

平成30年6月13日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12891

研究課題名（和文）超高速リモデリングを可能とするインジェクタブルな細胞デリバリー骨充填剤

研究課題名（英文）Injectable cell delivery hydrogel for rapid bone remodeling

研究代表者

岩永 進太郎（Shintaroh, Iwanaga）

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・特命助教

研究者番号：70587972

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨損傷部分を早期に回復可能なインジェクタブル細胞デリバリー充填剤の開発を目指した。従来のリン酸カルシウムペーストやリン酸カルシウムの粒子などの骨充填剤に代わり、細胞を内包したまま骨の主成分であるハイドロキシアパタイトなどの無機成分と接着可能なハイドロゲルの開発および骨細胞のカルシウム生成・沈着が促進される足場材料の開発を行った。リモデリング促進のため、カルシウム沈着を行いやすい足場材料の開発を行った。ゼラチンに等の多重修飾を行うことで、速やかにカルシウム沈着が行われ、無機材料であるガラスやハイドロキシアパタイトと強固に接着するハイドロゲル材料の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we have aimed to develop injectable hydrogel materials that can be used for rapid bone regeneration. Instead of conventional bone prosthetic materials like inorganic calcium phosphate paste, we have tried to synthesize organic hydrogel materials in which cells can be encapsulated, and that can strongly adhere to inorganic material surfaces such as hydroxy apatite of bone mainly constituent. First, to promote bone remodeling process, we have synthesized scaffold materials where calcification could easily form. Multiple modification of gelatin materials enables us to successfully prepare injectable hydrogel materials that can be adhere and connected to inorganic glass or hydroxy apatite surfaces, and where calcium deposit can be rapidly formed. We have also confirmed good cell viability when cells were cultured on and within the hydrogel materials.

研究分野：組織工学、化学工学、生体材料

キーワード：組織工学 バイオマテリアル 高分子 有機・無機マテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

骨充填剤として無機材料であるリン酸カルシウムのペースト剤や、有機材料であるコラーゲンとの複合材料を用いる方法が検討されている。しかしながら、いずれにおいても生体内で最終的に骨に置換される工程(骨リモデリング)速度が非常に遅いことが知られている。そこで、骨リモデリングを促進するために充填剤表面にカルシウム沈着が起こりやすい素材の開発に着目した。材料表面が細胞との親和性が高く、かつカルシウム沈着が起こりやすい素材であれば、骨芽細胞を培養したときに分化誘導を引き起こしやすくなり、更には細胞の表面自体にもカルシウムの沈着が起こりやすくなるのではないかと考えた。また、従来の骨充填剤(とりわけリン酸カルシウムペースト)では細胞とともに患部へ充填することが困難であるため、骨リモデリングが表層からしか起こらず、これもリモデリング速度を遅くする要因であると考えた。そこで、骨芽細胞を内包した状態で患部へ注入できるインジェクタブル骨充填剤を開発することができれば骨組織工学の発展へ大きく寄与することができると期待される。

## 2. 研究の目的

現在、日本の人口における65歳以上の割合は27%にも登っており、2045年にはすべての都道府県において65歳以上の人口比が30%を越えると試算されている。これから迎える超高齢化社会に対し、如何にして健康を保ち、QOL (quality of life) を高い状態に保つかが重要になってくる。高齢になるにつれ、身体能力の衰えが著しくなるが、中でも骨折は中若年層に比べ、致命傷になりかねないとも言われている。また、骨密度が低下する骨粗鬆症も発症が非常に多くなり、結果として骨折を引き起こされてしまう。現在では骨折や骨粗鬆症の治療の一つとして人工骨(主にリン酸カルシウムペースト剤)を用いる治療法がなされている。しかしながら、持ちられているリン酸カルシウムペーストでは、内部に細胞を内包させる事ができず、また、注入後も内部に空隙ができることはないため、骨芽細胞が骨充填剤の内部に侵入することができない。結果として、人工骨と生体骨が置き換わる骨リモデリングのプロセスは、人工骨の表面からしか起こることができず、リモデリング速度の低下に繋がる。また、用いるリン酸カルシウムの材料によっては、そもそもリモデリングが起こらない材料もあるため、いつまでも生体骨への置換が進まない状況になってしまうことも問題である。

そこで、本研究では骨リモデリングを促進可能な骨充填剤材料の開発を試みた。リモデリングを促進する方法として、材料表面へのカルシウム沈着が起こりやすくするための材料修飾を施す事に着目をした。また、骨ペースト剤には細胞を内包させる事ができな

いため、細胞を内包して患部へデリバリー可能な骨充填剤として、インジェクタブル可能なハイドロゲル材料をベースに材料開発を試みた。

## 3. 研究の方法

細胞に対して親和性があり、様々な修飾が可能な材料として、ゼラチンをベースマテリアルに選定した。

### (1) カルシウム沈着を促進するゼラチンハイドロゲルの作製

ゼラチンは細胞培養時の37℃においてはゾル化してしまうため、安定なハイドロゲルを形成させるために無水メタクリル酸により修飾し、メタクリロイル基を導入した光架橋性ゼラチン(MAGel)を作製した。その後、光架橋性ゼラチンのカルボキシル基をカルボジイミドで活性化し、リン酸エタノールアミンを修飾することで、多重修飾したゼラチンハイドロゲル材料(MAGel-PEA)を作製した。

### (2) 多重修飾ゼラチンを用いたマイクロゲルボールの作製

多重修飾を施したゼラチンハイドロゲルを細胞デリバリー担体に利用するため、マイクロゲルボールの作製を行った。マイクロゲルボールの作製には、多孔性膜であるSPG (Sirasu Porous Glass) 膜を用い、大豆レシチンを乳化剤として溶解させたコーン油中で作製した。また同様に、多重修飾ゼラチンに生分解性を有するマルチアーム型の光架橋性ポリカプロラクトン(6-arm MAPCL)を適量混合したものでマイクロゲルボールの作製を行った。ゼラチンのゲル化は365nmのUV光を照射することで行った。

