

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560248

研究課題名(和文) 生分解性形状記憶ポリマーを用いた再生人工血管用細胞ロールの作成

研究課題名(英文) Preparation of cellular roll for regenerative artificial blood vessels using biodegradable shape-memory polymers

研究代表者

大矢 裕一(Ohya, Yuichi)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：10213886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、組織再生には異種細胞が三次元的に階層化した構造を人工的に再現することが重要であるとの考えに基づき、独自に開発した鋭敏な形状回復能を示す生分解性形状記憶ポリマーをスキャホールド(足場)とし、その形状回復現象と、細胞と特異的に相互作用するペプチドを利用して、内側から同心円状に血管内皮、平滑筋、繊維芽の各細胞が配置された「細胞ロール」による再生人工血管の構築を目指した研究の基礎的検討を行った。研究期間内に、ロール状に形状回復する生分解性ポリマーシートの作成と、生分解性ポリマーシート表面への細胞接着性ペプチドの導入に成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to regenerate the living tissue, reconstruction of 3-dimensional hierarchical structures of the tissue must be important. In this study, we tried to prepare a biodegradable multi-layered cellular roll having 3-dimensional hierarchical structure consisting of different kind cells using biodegradable shape memory polymers as scaffolds for regenerative small diameter blood vessels. Then, we succeeded to prepare biodegradable polymer sheet which shows shape-recovery into roll shape. We succeeded immobilization of cell-recognition peptide on the surface of the polymer sheet.

研究分野：機能性高分子化学

キーワード：形状記憶ポリマー 人工血管 生分解性高分子 階層構造 再生医療

1. 研究開始当初の背景

現在の人工血管の素材は、ポリエチレンテレフタレート(PET)や延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)である。しかし、これらは初期血栓生成に続く擬内膜の形成により、それ以上の血栓生成が抑制され開存状態が保持されるため、擬内膜形成後も中空構造が維持される中口径(6mm)以上に限定されており、6mm未満の小口径人工血管は未だ実現されていない。また、非分解性であるため、成長する小児のような症例には対応できない。そのため、長期開存性を有する小口径人工血管の開発が求められている。近年、iPS細胞など幹細胞研究の進展により、再生医療が新たな治療法として注目されている。これまでも生分解性高分子をスキャフォールド(足場)とした組織再生が試みられてきたが、期待された成果は挙げられていない。これは、血管のような単純な組織でも三次元的に階層化した構造を有しており、それが十分に再現できていないためであると考えられる。これを人工的に再現し、機能する組織再生に結びつけるには、異種細胞の三次元配列化や、細胞間相互作用の制御を達成する新たなイノベーションが必要である。

一方近年、再生医工学的手法の一つとして、生分解性スキャフォールド(足場)を利用して組織を再生する試みが盛んに行われている。例えば、組織形状を模した生分解性ポリマー製の3次元構造体に細胞を播種して生着させ、再生させたい部位に移植することで細胞が構造体の形状に従って増殖し、新しい組織を形成すると同時にポリマーが分解され、生体組織と同等の機能・形状の再生組織が構築されるといった手法が考案されている。しかしながら、ある程度以上の大きさの組織を構築するには毛細血管の誘導や異なる数種の細胞からなる階層構造の再現が必要である。この技術を活用した小口径血管の再生実現にも期待が持たれるが、血管も内・中・外膜の3層構造を有しており、各層はそれぞれ異なる細胞から構成されている。従って、小口径再生人工血管の実現には、こうした異種細胞からなる3層構造の再現が重要であると考えられる。血管の階層構造を模倣する手法として、Jiangらによってエラストマーを用いたStress-induced rolling membrane (SIRM)法が報告されているが(引用文献)、使用されているエラストマーが非分解性であるた

