

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K23100

研究課題名（和文）頭頸部軟組織再生へ向けたナノゲル集積材料の構築と機能評価

研究課題名（英文）Development and functional evaluation of nanogel-based materials for soft tissue regeneration of head and neck

研究代表者

木下 直哉（Kinoshita, Naoya）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80881086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：以前の研究において生体分解を有するナノゲル架橋ハイドロゲルの作製を行ったがや強度不足や架橋時間が長いこと、移植時の操作性など課題が多く残っていた。そこで本研究期間ではこのような課題の克服を目的とした材料開発と機能評価を行ってきた。音響波や光照射のような外部刺激による架橋構造制御を行い、以前より短時間かつ生体筋組織と同様の力学的特性を有するハイドロゲルの作製に成功した。新型コロナウイルスの影響により生体内での実験にやや遅れが生じてしまったものの、研究期間の最終年度では生体内でのゲル移植実験を行い、高い生体親和性と分解挙動を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌の中でも舌癌の症例では術後に構音障害や嚥下障害が生じることがある。リハビリや口腔内装置による機能代償しか手段がないのが現状であり、これらを用いても回復困難な場合もしばしば認める。喪失した舌筋組織再生はこのような機能障害に対する新たな治療法といえる。本研究において着目しているナノゲルは内包したタンパクを生体内で徐放する機能があり他の生体材料にはない特徴である。筋組織と同様の力学的性質を持つことから、舌のような筋組織再生に適した材料であると考えられる。ナノゲルによる舌筋組織をはじめとした術後機能障害に対する新たな治療法の確立に貢献しうることが研究の社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：In previous research, we prepared biodegradable nanogel-based hydrogels, but many issues remained, such as insufficient strength, long cross-linking time, and improvement of usability. In this research period, we have been developing materials and evaluating their functions to overcome these issues. By controlling the accumulation structure with external stimuli such as acoustic waves and light irradiation, we succeeded in developing hydrogels with shorter reaction time and mechanical properties similar to muscle tissue. Although there was a slight delay in the in vivo experiments due to COVID-19, in the final year of the research period, gel implantation experiments were carried out and the high biocompatibility and degradation behavior of the gel were confirmed.

研究分野：再生医療

キーワード：頭頸部再生 ナノゲル 生体材料

## 1. 研究開始当初の背景

舌がんなど頭頸部癌手術後の患者においては創部の縫縮や悪性腫瘍切除に伴う舌体積の減少などを原因とした、嚥下・構音機能障害や術後の QOL の低下や誤嚥リスクの増大など重大な影響をこうむる。このような機能障害の改善にはリハビリテーション以外有効な手段がなく、完全な機能回復は達成されていないのが現状である。このような臨床的課題に対し天然高分子・合成高分子、脱細胞組織などの足場材料を用いた再生医療の観点から研究報告がなされてきたが生体内での分解性などの課題があり臨床応用へ至ったものはない。そこで本研究では高い生体親和性を持つ CHP ナノゲルを基盤とした再生医療による頭頸部組織の再生を達成するため、CHP ナノゲルに着目した。CHP ナノゲルとは疎水化プルランが自己組織化した直径約 30nm 程度の微粒子であり、タンパク質を微粒子に内包するシャペロン機能を有し、内包したタンパク質の活性を維持したまま外部へ徐放するユニークな性質を持つ。これまでに分解性 CHP ナノゲルを構成単位とするポーラスゲルが舌筋組織再生を促進することを報告してきた[1]。しかし、筋芽細胞の分化をより効率的に促す形態や欠損部に移植する際の操作性など課題は残った。

そこで本研究では舌をはじめとする頭頸部筋組織の構音・嚥下機能障害に対し、材料の形態や足場材料中における筋芽細胞の分化効果に重点を置いた頭頸部組織再生へ応用可能な CHP ナノゲル架橋材料の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、前項に述べた構音・嚥下機能を回復できるような頭頸部筋組織に移植できる CHP ナノゲル材料を開発することである。具体的には CHP ナノゲルをマイクロサイズ(マイクロスフェア)に集積制御させたインジェクタブルゲルと架橋時間をより短縮させ外部刺激により集積構造の制御を可能にした光架橋ゲルの開発を行い、それらの基礎物性や細胞との相互作用について評価を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロスフェアの開発と物性及び細胞との相互作用の評価

