

令和元年6月14日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04524

研究課題名(和文)血管新生能と湿潤組織接着能を有する成長因子フリー高強度接着剤の創製

研究課題名(英文) Development of growth factor-free tissue adhesives with angiogenic and tissue adhesive properties

研究代表者

田口 哲志 (Taguchi, Tetsushi)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・グループリーダー

研究者番号：70354264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生能と組織接着能を両立する接着剤を創出するため、常温流動性を有するスケソウダラ由来ゼラチン(Org-ApGln)に疎水基を導入したhm-ApGlnと、ポリエチレングリコール系架橋剤から構成される接着剤を設計した。ブタ大動脈に対する耐圧試験において、調製した接着剤は疎水基導入により優位に耐圧(接着)強度が増加した。また、hm-ApGlnはマクロファージ系細胞に対し、Org-ApGlnおよび組織培養用シャーレ上と比較して優位に高い血管内皮細胞増殖因子の産生を誘導した。さらに、hm-ApGlnゲルはマウス皮下への埋入初期において優位に血管新生を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた材料は、生体内の湿潤環境において接着すると同時に、成長因子を追加することなく血管新生を誘導できることから、虚血性部位への適用や血管床を必要とする再生医療分野への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：An adhesive composed of hydrophobically-modified Alaska pollock-derived gelatin (hm-ApGln) and a poly(ethylene glycol)-based crosslinker was obtained by introducing a hydrophobic group into original ApGln (Org-ApGln) having room temperature fluidity in order to create an adhesive having both angiogenic and tissue adhesive property. From the pressure test on porcine aorta, the prepared adhesive increased its pressure (adhesion) strength significantly by the introduction of hydrophobic groups. In addition, hm-ApGln induced significantly higher production of vascular endothelial cell growth factor in macrophage-like cells as compared with Org-ApGln. Furthermore, hm-ApGln gel promoted angiogenesis significantly in the early stage of mouse subcutaneous implantation.

研究分野：医用材料、生体接着科学

キーワード：接着剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外科手術時における患部の閉鎖には一般に縫合糸が用いられるが、手術時間の短縮と患者負担の軽減を目的として、数種類の外科用接着剤が開発されている。既存の外科用接着剤は、強度と生体親和性に一長一短があり、両者を併せ持つものが望まれている。外科用接着剤は、対象となる被着体が水分を多く含む生体組織であり、血液やリンパ液等の生じる湿潤環境下において生体組織に接着するための分子設計に加え、治癒を効果的に促進するための血管新生を促す分子設計が課題となる。これまで、シリカナノ粒子を用いた接着剤、カテコール基導入架橋剤を用いた接着剤等の研究が報告されている。一方、創傷治癒を促進するための血管新生の手法として成長因子を人工材料から徐放させる研究が行われている。しかしながら、成長因子の活性の安定性や価格に課題があり、血管新生を促進し、湿潤環境下で高い強度を示す生体接着材料に関する研究は行われていない。

一方、報告者はこれまでに生体高分子とクエン酸等の有機酸から合成した架橋剤の二成分から構成される外科用接着剤の研究を進め、強度と生体親和性が両立できることを明らかにしてきた。また、ポリエチレングリコールのような親水性高分子に脂溶性分子(疎水基)を導入した両親媒性高分子を培養液中(水環境下)において細胞に作用させると、疎水基が細胞の脂質二分子膜にアンカリングすることで細胞凝集塊形成が促進されると共に細胞機能を著しく向上させることを見出してきた。さらに、このような研究を通じて疎水基を導入したゼラチンと生体親和性架橋剤からなる液状の接着剤を考案し、疎水化ゼラチンを用いることにより、湿潤生体組織に対して高い界面接着強度と生体親和性を併せ持つことが可能であることを明らかにした。さらに、アルキル基を導入した疎水化ゼラチン多孔膜は、成長因子を添加することなく血管新生を促進することを明らかにした。これらの研究により、接着能と血管新生能を併せ持つ材料が創出できれば、再生医療領域へ展開できる基盤技術となることが考えられるため、本研究を推進した。

