

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18063

研究課題名（和文）自己修復するペプチド型ダブルネットワークの逐次形成と細胞足場としての展開

研究課題名（英文）Sequential Formation of Self-Repairing Peptide Type Double Networks and Their Deployment as Cell Scaffolds

研究代表者

石川 昇平（Ishikawa, Shohei）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・特別研究員

研究者番号：50897981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高分子網目の逐次形成手法を用いることで、従来の研究では困難だった高力学特性と細胞接着性を併せ持つ、生体適合性に優れた材料からなる高分子ゲルを開発した。この材料は、自己組織化ペプチドとポリエチレングリコールからなる完全合成材料であるため、毒性の懸念が少ない。本研究にて開発した高分子ゲルは、今後の組織工学や再生医学の発展に寄与するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のダブルネットワークゲルは、細胞毒性を伴う光架橋や重合法を用いたゲル化手法、ゲル物性の制御が困難な高粘性材料、生体適合性に乏しい高分子などの、バイオメディカル応用に不向きな材料戦略だった。しかしながら本研究では、これらの課題を全て克服したダブルネットワークゲルを、完全合成材料を用い、高分子網目の逐次形成手法を組み合わせることで作成した。本研究成果は、新規なダブルネットワークゲルの作成手法を提案するとともに、臨床的な観点からも基盤となる技術となり得る。

研究成果の概要（英文）：In this study, a novel polymer gel composed of a biocompatible material with high mechanical properties and cell adhesion was developed using a sequential polymer network formation technique. Previous studies have encountered difficulty in achieving this combination of properties. The material is a fully synthetic composition of self-assembling peptides and polyethylene glycol, which minimizes concerns regarding toxicity. The polymer gel developed in this study holds potential for contributing to the advancement of tissue engineering and regenerative medical applications.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ハイドロゲル ダブルネットワーク 自己組織化ペプチド ポリエチレングリコール 組織再生足場

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

正負の電荷を交互に配列する特定の分子配列を有し、それら分子間の動的な相互作用に基づきゲル化する自己組織化ペプチド(e.g. RADA16) は、体液との接触により即座にナノオーダーのファイバーネットワークを形成するため患部へ直接注入可能なインジェクタブルゲルとして利用可能である。しかしながら、ペプチド自体の力学特性は低いため、単独での利用は難しい。ペプチドのネットワークを保持する=力学強度を高める戦略として、二種の高分子網目を相互侵襲的に組み合わせることで、『高力学特性』を達成するダブルネットワーク(DN) 化が挙げられる[Gong et al., Adv. Mater. 2003, 15, 1155]。一般的に DN ゲルの作成には、光照射や温度相転移を介する多段階ゲル化が主流だが、生体内へのインジェクトや DN ゲル中への細胞包埋を想定するならば、周辺組織や細胞へ刺激を与えず、“混ぜるだけ”で DN 化が進行する戦略が望ましい。その簡便なシステムとして申請者は、ペプチドの自己組織化を利用した二種ネットワークの逐次形成に基づく相互侵入高分子網目(Interpenetrating polymer network: IPN) の one-pot 形成を提案した [Ishikawa et al., Chem. Mater. 2020, 32, 2353]。ここで、DN 戦略は強度増強を、IPN 戦略は網目特性の相乗付与を主目的とするため両者は戦略的に異なる。この one-pot 手法は、二種ネットワークのゲル化原理とゲル化速度の相違に基づき、インジェクタブル形式で IPN を形成可能であり、ゲル中で軟骨細胞を培養すると臨床で汎用のアテロコラーゲン以上に軟骨組織再生能力を向上させることも可能だった。従ってこの手法を採用し、ペプチドと対をなすネットワークとして化学架橋ネットワークを選択すれば、ペプチドを用いたインジェクタブル DN ゲルの one-pot 創製が想起される。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゲル物性を精密に制御可能な四分岐ポリエチレングリコール(PEG) と典型的な自己組織化ペプチド(RADA16) を用いることで、ペプチド型インジェクタブル DN ゲルを設計し、力学強度が最大かつ、細胞接着が可能なネットワーク組成を決定する。また組織工学への展開を見据え、設計した DN ゲルに細胞を播種し、高力学強度と細胞接着性を併せ持つバイオマテリアルを創発し、新たな材料の設計指針を提供する。

