

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：57301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15104

研究課題名（和文）幹細胞移植用担体を指向した生体内模倣材料の環境場設計

研究課題名（英文）Environment designing of in-vivo mimetic material for carriers of stem cell transplantation

研究代表者

森山 幸祐（Moriyama, Kosuke）

佐世保工業高等専門学校・物質工学科・講師

研究者番号：30814313

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では幹細胞の生存率を長期的に維持することが可能な細胞移植用高分子ハイドロゲル担体の作製を目的としている。このような高分子ハイドロゲルを作製する際、ゲル化剤が生体に対して安全であることが望まれる。申請研究実施期間内は、温和な酵素触媒反応によりゲル化する安全性の高いゲル化剤の開発を行なった。具体的には高い生体適合性を示し、比較的安価な天然タンパク質であるアルブミンを骨格として選択し、酵素の基質を有機化学的に修飾することでゲル化剤の合成を行なった。アルブミンへの酵素基質修飾量やゲル作製条件を変化させることで得られるゲルの物理的特性が制御可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、医療分野での応用を目的としたハイドロゲルの骨格分子として天然高分子材料を用いた研究が活発に行われている。天然高分子の利点は比較的安価であることや環境負荷が少ないことが上げられる。一方で免疫原性など高分子材料が生体へ与える影響を考慮する必要がある。そこで本研究では、免疫原性が低く、高い生体適合性を有するアルブミンに着目した。本研究ではアルブミンに酵素の基質を修飾することで、その触媒反応によりゲル化可能なアルブミン誘導体を合成することに成功した。本研究成果は、医工学や生物工学等様々な分野において利用可能なゲル化剤になると考えられることから社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to prepare a polymer hydrogel for cell transplantation carrier that maintain viability of stem cells for a long period. To prepare the hydrogels for these application, gel precursors must be safe to living organisms. In this time, we have been developed a gelator based on the natural polymer with high biocompatibility that can be gelated by enzyme catalyzed reaction. Albumin that shows high biocompatibility and low immunogenicity was selected as a polymer backbone and was modified with enzyme substrate to prepare the gel precursor. We confirmed that the physical properties of the albumin hydrogels can be controlled by varying the amount of enzyme substrate modified to albumin and the gel preparation conditions.

研究分野：生体材料

キーワード：高分子ハイドロゲル 酵素触媒反応 細胞包括

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。

1. 研究開始当初の背景

近年、間葉系幹細胞(MSC)を体内の損傷部位に移植し、その場で治癒を行う細胞治療が注目を集めているが、MSCの移植部位からの流出や生存率の低下という課題がある。本申請研究では、高分子同士の架橋によって形成され、我々の生体組織と類似の物理的性質を有する高分子ハイドロゲルを利用したMSC移植用担体の開発を目指す。ハイドロゲルの内部環境を化学的及び物理的観点から複合的に設計することで、生体内におけるMSCの患部留置性並びに長期的な生存率の維持を可能とするMSC移植用ゲル担体の設計指針の提案を試みる。

2. 研究の目的

このように細胞を包括し、生体へ移植することを目的としたハイドロゲルを作製する際、利用する高分子材料とゲル作製法が生体や細胞に与える影響を十分に考慮する必要がある。我々はこれまでに、ペルオキシダーゼの触媒反応を利用し、細胞培養への応用を目的としたハイドロゲル基材を作製する研究を行ってきた。その研究過程において、従来法に比べ、細胞やタンパク質等の生体分子に対し、極めて温和なゲル形成法を開発している。この手法により高い生存率を保持したまま対象細胞をゲルに包括可能であることを確認している。

そこで本申請研究では生体に対する安全性の高いゲル化剤の開発を目的に研究を行なった。血漿中に多く含まれる水溶性タンパク質であるアルブミンは「高い生体適合性」及び「低い免疫原性」という特徴から医療分野で利用可能な材料として注目されている。特にドラッグデリバリーシステムにおける薬物担体等、生体への移植を目的とした医療用材料としての有用性を評価する研究が活発に行われている。そこで本研究ではこのアルブミンを骨格とし、ペルオキシダーゼの触媒反応によりゲル化する材料の開発を行なった。