### 2. 研究の目的

本研究では、常温流動性を有するスケソウダラ由来ゼラチン(ApGlt n)に疎水基を導入した hm-ApGlt n と生体親和性架橋剤から構成され、体内の湿潤環境における高い組織接着性と、血管新生を示す接着剤を創出する。疎水基鎖長および導入率等の材料パラメータの湿潤生体組織に対する接着強度および血管新生への影響を検討する。さらに、ラベル化した hm-ApGlt n を細胞に作用させ、hm-ApGlt n の細胞・組織に対する浸透性(アンカー効果)を追跡することにより、接着メカニズムを明らかにする。さらに表面プラズモン共鳴法により hm-ApGlt n と細胞外マトリックス成分と相互作用解析を行う。また、細胞・小動物を用いて hm-ApGlt n の血管新生能をバイオイメーキング技術等により評価する。

### 3. 研究の方法

#### 1) hm-ApGlt n ゲルの調製と物理化学的特性評価

合成した hm-ApGlt n のアミノ基を末端にスクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール系架橋剤により in situ 架橋することで、hm-ApGlt n ゲルを得た。動的粘弾性評価による貯蔵弾性率/損失弾性率の測定により得られたゲルの基礎物性と疎水基導入の効果を評価した。

#### 2) hm-ApGlt n ゲルの物理解析と細胞との相互作用評価

得られた hm-ApGlt n ゲル上に細胞を播種することによる細胞のゲル表面、内部への動的挙動とゲルの構造について評価した。細胞には血管内皮細胞(HUVEC)を使用した。

#### 3) 生体組織に対する接着性評価

調製した接着剤を新鮮なブタ大動脈に塗布し、接着剤評価規格(ASTM F2392-04 Standard Test Method for Burst Strength of Surgical Sealants)に則って作成した耐圧試験装置を用いて新鮮なブタ大動脈に対する耐圧強度を評価した。試験後、組織接着剤との剥離界面をヘマトキシリンエオジンにより染色し、接着剤と湿潤生体組織との界面剥離挙動と接着剤組成との関係を観察することにより、接着メカニズムを考察した。また、ラット摘出肺に一定面積の欠損を作成し、欠損部位に調製した接着剤を塗布することによる耐圧強度についても検討した。

#### 4) 細胞・組織レベルでの接着メカニズムの検討

hm-ApGlt n を蛍光物質でラベル化し細胞に添加して一定期間培養後、hm-ApGlt n の細胞表面への集積化を蛍光顕微鏡により観察した。また、表面プラズモン共鳴(SPR)法により hm-ApGlt n と組織表面・内部に存在する細胞外マトリックス成分との相互作用解析を行った。

#### 5) in vitro/in vivo 分解性評価

ディスク状のゲルを調製し、37 のコラゲナーゼ溶液中に浸漬することにより、in vitro の環境下における分解性を重量減少の定量により追跡した。また、体内での分解性を評価するため、ラットの背部皮下にディスク状ゲルを埋入後、継時的に周辺組織を含む接着剤のヘマト

キシリン-エオジン染色を行い、疎水基導入と分解吸収性との関係を考察した。

#### 6) in vitro/in vivo 評価による血管新生メカニズム解析

hm-ApGlt n による血管新生メカニズムを in vitro において明らかにする手法の一つとしてマクロファージ系細胞(RAW264)に hm-ApGlt n を添加し、Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現を定量した。また、血管新生の定量的 in vivo 評価法としてレーザードップラー血流計を用い、材料をマウス皮下埋入後における血管新生をイメージングにより定量した。

### 4. 研究成果

#### 1) hm-ApGlt n ゲルの調製と物理化学的特性評価

スケトウダラ由来ゼラチン(ApGlt n)中のアミノ基を種々の疎水基で修飾した hm-ApGlt n を合成した。核磁気共鳴スペクトル(<sup>13</sup>C-NMR)、フーリエ変換赤外吸収スペクトル(FT-IR)により得られた hm-ApGlt n のキャラクタリゼーションを行った。得られた hm-ApGlt n のアミノ基を末端にスクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール系架橋剤により in situ 架橋することでゲルを調製した。動的粘弾性測定により周波数依存の動的粘弾性を測定し、周波数 1.0Hz における貯蔵弾性係数をせん断係数として、ゲル強度の比較を行った。フィブリン接着剤と比較して、いずれの hm-ApGlt n ゲルも高いゲル強度を示した。長鎖アルキル C18 を導入した C18-ApGlt n についての導入率変化を比較すると、導入率の増加に伴ってゲル強度が増加した。また、導入したアルキル鎖長の効果を検討すると、長鎖アルキルの接着剤は短鎖アルキルと比較して高いゲル強度を有することが明らかとなった。これらの結果は、疎水基の導入に伴い高分子ゲル内において物理架橋点が形成されたことに起因すると考えられた。一方、短鎖アルキルについては疎水性が低いことから、物理架橋点の形成頻度が低いことが予想された。これらの結果から、疎水基種および導入率の調整によって、ゲル強度の制御が可能である事が示唆された。