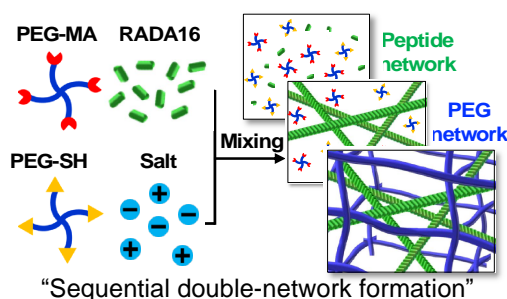


図 1. 研究戦略

### 3. 研究の方法

ペプチドは塩と接触することでゲル化するため、DN ゲルの作成にはアミン末端 PEG・ペプチド水溶液に対し、PBS に溶解させた NHS 末端 PEG を混合することで行う。ゲル化原理が異なるため双方のネットワークは相互作用しないが、混合濃度によりゲル化が同時に起こることが想定される。その挙動を追跡するため、レオメーターを用い混合後からの貯蔵弾性率と損失弾性率を測定することで調査し、ネットワーク形成が逐次的に起こるゲル組成を確定する。それらのゲル組成に対し、引張試験により力学強度が向上する条件を決定し、DN ゲル中に形成したペプチドネットワークを円偏光二色性、共焦点レーザー顕微鏡により観察し、DN 化の発現原理を考察する。

設計した DN ゲルに対して、線維芽細胞を播種することで、材料の生体適合性と細胞接着性を判断する。細胞の接着は、Live/dead assay を用いて生細胞と死細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することで確認する。

### 4. 研究成果

本材料は、FDA に承認済みの材料であるポリエチレングリコール(PEG) と自己組織化ペプチド(RADA16) を組み合わせた、FDA にも承認済みの完全合成材料からなり、材料の観点からは生体適合性に優れる。

まず、逐次網目の形成を確認するために、レオメーターを用いてゲル化速度を調査した。ペプチドの溶液と PEG の溶液を混合すると、固体的な性質を示す貯蔵弾性率の上昇挙動が、それぞれ単独の挙動と類似していた。このことから、まずペプチド分子間の自己組織化によりペプチドネットワークが形成され、その後の PEG 分子間の架橋反応により、PEG ネットワークが形成されることがわかった。このネットワーク形成様式は、光照射などを介する通常のダブルネットワーク形成手法とは異なり、生体適合性に優れる。さらに、一般的にダブルネットワークゲルは、動物性由来材料、またはアクリルアミド系の高分子からなり、これらの材料は、細胞毒性の原因となるシグナルを伝播するため、細胞と接触するバイオマテリアルの設計に適さない。本研究にて使用した材料は、ゲル化原理の観点、及び材料の観点からも、生体適合性に優れた戦略である。

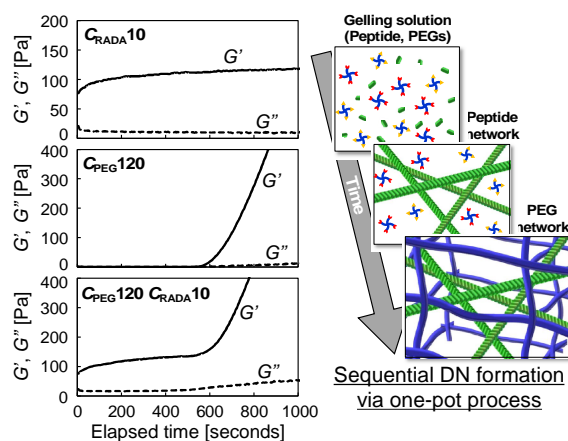


図 2. ネットワーク形成過程.

さらに、ゲル内に形成したペプチドの自己組織化ネットワークは、共焦点レーザー顕微鏡観察により、ファイバー状に構造形成していることから、PEG ネットワークの形成は、ペプチドネットワークの形成を阻害しないことが示唆された。このように、二種のネットワーク形成が、ゲルの力学強度を向上させると仮定し、引張試験によりゲルの力学特性を評価した。結果的に、形成したゲルの破壊エネルギーは、通常の PEG ゲルと比較して 4 倍向上したことから、ゲルのダブルネットワーク化が示唆された。

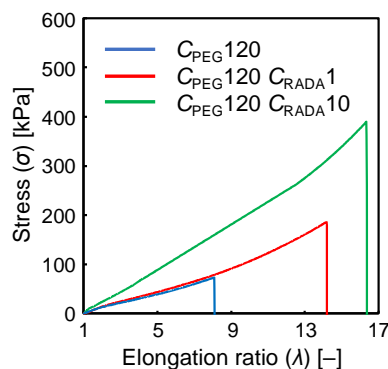


図 3. ゲルの力学特性.