移植時の操作性を向上させるため、インジェクタブルデバイスの開発を試みた。反応性ナノゲルをマイクロサイズに集積させたマイクロスフェアを作製し、形態や粒径分布について評価するため共焦点レーザー顕微鏡にて評価を行った。このマイクロスフェアを細胞スフェロイドの核となるよう、細胞と共培養し、細胞とのハイブリッドマイクロスフェアを作製した。細胞との複合化を共焦点レーザー顕微鏡で観察を行ない、マイクロスフェアの細胞に対する影響を評価するため live/dead assay、ATP 活性を行った。

### (2) 光応答性ハイドロゲルの開発と物性及び細胞との相互作用の評価

前項でマイクロスフェアの懸濁液はマイケル付加反応を利用するため架橋に時間を要すること、また生体内へ移植した際に拡散し足場材料としての体積を維持することが困難であることが課題となった。そこで架橋時間を短縮と光反応性ゲルの設計を行なった。反応性ナノゲルと組み合わせる架橋材として 4 本鎖の PEG の末端にアクリロイル基を修飾した PEG-S-TA を合成した。重合開始剤として LAP を用い、405nm の光照射を 100 秒間行うことで PEG-S-TA ゲルを調整した。ゲルの力学的特性はレオメーターを用いて応力ひずみ曲線を描記することで解析した。緩衝液中でのゲルの分解挙動や蛍光標識したインスリンの取り込み・放出挙動は蛍光強度測定により行った。ゲルの細胞毒性は、細胞と複合化させたゲルに live/dead assay を行うことで評価した。またプレゲル溶液をマウスの皮下に注入しゲル化させバイオイメージングシステムにより観察を行い *in vivo* のゲル分解挙動まで評価した。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロスフェアの開発と物性及び細胞との相互作用の評価

作製したマイクロスフェアは直径約 10-20  $\mu\text{m}$  程度であり、真円に近い形態であった(Fig.1a)。次にマイクロスフェロイドと細胞とを U 底のウェルプレート内で共培養することでハイブリッドスフェロイドを作製し、共焦点レーザー顕微鏡で形態や細胞分布の観察を行った(Fig.1b)。ハイブリッドスフェロイドはマイクロスフェアの凝集体を核とし、周囲を取り囲むように接着している様子が確認された。この結果より従来のスフェロイドの課題であった中心部の壊死を抑制できているのではないかと考え ATP assay によりスフェロイドとマイクロスフェアを添加したハイブリッドス

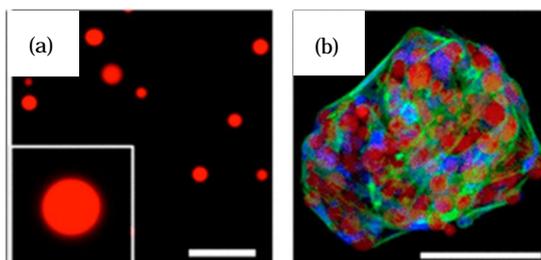


Fig.1 (a) マイクロスフェアの形態 (b) ハイブリッドスフェロイドの形態

フェロイド内での生細胞の比較評価を行ったところ、両者とも経時的に生細胞数が減少するがハイブリッドスフェロイドでは精細胞の減少が抑制されていることが明らかになった。これらの結果まとめ論文文化し報告した[2]。

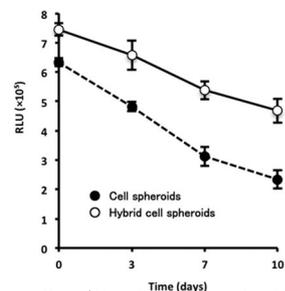


Fig.2 ハイブリッドスフェロイドのATP活性

## (2)光応答性ハイドロゲルの開発と物性及び細胞との相互作用の評価

筋組織再生の足場材料としての応用を目指すため、調整した光架橋ハイドロゲルの力学的特性をレオメーターにて解析し生体筋組織と比較を行った。応力ひずみ曲線からPEG-S-TAゲルのヤング率は約9kPaであった。生体筋組織のヤング率は約8-17kPaと報告されており、ほぼ同等の値であった。PEG-S-TAゲルを緩衝溶液では約60日程度で分解され、インスリンの取り込み・放出挙動が確認された。

細胞と複合化させたPEG-S-TAゲルをlive/dead染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った(Fig.3)。結果、明らかな細胞毒性は確認されず、高い細胞生存率を有していた。生体内での分解挙動を確認するためプレゲル溶液をヌードマウスの背部皮下に注入してから光照射しゲル化させた。