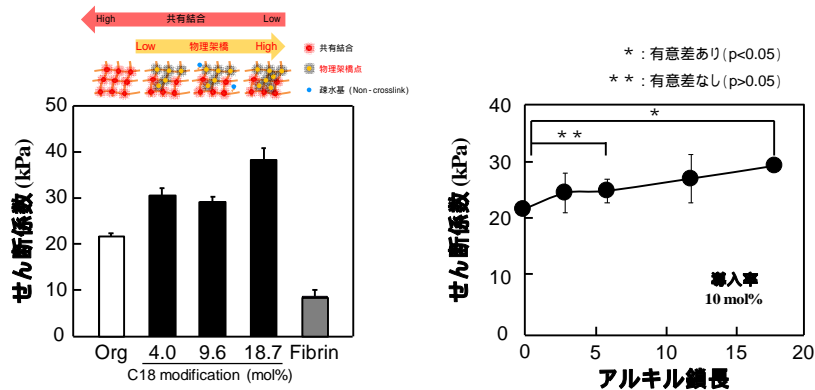


図 1 疎水化タラゼラチン接着剤のゲル強度 a) 導入率の異なる C18-ApGlt n のせん断係数 b) せん断係数に及ぼすアルキル鎖長の効果

#### 2) hm-ApGlt n ゲルの物理解析と細胞との相互作用評価

ゲル上に HUVEC を播種すると、Org-ApGlt n 上では表面のみで増殖するのにに対し、hm-ApGlt n ゲルではゲルの中へ細胞が浸潤していく様子が認められた。調製した hm-ApGlt n ゲルは Org-ApGlt n ゲルと比較して弾性率、膨潤度の有意な差は認められなかった。また、ピレンを用いた疎水性ドメインの評価において、Org-ApGlt n ゲルと比較して hm-ApGlt n ゲルは蛍光強度が増加したことから、疎水部分が多く存在することが明らかとなった。また、ゲル表面に対する水接触角測定により hm-ApGlt n ゲルは Org-ApGlt n ゲルと比較して水の浸透速度が有意に高いことが明らかとなった。さらに、ラット背部皮下に埋入したゲルと組織界面における切片を観察すると、hm-ApGlt n 内部に対する線維芽細胞の有意な浸潤が確認されことから、hm-ApGlt n 中の疎水基同士が水環境中で会合することで、架橋ネットワークが不均一となり、空隙が生じたことに起因していると考えられた。

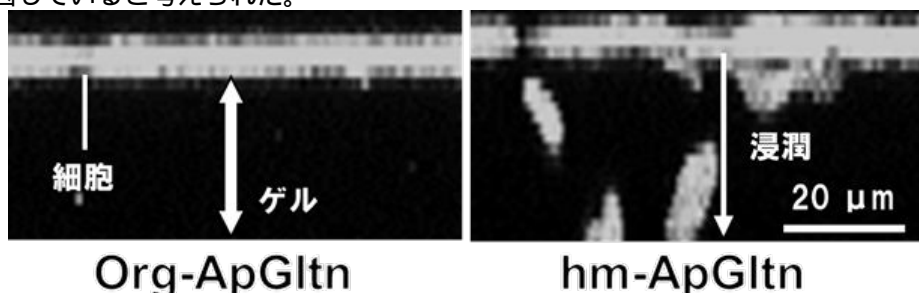


図 2 タラゼラチンの疎水化によるゲル内部への細胞浸潤性促進 (左) 疎水化無し、右) 疎水化有り)

### 3) 生体組織に対する接着性評価

新鮮なブタ大動脈に対する耐圧強度は、合成した全ての hm-ApGln において Org-ApGln と比較して高い値を示した。また導入率 10 mol%程度 の hm-ApGln についてアルキル鎖長の効果を評価した結果、鎖長増加に伴い耐圧強度が増加する傾向が認められた。さらに、耐圧強度試験後の接着剤-大動脈組織界面をヘマトキシリン-エオジン染色後に観察した結果、Org-ApGln では組織との広範囲な破断が観察されたのに対し、耐圧強度の高い Ste(C18)-ApGln では組織破壊が観測された。これらの結果から、ApGln への疎水基導入により、組織浸透性が向上し、接着剤と組織間の界面強度を増加させることで、耐圧強度が効果的に改善したと考えられた。また、ラット摘出肺に形成した欠損部位に対する閉鎖効果を比較した結果、hm-ApGln 接着剤は市販品と比較して優位に高い耐圧強度を有することが明らかとなった。