本研究課題では、生体適合性に優れたダブルネットワークゲルの作成を目的とする。本年度は、作成したダブルネットワークゲルへの生体適合性と細胞接着性を確認した。この材料に線維芽細胞を播種すると、1日培養後に細胞接着が確認され、その数は、培養日数に伴い増加した。これは、自己組織化ペプチド自体が、細胞接着性を有するためである。このことから、作成した材料の生体適合性が高いことが伺える。以上のように、PEG とペプチドからなるダブルネットワークゲルは、生体適合性に優れ、人工材料では困難だった細胞接着性の付与も達成した。

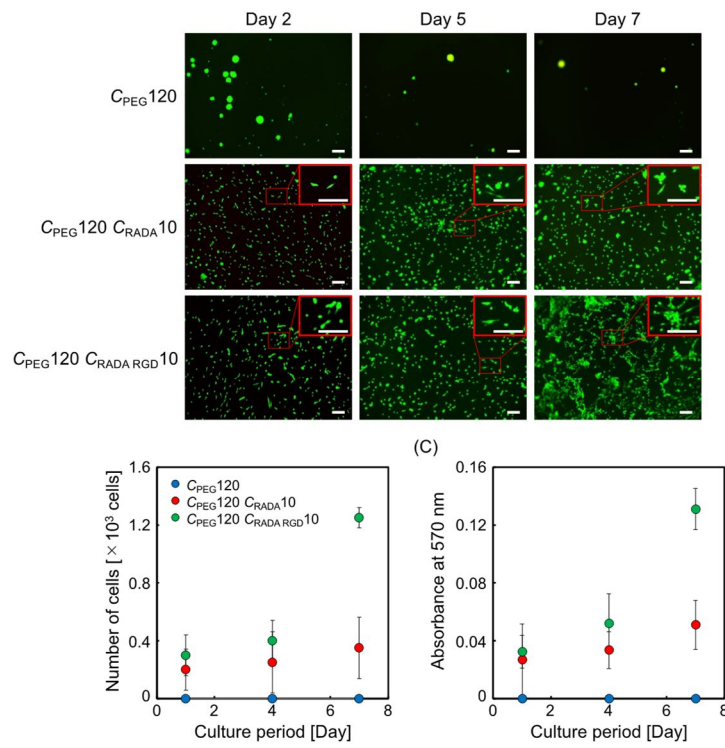


図 4. ゲルへの細胞接着性.

このように、PEG とペプチドからなる生体適合性のダブルネットワークの作成は、ダブルネットワークゲルが最初に発表されて以降、初めての試みであり、今後の組織工学への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S. Ishikawa, Y. Iwanaga, T. Uneyama, X. Li, H. Hojo, I. Fujinaga, T. Katashima, T. Saito, U. Chung, N. Sakumichi, and T. Sakai	4. 巻 -
2. 論文標題 Percolation induced gel-gel phase separation in a dilute polymer network	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 arXiv:2202.09754	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） 10.48550/arXiv.2202.09754	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 S. Ishikawa, H. Kamata, U. Chung, and T. Sakai	4. 巻 11
2. 論文標題 On-demand retrieval of cells three-dimensionally seeded in injectable thioester-based hydrogels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 23637-23643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.1c02396	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 石川 昇平	4. 巻 427
2. 論文標題 逐次網目形成に基づくインジェクタブルゲルの設計と軟骨組織再生に関する研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 科学フォーラム	6. 最初と最後の頁 62-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Ishikawa Shohei, Kato Motoi, Si Jinyan, Chenyu Lin, Kimura Kohei, Katashima Takuya, Naito Mitsuru, Kurita Masakazu, Sakai Takamasa	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular Weight-Dependent Diffusion, Biodistribution, and Clearance Behavior of Tetra-Armed Poly(ethylene glycol) Subcutaneously Injected into the Back of Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Macro Letters	6. 最初と最後の頁 510~517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmacrolett.3c00044	査読の有無 無
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 Ishikawa Shohei, Yoshikawa Yuki, Kamata Hiroyuki, Chung Ung-il, Sakai Takamasa	4. 巻 14
2. 論文標題 Simple Preparation of Injectable Hydrogels with Phase-Separated Structures That Can Encapsulate Live Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 35444 ~ 35453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acami.2c09906	査読の有無 無
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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石川昇平、吉川祐紀、鎌田宏之、鄭雄一、酒井崇匡
2. 発表標題 相分離構造を有するハイドロゲルの作成と細胞足場としての応用
3. 学会等名 ムーンショット技術交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 昇平、吉川 祐紀、鎌田 宏幸、鄭 雄一、酒井 崇匡
2. 発表標題 ポリエチレングリコールからなるインジェクタブル相分離ゲルの作成と細胞培養足場材への展開
3. 学会等名 第51 回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 昇平, 岩永 康秀, 畝山 多加志, Li Xiang, 北條 宏徳, 藤長 郁夫, 片島 拓弥, 齋藤 琢, 岡田 康志, 鄭 雄一, 作道 直幸, 酒井 崇匡
2. 発表標題 ゲル化臨界濃度付近で作成した高分子ゲルの疎水化を伴う相分離現象
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 昇平, 岩永 康秀, 畝山 多加志, Li Xiang, 北條 宏徳, 片島 拓弥, 岡田 康志, 鄭 雄一, 作道 直幸, 酒井 崇匡
2. 発表標題 ゲル化臨界濃度で作成した高分子ゲルの相分離挙動とラット皮下における埋植評価
3. 学会等名 第34 回高分子ゲル研究討論会
4. 発表年 2022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
---------	---------