7日間培養したRT4-D6P2T細胞の蛍光顕微鏡像。(左)コントロール (右)ハイドロゲル上

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 1件）

1. 著者名 Shirosaki Yuki, Fregnan Federica, Muratori Luisa, Yasutomi Saki, Geuna Stefano, Raimondo Stefania	4. 巻 15
2. 論文標題 The Impact of the Molecular Weight of Degradation Products with Silicon from Porous Chitosan/Siloxane Hybrids on Neuronal Cell Behavior	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 3272 ~ 3272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym15153272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuki Shirosaki, Kohei Hattori, Saki Yasutomi, Federica Fregnan, Luisa Muratori, Stefania Raimondo
2. 発表標題 The effect of Si-containing products degraded from chitosan-siloxane hybrid on neuronal cell
3. 学会等名 12th World Biomaterials Congress（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuki Shirosaki, Kosei Hattori, Tomoya Hiura, Satoshi Hayakawa
2. 発表標題 The effect of degradation products from chitosan-siloxane hybrid solid membranes on the cytocompatibility
3. 学会等名 XII Latin-American Congress of Artificial Organs and Biomaterials COLA0B 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔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
	ジェウナ ステファノ (Geuna Stefano)	トリノ大学・医学科・教授	
	ライモンド ステファニア (Raimondo Stefania)	トリノ大学・医学科・教授	

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			
イタリア	トリノ大学			
イタリア	トリノ大学			