3. 研究の方法

本研究ではカルボジイミドを用いた脱水縮合反応を利用し、アルブミン分子に西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の基質であるフェノール性水酸基(Ph-OH基)を導入した(図1)。合成条件を変更させることでPh-OH基導入量の異なる3種のアルブミンゲル化剤を合成した(High: 16.8 mol-(Ph-OH)/mol-(albumin), Medium: 10.8 mol-(Ph-OH)/mol-(albumin), Low: 7.2 mol-(Ph-OH)/mol-(albumin))。アルブミンへのPh-OH基修飾量が高分子水溶液のゲル化時間やゲルの弾性率、膨潤率等の物理的特性に及ぼす影響を評価した。また生体における分解挙動を評価するため、プロテアーゼによるゲルの溶解を試みた。

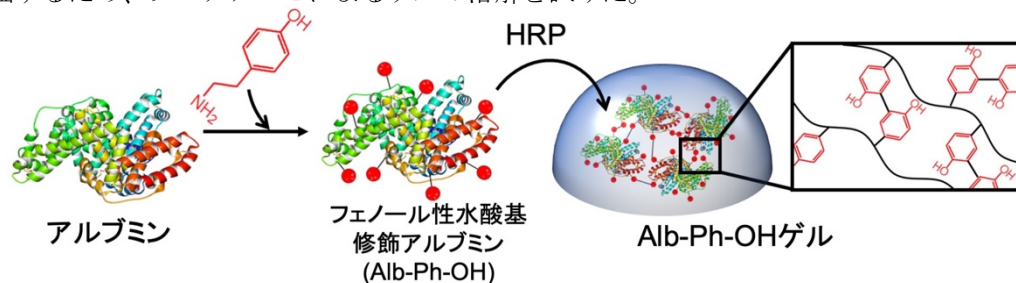


図1. 酵素架橋によるアルブミンハイドロゲルの作製。

4. 研究成果

(1)ゲル化試験

Alb-Ph-OH、HRP の終濃度がそれぞれ 10%(w/w)、10 U/mL となるようにガラスバイアル内で混合し、その後、過酸化水素(H_2O_2)水溶液を添加した。ゲル化剤、酵素および酵素活性化剤のいずれかの成分を含まない条件 (Alb-Ph-OH のみ、Alb-Ph-OH + HRP 及び Alb-Ph-OH + H_2O_2)ではゲル化が確認されなかった(図 2 (a), (b) 及び (c))。一方で Alb-Ph-OH 及び HRP 混合溶液中に H_2O_2 水溶液を添加した条件のみハイドロゲルの形成が観察された(図 2(d))。以上の結果から、HRP 触媒反応によりゲル化可能なアルブミンゲル化剤を合成することに成功した。

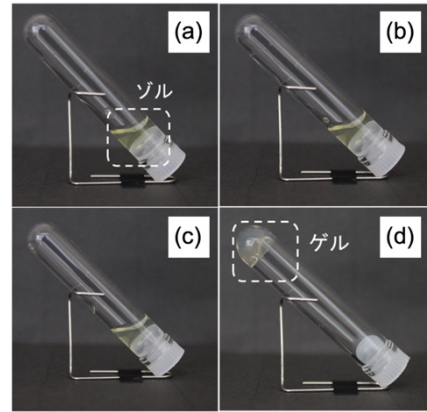


図 2. Alb-Ph-OH 水溶液のゲル化試験.
(a): Alb-Ph-OH, (b): Alb-Ph-OH + HRP,
(c): Alb-Ph-OH + H_2O_2 , (d): Alb-Ph-OH + HRP + H_2O_2

(2)ゲル化時間の測定

各成分混合後、倒置法により高分子水溶液のゲル化時間を測定した(図 3)。その結果、アルブミンに対する Ph-OH 基導入量の増加することでゲル化時間が短縮する傾向を示した。これは、Ph-OH 基導入量が多いほど、高分子間の架橋形成反応が速く進行するためであると考えられる。次に HRP 濃度の比較を行うと、HRP 濃度の増加に伴いゲル化時間が短縮された。これは HRP 濃度の増加に伴い、カップリング反応に關与するフェノキシラジカルの生成速度が増加したためであると考えられる。以上の結果から、ゲル作製条件を変化させることでゲル化時間が調整可能であることが明らかとなった。また、ゲル前駆溶液は数十秒~数分程度でゲル化させることが可能であったことから、合成した Alb-Ph-OH はインジェクタブルゲルとして利用可能な材料であることが示唆された。