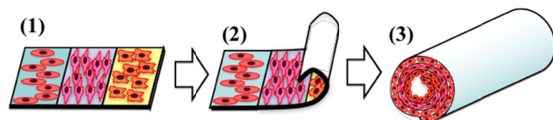


図1 異種細胞が階層構造をとった再生人工血管用の多層細胞チューブの作成。(1)生分解性シート上の各分面に異種細胞(血管内皮,平滑筋,線維芽の各細胞)を配向させて培養,(2)形状回復による自発的巻き上げ,(3)細胞が階層化した壁面を持つ再生人工血管用「細胞ロール」

め、実際の再生人工血管には使用できない。

2. 研究の目的

代表者はこれまでに、生分解性バイオマテリアルに関する研究を重ね、その成果の一つとして、分岐構造を有するポリカプロラクトン(PCL)誘導体を架橋することで、体温付近で温度に応答して鋭敏な形状回復能を示す生分解性形状記憶ポリマーの作成に成功した(引用文献)。

本研究では、生分解性形状記憶ポリマーの形状回復能をシートの巻き上げに利用し、異なる細胞を任意の分面に配置したシートを自発的にロール状に巻き上げ、多層中空構造へと変形させ、内側から同心円状に血管内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞の各細胞が階層構造をとった「細胞ロール」(図1)を作成し、再生人工血管としての可能性を検討することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 温度応答性形状回復能を持つチューブ構造体の調整

平均8個の水酸基を有するオリゴグリセリンの水酸基を開始点としたε-カプロラクトン(CL)のバルク開環重合により Branched PCLを合成した。得られた Branched PCLを加熱溶解し、そこへ架橋剤としてヘキサメチレンジイソシアネート(HMDI)を加えて混合した後、ホットプレスを用いて70MPaの荷重をかけながら75°Cで4時間反応させて架橋フィルムを作成した。その架橋フィルムの両面に再び Branched PCL/HMDIを塗布し、70MPa、75°Cで5分間圧縮した後、フィルムを巻き上げて固定し75°Cで20時間反応させるといった2段階の反応によってチューブ構造体を作成した。得られたチューブ構造体を転移温度以上に加熱して平板上に変形させた後、温度を下げて形状を固定した。

(2) チューブ構造体表面への細胞接着

作成したフィルムの表面に細胞接着能を賦与するため、別途合成したフィブロネクチンの細胞接着活性部位であるRGDSペプチドを修飾したポリ(デブシポプチド-カプロラクトン)/RGDSを1,1,1,3,3,3--ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶解し、霧吹きによりフィルム表面に噴霧し、乾燥することでコーティングした。こうして得られたロール状に形状回復する生分解性フィルムの表面でL929線維芽細胞の接着試験を行い、形状記憶能を有する細胞培養用足場として用いることが可能であるか評価した。

4. 研究成果

(1) 合成した Branched PCLは数平均分子量が17,800、枝1本当たりの重合度が約20、融点は52.4°Cであった。この Branched PCLの末端水酸基を、HMDIを架橋剤として二段階の反応で架橋することでフィルムの厚さ123±3µm、チューブ内径4.0mm、外径8.0mm、3

層，形状回復温度 45°C のチューブ構造体を作成することに成功した(図2)。この際，巻き上げに使用する芯の直径を変化させることで任意の内径にすることが可能であった。このチューブ構造体を加熱して平板状に変形させた後，温度を下げて形状を固定した。この状態で体温である 37°C において 24 時間静置した後も形状は維持されたが，45°C に加熱すると数秒間で元のチューブ形状に回復し，鋭敏な形状回復能を示す事が確認された。



図2 多層チューブ構造体の写真 (左) 全体，(右) 断面

(2) 表面に RGDS ペプチドを修飾したポリマーをコーティングしたフィルムでは，コーティング前と比較して，厚みは殆ど変化していないが形状回復温度は 50°C とやや上昇した。これはコーティングに用いたポリマーに形状記憶能が無いために形状回復が妨げられたことが影響したためであると考えられる。このフィルム表面にカルセインで染色した L929 線維芽細胞を播種し，24 時間後における細胞接着挙動の調査を行った結果，細胞由来の蛍光発色が観察され，細胞接着能が向上していることが示唆された(図3)。