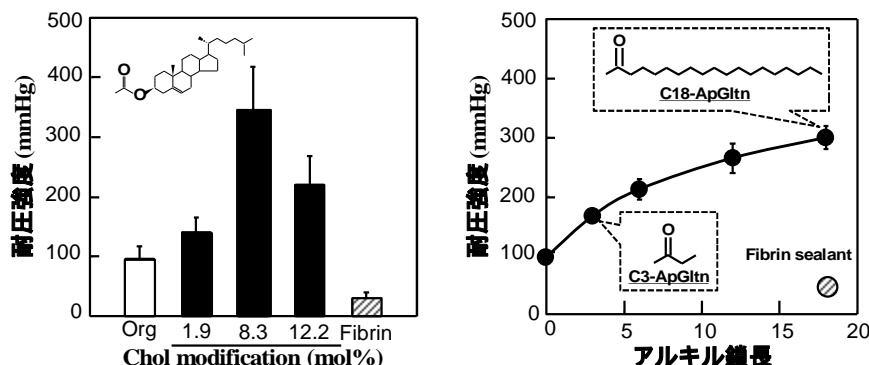


図3 疎水化タラゼラチン接着剤のブタ大動脈に対する耐圧強度 (a) Chol-ApGln の耐圧強度 (b) アルキル鎖長の効果)

### 4) 細胞・組織レベルでの接着メカニズムの検討

蛍光ラベル化した hm-ApGln を線維芽細胞に添加後、蛍光顕微鏡による細胞の観察により、hm-ApGln は ApGln と比較して細胞表面により多く集積することが明らかとなった(図4)。これは、疎水基を導入することによって脂質二重膜で構成される細胞表面へのアンカー効果が生じたことに起因すると考えられた。一方、血管や肺の組織は、主に弾性繊維を形成するエラスチンやコラーゲン、細胞接着性分子であるフィブロネクチンなどの細胞外基質タンパク質 (ECM) で構成されている。そこで表面プラズモン共鳴法により、hm-ApGln と ECM 成分との相互作用を測定した。フィブロネクチンとの相互作用を測定した結果、Chol-ApGln および C18-ApGln は Org-ApGln と比較して優位に高い結合定数を示した。フィブロネクチンは、その構造内に細胞やゼラチンとの結合領域を有していることに加えて、約 50% が疎水性アミノ酸で構成されている。そのため、ApGln に導入した疎水基がフィブロネクチンとの分子間相互作用を向上させたと考えられる。さらに、血管や肺の弾性繊維を形成するエラスチンは約 96% が疎水性アミノ酸で構成されていることから、ApGln の疎水化は ECM との分子間相互作用を向上させ、組織接着性の改善に効果的であると考えられた。以上のことから、ゼラチンの疎水化によって細胞および ECM との疎水性相互作用が向上した結果、湿潤生体組織への界面強度および耐圧強度が改善されたと考えられた。

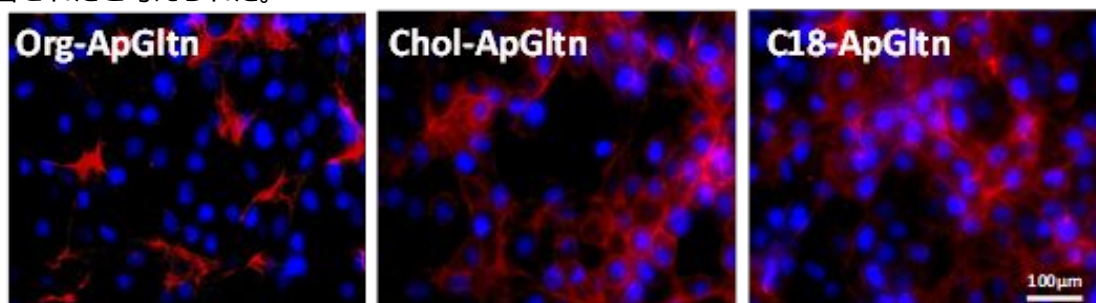


図4 hm-ApGln の細胞膜へのアンカー効果 (青：細胞核、赤：ゼラチン)