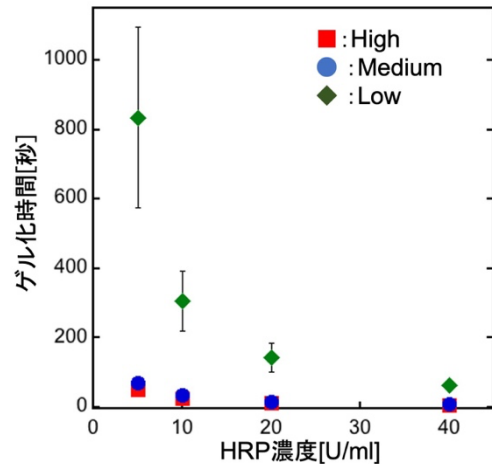


図 3. Alb-Ph-OH 水溶液のゲル化時間.

(3) 物理的特性の評価

作製した Alb-Ph-OH ゲルの平衡膨潤率及び貯蔵弾性率を評価した。アルブミンに対する Ph-OH 基導入量が及ぼす影響を評価したところ、Ph-OH 基導入量の増加に伴い、ゲルの平衡膨潤率は低下し、貯蔵弾性率は増加した(図 4(a))。次に Alb-Ph-OH 濃度の影響に関しては、その濃度が増加することで、ゲルの平衡膨潤率は低下し、貯蔵弾性率は増加した(図 4(b))。これ

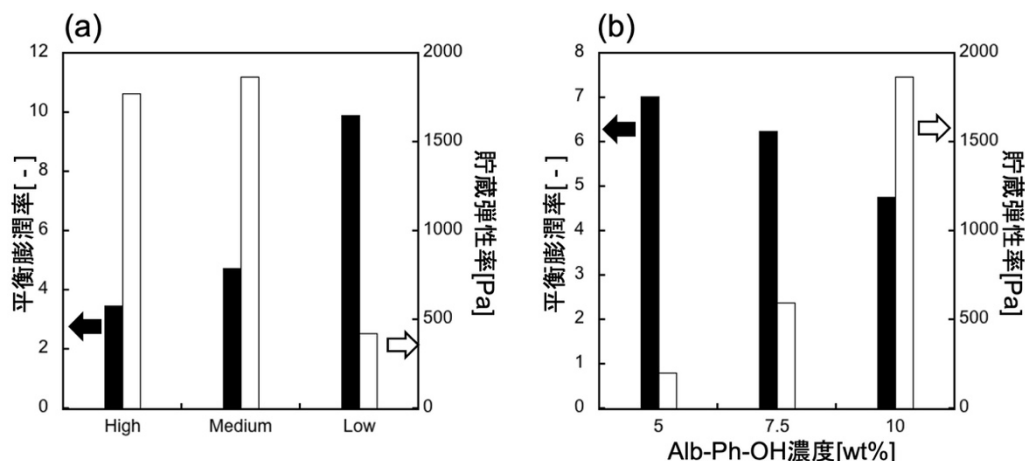


図 4. (a)アルブミンへの Ph-OH 基修飾及び(b)Alb-Ph-OH 濃度がゲルの平衡膨潤率ならびに貯蔵弾性率に及ぼす影響.

らの結果は架橋密度の変化が起因していると考えられる。一般的に、高分子間の架橋密度が増加することで得られるゲルの平衡膨潤率は低下し、貯蔵弾性率は増加する傾向を示す。本検討では、アルブミンに対する Ph-OH 基導入量の増加やゲル作製時の Alb-Ph-OH 濃度の増加によって、系中の Ph-OH 基量が増加したため、得られるゲルの架橋密度が向上したと考えられる。また作製したゲルの内部構造を走査型電子顕微鏡で観察した結果、Alb-Ph-OH(Medium) 及び Alb-Ph-OH(Low) で作製したゲルは明確な細孔構造であったのに対し、Alb-Ph-OH(High) の条件で作製したゲルは繊維状の構造をしており、緻密な空隙構造を有していた。