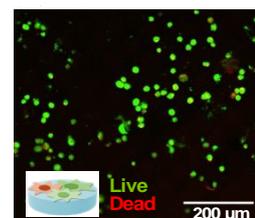


Fig.3 PEG-S-TAゲルの細胞生存率

分解挙動はバイオイメージングシステムにより観察を行った(Fig.4)。

PEG-S-TAゲルは移植後28日で70%程度が分解しており、生体内でも良好な分解性を有することが確認された。

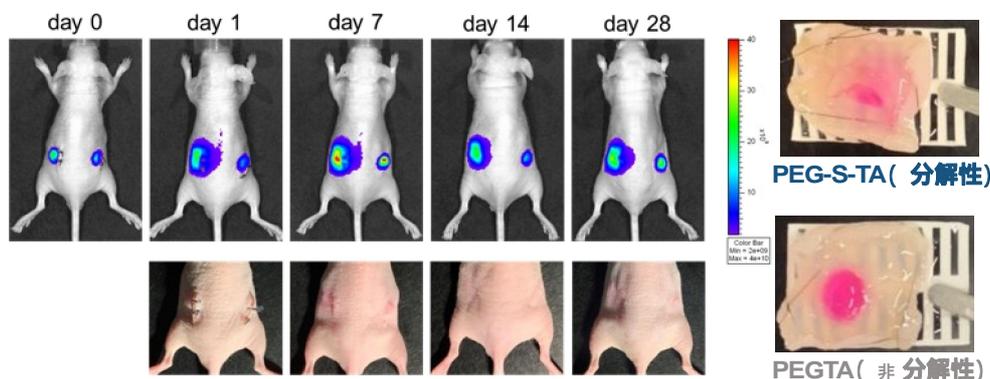


Fig.4 PEG-S-TAゲルの生体内での分解挙動

## (参考文献)

- [1] *J Biomater Sci Polym Ed* (10):1254-1271. (2020)
- [2] *ACS Appl. Bio Mater.* (4) 11:7848-7855. (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kinoshita Naoya, Hirai Hideaki, Fukawa Yuki, Yamagata Yuko, Kashima Yoshihisa, Sato Masaru, Ikeda Tohru, Harada Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of dentinogenic ghost cell tumor of the mandible with a review of the literature	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2023.03.014	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 -

1. 著者名 Hayashi Shunya, Sasaki Yoshihiro, Kubo Hirotaka, Sawada Shin-ichi, Kinoshita Naoya, Marukawa Eriko, Harada Hiroyuki, Akiyoshi Kazunari	4. 巻 4
2. 論文標題 Construction of Hybrid Cell Spheroids Using Cell-Sized Cross-Linked Nanogel Microspheres as an Artificial Extracellular Matrix	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 7848 ~ 7855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.1c00796	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 -

1. 著者名 Kinoshita Naoya, Tomioka Hirofumi, Oikawa Yu, Fukawa Yuki, Ikeda Tohru, Harada Hiroyuki	4. 巻 65
2. 論文標題 A case of sclerosing odontogenic carcinoma of the mandible with a review of the literature	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 281 ~ 283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.23-0187	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木下 直哉, 釘本 琢磨, 布川 裕規, 清水 六花, 西井直人, 大迫 利光, 平井 秀明, 池田 通, 原田 浩之
2. 発表標題 口腔に発生した明細胞癌の2例
3. 学会等名 第46回 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下直哉, 丸川恵理子, 原田浩之
2. 発表標題 舌筋組織再生のためのナノゲル架橋ポラスゲルの設計と機能評価
3. 学会等名 第76回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木善浩、木下直哉、林駿哉、澤田晋一、丸川恵理子、原田浩之、秋吉一成
2. 発表標題 柔らかい筋組織再生のためのナノゲルからなる多孔性ゲルの設計と機能評価
3. 学会等名 第69回 高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下直哉, 富岡寛文, 及川悠, 布川裕規, 池田通, 原田浩之
2. 発表標題 下顎骨に生じた硬化性歯原性癌の1例
3. 学会等名 第47回 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木下直哉, 津島文彦, 原田浩之
2. 発表標題 口腔白板症の悪性転化に対する機械学習モデルの予測精度評価
3. 学会等名 第68回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 及川 悠, 木下 直哉, 清水 六花, 西井 直人, 釘本 琢磨, 黒嶋 雄志, 富岡 寛文, 道 泰之, 原田 浩之
2. 発表標題 舌扁平上皮癌D0I 5mm症例における頸部リンパ節転移に関する臨床病理学的検討
3. 学会等名 第61回 日本癌治療学会学術集会
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

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