### 5) in vitro/in vivo 分解性評価

hm-ApGln 接着剤はゼラチンを基盤とした材料で構成されているため、体内において主に酵素分解が行われると考えられる。そこで酵素分解について、コラーゲンの分解酵素であるコラーゲナーゼを用いて、in vitro 分解性の評価を行った。図 5a のように、hm-ApGln は Org-ApGln と比較して分解速度が遅いものの、完全に酵素分解された。また、体内での分解・吸収性評価として、hm-ApGln と末端にスクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール系架橋剤により一定サイズのディスク状ゲルを調製し、マウス背部皮下に埋入後、組織観察を行った。接着剤の分解・吸収性を経時的に観察した結果、4 週間以内に Org-ApGln が、8 週間以内には hm-ApGln が完全に分解吸収された(図 5b)。hm-ApGln については、4 週後に材料内部への細胞浸潤が認められた。hm-ApGln による分解速度の遅延は、疎水基導入により物理架橋点が生

成され、水分子・プロテアーゼの接着剤内部への拡散速度が減少したことによると考えられた。さらに hm-ApGltN については接着剤内部への細胞浸潤が観察されたことから、接着剤が細胞浸潤を促進する足場としての役割も果たしていることが示唆された。これらの *in vitro*, *in vivo* の分解性評価結果から、hm-ApGltN 接着剤は体内において酵素的に分解することが明らかとなった。

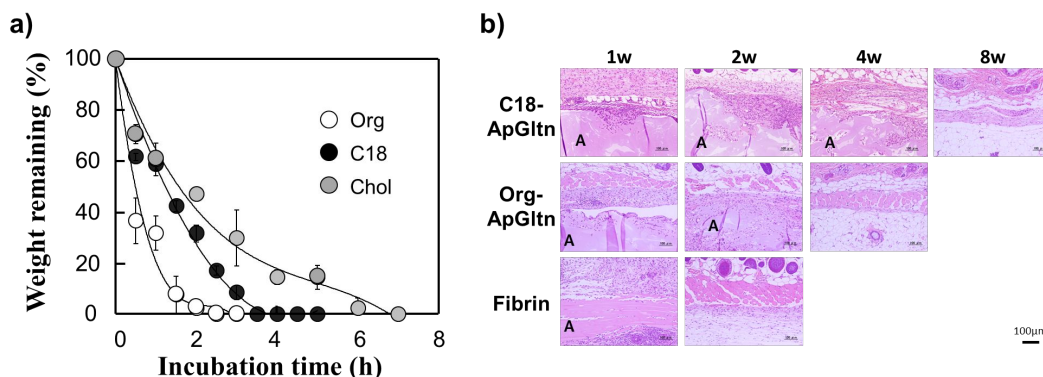


図5 疎水化タラゼラチンゲルの *in vitro*, *in vivo* 分解性評価 (a) *in vitro* コラゲナーゼ分解性試験 b) *in vivo* マウス皮下埋入試験 (A: 接着剤))

#### 6) *in vitro/in vivo* 評価による血管新生評価およびメカニズム解析

hm-ApGltN を RAW264 に添加することにより TNF- $\alpha$  の発現は優位に増加し、長鎖長のアルキル基において高い発現傾向が観察されたことから、hm-ApGltN がリポポリサッカライド様の一部機能を有していることが示唆された。また、hm-ApGltN は RAW264 に対し、Org-ApGltN および組織培養用シャーレ上と比較して 5 倍量の VEGF 産生を誘導した。一方、マウス皮下に hm-ApGltN 埋入後、1 週間以内においては、*in vitro* の結果と同様に疎水基導入に伴い、優位に血管新生が促進された (図 6)。しかしながら、1 週間後においては、血管新生作用はほとんど差がなくなったことから、hm-ApGltN が一時的に血管新生を促進し、血管新生に伴う酵素によりゼラチン分子が分解されることにより、血管新生作用が低下することが示唆された。また、材料および周辺組織の免疫染色を行った結果、Org-ApGltN およびリン酸緩衝液添加と比較して、hm-ApGltN は NF- $\kappa$ B、VEGF、CD31 のすべての発現面積が有意に高い値を示した。このことから、hm-ApGltN は VEGF 遺伝子のプロモーターとして働く NF- $\kappa$ B の産生を誘導することで、VEGF 産生および血管新生を促進したと考えられた。