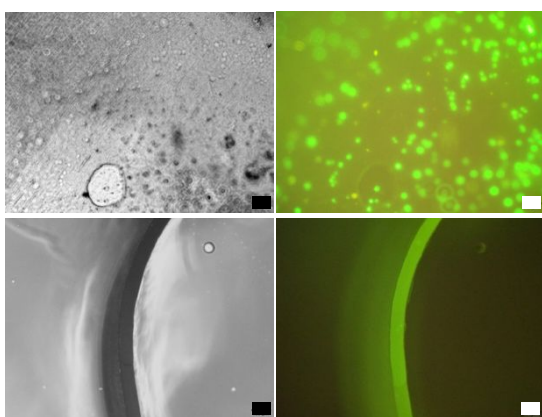


図3 細胞付着および形状回復後のペプチド結合多層チューブ構造体の写真(左)位相差像，(右)蛍光像，(上)表面，(下)断面

続いて，形状回復の後も細胞が離脱せず接着状況を維持できるかどうかについて検討した。実際に，細胞播種後 24 h 培養したフィルムを形状回復温度である 50°C まで加熱すると，構造体がチューブ状へ形状回復することが確認され，細胞の生着や培地中で保持することがポリマーの形状回復能に影響しな

いことが確認された。しかし，形状回復後のロール状構造体の内面を観察したところ，形状回復前に接着していた細胞のうち約 70% が脱離していることが分かった。このことは，培養時間 24 h では細胞の接着力が不十分であり，形状回復時の変形程度の負荷で脱離が起こってしまうことを示していると思われる。この点を向上させるためには，より長時間の前培養を行い，フィルム全面に細胞が接着した状態となってから巻き上げる必要があると考えられる。

<引用文献>

- X. Jiang *et al.*, *Adv. Mater.*, **24**, 890-896 (2012).
K. Nagahama, Y. Ueda, T. Ouchi, Y. Ohya, *Biomacromolecules*, **10**, 1789-1794 (2009).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- H. Tsuji, K. Tamai, T. Kimura, A. Kubota, A. Takahashi, A. Kuzuya, Y. Ohya, Stereocomplex- and Homo-crystallization of Blends from 2-Armed Poly(L-lactide) and Poly(D-lactide) with Identical and Opposite Chain Directional Architectures and of 2-Armed Stereo Diblock Poly(lactide), *Polymer*, 査読有, 96, 2016, 167-181
DOI:10.1016/j.polymer.2016.04.049
Y. Han, A. Hara, A. Kuzuya, R. Watanabe, Y. Ohya, A. Konagaya, Automatic Recognition of DNA Pliers in Atomic Force Microscopy Images, *New Generation Computing*, 査読有, 33(3), 2015, 253-270
DOI:10.1007/s00354-015-0305-4
Y. Ohya, J. Matori, T. Ouchi, Preparation of Growth Factor-loaded Biodegradable Matrices Consisting of Poly(Depsipeptide-co-lactide) and Cell Growth on the Matrices, *Reactive and Functional Polymers*, 査読有, 81, 2014, 33-39, DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2014.04.003

[学会発表](計 12 件)

- 飯田 啓太, 北井 麻里奈, 神戸 裕介, 柿木 佐知朗, 大矢 裕二, 山岡 哲二, オリゴ乳酸 - ペプチドヘテロ結合体によるポリ乳酸表面修飾, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 10 日, 京都テルサ(京都府)
西村 和紀, 長畑 聡記, 葛谷 明紀, 馬原 淳, 山岡 哲二, 大矢 裕二, 血管再生用足場としての利用を意図した電界紡糸法による階層化チューブ構造体の作製, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日, 京都テルサ(京都府)
長畑 聡記, 梅田 貫史, 西村 和紀, 高橋

明裕, 葛谷 明紀, 大矢 裕二, ポリマーの形状回復能を用いた血管再生用足場を目指した生分解性チューブ構造体の作成, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日, 京都テルサ(京都府)