(4) プロテアーゼによるゲルの溶解

プロテアーゼ水溶液に作製した Alb-Ph-OH ゲルを浸漬させ、その重量の経時変化を評価した。その結果、作製した Alb-Ph-OH ゲルはプロテアーゼにより溶解されることが明らかとなった。またその溶解速度がゲルの作製条件によって変化することが確認された。まず Ph-OH 基導入量に関しては、アルブミンに対する Ph-OH 基導入量が低い条件で作製したゲルの分解が早く進行することが明らかとなった(図 5(a))。Alb-Ph-OH(Low) の条件では浸漬 3 日後、Alb-Ph-OH(Medium) の条件では浸漬 17 日後に作製したゲルが全て溶解していた。一方で Alb-Ph-OH(High) の条件で作製したゲルは浸漬 25 日後も 55 %程度が残存していた。次に Alb-Ph-OH 濃度に関してはその濃度低下によってゲルの分解速度が増加する傾向を示した(図 5(b))。これらの結果は、ゲルの架橋密度が減少することで、ゲル内部におけるプロテアーゼ分子の拡散が促進されたためであると考えられる。

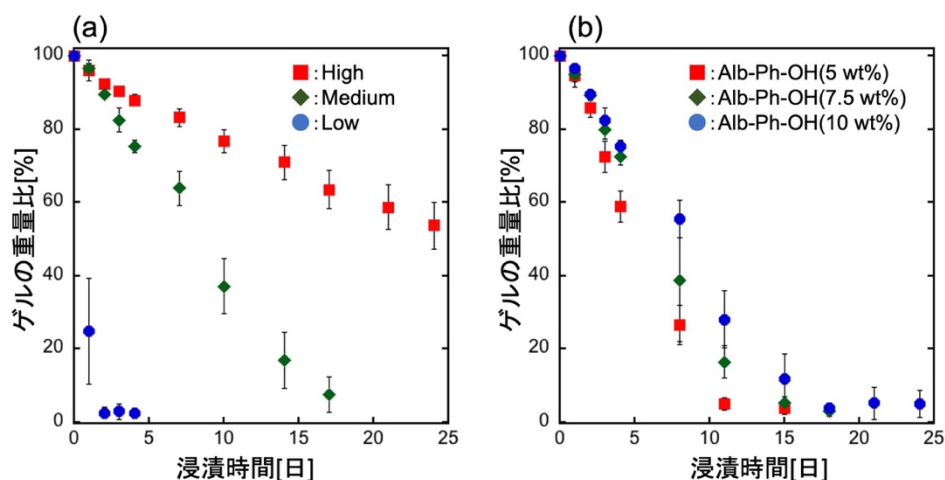


図 5. (a)アルブミンへの Ph-OH 基修飾及び(b)Alb-Ph-OH 濃度がゲルの溶解に及ぼす影響。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井元乃絵、森山幸祐
2. 発表標題 酵素触媒反応仲介型アルブミンゲル化剤の開発とその諸特性評価
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井元乃絵、森山幸祐
2. 発表標題 ペルオキシダーゼ触媒反応を利用した天然高分子由来ハイドロゲルの作製
3. 学会等名 化学工学会 第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 奈々、森山 幸祐
2. 発表標題 細胞培養基材としての応用を目的とした天然高分子由来ダブルネットワークゲルの作製
3. 学会等名 化学工学会 第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noe Inomoto, Kousuke Moriyama
2. 発表標題 Preparation and characterization of hydrogels derived from natural polymers using enzyme-catalyzed reactions
3. 学会等名 6th STI-Gigaku (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山幸祐、井元乃絵
2. 発表標題 細胞包括への応用を目的とした酵素仲介型アルブミンゲル化剤の開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会九州ブロック学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山 幸祐、井元 乃絵、二瓶 将暢、佐藤 美矩、佐藤 武史、後藤 雅宏、神谷 典穂
2. 発表標題 酵素架橋性アルブミンゲル化剤の開発と細胞包括への応用
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森山 幸祐、井元 乃絵、山口 恭平、若林 里衣、後藤 雅宏、神谷 典穂
2. 発表標題 ペルオキシダーゼ触媒反応を利用したゲル形成反応の高効率化
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------