図6 タラゼラチンの疎水化による *in vivo* 血管新生(左) 疎水化無し、(右) 疎水化有り)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件、全て査読有)

- 1) R. Mizuta, T. Taguchi, Hemostatic properties of in situ gels composed of hydrophobically modified biopolymers, J Biomater Appl, 33, 315-323 (2018).
- 2) R. Mizuta, T. Taguchi, Enhanced sealing by hydrophobic modification of Alaska pollock-derived gelatin-based surgical sealants for the treatment of pulmonary air leaks, Macromol Biosci, 17, 1600349 (2017).
- 3) Y. Mizuno, R. Mizuta, M. Hashizume, T. Taguchi, Enhanced sealing strength of a hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin-based sealant, Biomater Sci, 5, 982-989 (2017).
- 4) T. Taguchi, R. Mizuta, T. Ito, K. Yoshizawa, M. Kajiyama, Robust sealing of blood vessels with cholesteryl group-modified, Alaska pollock-derived gelatin-based biodegradable sealant under wet conditions, J Biomed Nanotechnol, 12, 128-134 (2016).

- 5) R. Mizuta, T. Ito, T. Taguchi, Effect of alkyl chain length on the interfacial strength of surgical sealants composed of hydrophobically-modified Alaska-pollock-derived gelatins and poly(ethylene)glycol-based four-armed crosslinker, Colloid Surf B, 146, 212-220 (2016). 他 2 件

〔学会発表〕(計 44 件)

- 1) 水野陽介、田口哲志,細胞浸潤性を制御した疎水化タラゼラチンゲルの創製,つくば医工連携フォーラム 2019,2019/1/25
- 2) 田口哲志,革新医療の実現に向けた生体接着材料の開発,つくば医工連携フォーラム 2019,2019/1/25
- 3) 田口哲志,材料と生体との界面接着性制御による医療用材料の開発,化学工学会 材料界面部会 共通基盤シンポジウム 2019,2019/1/10
- 4) 水野陽介、田口哲志,細胞浸潤性を向上する疎水化タラゼラチンゲルの創製,第 40 回日本バイオマテリアル学会大会,2018/11/12
- 5) 田口哲志,低侵襲治療を可能にする革新的生体材料の研究開発,鹿児島大学工学部 平成 30 年度「先端科学特別講義」,2018/10/24
- 6) 水田亮、田口哲志,強度と生体親和性を両立する革新的外科用接着剤の開発,第 67 回高分子討論会,2018/9/12
- 7) 田口哲志、水田亮,Enhanced Bonding Strength of Hydrophobically-modified Fish Gelatin-based Tissue Adhesive, EURADH 2018 and CLBA 2018,2018/9/5
- 8) 西口昭広、田口哲志,Development of sprayable colloidal wound dressing for digestive system cancer therapy,2018 TERMIS World Congress,2018/9/4
- 9) 田口哲志,カテーテル感染防止を可能にする外科用接着剤の開発,第 27 回日本次世代人工腎臓研究会,2018/9/2
- 10) 田口哲志、水田亮,Development of a Fish Gelatin-based Soft Tissue Adhesive for Biomedical Applications,CIMTEC2018,2018/6/4 他 34 件

〔図書〕(計 6 件)

- 1) 田口哲志,血管内皮細胞増殖因子固定化ニッケルフリー高窒素ステンレス鋼,シーエムシー出版,256-264 (2018).
- 2) 水野陽介、田口哲志,湿潤臓器・組織表面へ接着する生体吸収性接着剤の設計と機能,生体吸収性材料の開発と安全性評価,266-271 (2017).
- 3) 水田 亮、田口哲志,hm-ApGln接着剤,医療用バイオマテリアルの研究開発,シーエムシー出版,117-126 (2017).
- 4) 田口哲志,生体を接着するには,表面界面ハンドブック,112-119 (2016).
- 5) 水田 亮、田口哲志,hm-ApGln の材料特性と非臨床試験評価,手術用接着剤材・癒着防止剤の利便化向上を目指した製品開発,(株)技術情報協会,206-213 (2016).
- 6) 水田 亮、田口哲志,医用高分子材料の生体組織への接着力向上と応用実例,手術用接着剤材・癒着防止剤の利便化向上を目指した製品開発,(株)技術情報協会,,278-287 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nims.go.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:西口昭広

ローマ字氏名:Nishiguchi Akihiro