K. Nishimura, T. Nagahata, A. Takahashi, A. Kuzuya, A. Mahara, T. Yamaoka, Y. Ohya, Biodegradable Hierarchical Tubular Structures as Scaffolds for Regenerative Bloodvessels Prepared by Electrospinning, The 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 2015 年 10 月 19 日, Pacifico Yokohama (Kanagawa)

飯田 啓太, 北井 麻里奈, 神戸 裕介, 柿木 佐知朗, 大矢 裕二, 山岡 哲二, オリゴ乳酸-ペプチドヘテロ結合体によるポリ乳酸表面修飾, 日本バイオマテリアル学会 第 10 回関西若手研究発表会, 2015 年 8 月 5 日, 関西大学(大阪府)

西村 和紀, 長畑 聡記, 高橋 明裕, 葛谷 明紀, 馬原 淳, 山岡 哲二, 大矢 裕二, 血管再生用分解性スキャフォールドを目指した階層化チューブ構造体の電界紡糸法による作製, 日本バイオマテリアル学会 第 10 回関西若手研究発表会, 2015 年 8 月 5 日, 関西大学(大阪府)

長畑 聡記, 梅田 貴史, 西村 和紀, 高橋 明裕, 葛谷 明紀, 大矢 裕二, 小口径人工血管用スキャフォールドを目指した形状記憶ポリマーを用いた生分解性チューブ構造体の作成, 日本バイオマテリアル学会 第 10 回関西若手研究発表会, 2015 年 8 月 5 日, 関西大学(大阪府)

飯田 啓太, 柿木 佐知朗, 大矢 裕二, 山岡 哲二, オリゴ乳酸 - ペプチドヘテロ融合体によるポリ乳酸表面修飾の安定性評価, 第 61 回高分子研究発表会(神戸), 2015 年 7 月 17 日, 兵庫県民会館(兵庫県)

K. Nishimura, T. Nagahata, A. Takahashi, A. Kuzuya, A. Mahara, T. Yamaoka, Y. Ohya, Fabrication of Hierarchical Biodegradable Tubular Structures as Scaffolds for Regenerative Blood Vessels by Electrospinning, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 28 日, 札幌コンベンションセンター(北海道)

T. Nagahata, K. Umeda, A. Takahashi, A. Kuzuya, Y. Ohya, Preparation of Biodegradable Multi-layered Tubular Structures as Scaffolds for Regeneration of Blood Vessels, 9th International Symposium in Science and Technology at Cheng Shiu University 2014, 2014 年 8 月 19 日, Kaohsiung (Taiwan)

長畑 聡記, 梅田 貴史, 高橋 明裕, 葛谷 明紀, 大矢 裕二, 再生人工血管を目指した生分解性スキャフォールドを

用いた多層細胞ロールの調製, 日本バイオマテリアル学会 第 9 回関西若手研究発表会, 2014 年 8 月 5 日, 京都大学(京都府)

高橋 明裕, 梅田 貴史, 長畑 聡記, 葛谷 明紀, 大矢 裕二, 再生人工血管用スキャフォールドを目指した生分解性形状記憶ポリマーによる多層チューブ構造の作成, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014 年 5 月 28 日, 名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計 6 件)

大矢 裕二, 化学同人, CSJ カレントレビュー-24 『化学で医療・診断・創薬の革新を目指す』, 2016, 印刷中

Y. Ohya 他, Springer, Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, 2016, 2617 (139-145)

大矢 裕二 他, 東京化学同人, バイオマテリアル その基礎と先端研究への展開, 2016, 368 (27-52)

Y. Ohya 他, Elsevier, Biomaterials Nanoarchitectonics, 2016, 362 (47-57)

大矢 裕二 他, シーエムシー出版, 進化する医療用バイオベースマテリアル, 2015, 272 (235-243)

大矢 裕二 他, サイエンス&テクノロジー, 生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略~モノマー(いち)からデザインするバイオインターフェースと上市までの道筋~, 2014, 432 (51-73)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大矢 裕一(OHYA, Yuichi)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 10213886