### (3) 無機材料と接着可能なゼラチンハイドロゲルの作製

MAGelのカルボキシル基をカルボジイミドで活性化し、スクシンイミジル基を修飾することによって、活性化部位が安定なMAGel(MAGel-NHS)を作製した。作製した活性化MAGelをハンクス平衡塩溶液(HBSS)に溶解し、適量のアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を混合し、30分室温で静置後に、シリコンスパーサーを挟んだ2枚のスライドの隙間にゲル溶液を注入し、UV照射にてゲル化させた。比較対象として、未修飾のMAGel、MAGel-NHSでも同様にスライドガラス間にゲルを作製した。また、成体ラットから大腿骨ないしは骨盤採取し、洗浄・乾燥させたものとスライドガラスでも同様にゲルと接着するかを確認した。

### (4) 細胞培養

MAGel-PEAのゲルシートを12ウェルプレート内で作製し、培地で洗浄・置換した後、ラット新生児由来初代骨芽細胞(RNOs)お

よびマウス由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 をゲルシート上に播種した。ゲルシート上でコンフルエントに達した後、分化誘導培地に変更し、培養を行った。適当時間培養後、細胞をホルマリン溶液で固定化し、カルシウムの沈着が起きているかをアリザリンレッドによる染色で確認した。また、マイクロゲルボールでも同様に細胞を接着させ、カルシウム沈着が起きているかを確認した。

#### 4. 研究成果

作製した MAGel-PEA からゲルシートを作製し、擬似体液 (SBF 液) に浸漬した結果、X線回折の分析から表面にリン酸カルシウムの沈着が行われていることが確認された。一方で、未修飾の MAGel や I 型コラーゲンゲルでは表面にカルシウムの沈着は見られなかった。更に、ゲルシート表面で細胞培養を行った結果、MAGel シートおよび MAGel-PEA シートのいずれも細胞が非常によく接着進展していることが確認できた。骨芽細胞のカルシウム沈着に関しては、MAGel-PEA では分化誘導 1 日目からすでに表面全体が強くアリザリンレッドで染色されていた事から、非常に早い段階でカルシウム沈着が行われていることが示唆された。

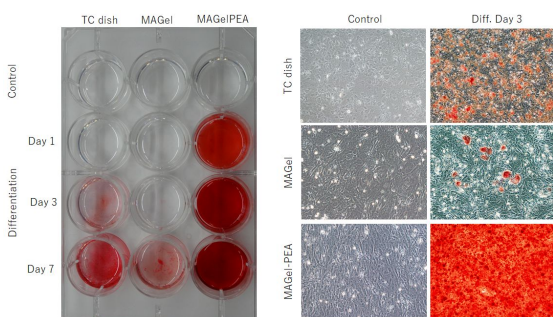


図 1. ゲルシート上における細胞培養およびカルシウム沈着

SPG 膜を用いたマイクロゲルボールの作製では、平均粒径がおよそ 150  $\mu\text{m}$  の均一性の高いゲルボールを作製することが可能であった。6-arm MAPCL を混合したゲル溶液でも問題なくマイクロゲルボールを作製することができた。6-arm MAPCL の混合割合によって、擬似体液中に浸漬しておいたときの分解速度が異なることが明らかとなった。細胞の接着に関しては、6-arm MAPCL の有無によらず、ゲルボール上に細胞が接着していることが確認された。また、今回の 6-arm MAPCL 混合量の範囲 (最大 20%) においては、MAGel-PEA のカルシウム沈着に関して明確な際はなく、いずれも分化誘導 1 日目から骨芽細胞接着マイクロゲルボールがアリザリンレッドで強く染色された結果となった。以上の結果から、リン酸エタノールアミンを修飾することによって極めて早い段階で材料及び細胞表面にカルシウムの沈着を誘発可能な材料を作製することに成功した。

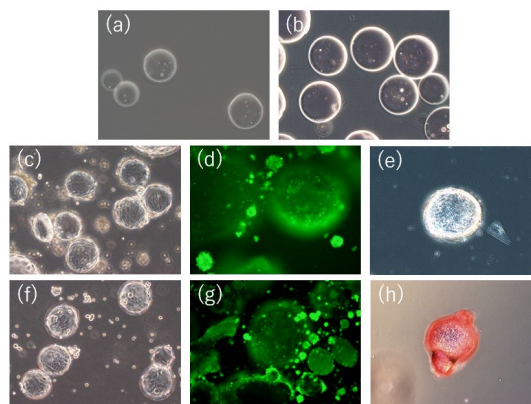


図 2. ハイドロゲルボールに接着した骨芽細胞の様子

次に、スライドガラスの隙間内でゲル化した結果から、APTES と MAGel-NHS を混合して作製したゲルでは、ゲルと 2 枚のスライドガラスが強固に接着しており、垂直に傾けてもそれぞれが分離することはなかった。一方で、未修飾の MAGel および MAGel-NHS のみでスライドガラス間にゲルを作製したものに関しては、ゲルとスライドガラスは全く接着しておらず、僅かな振動ですぐに分離してしまった。また、ラット骨を用いた場合でも同様に、MAGel-PEA ゲルでは骨とスライドガラスおよびゲルが分離することはなく、しっかりと接着していることが確認された。

スライドガラスとの接着が行われているのを確認した後、APTES と MAGel-NHS を培養液を用いて混合調整したものに細胞を懸濁させてゲル化させた。APTES の混合割合が増えるとともに細胞の死滅割合が増加することが確認されたが、スライドガラスとの接着を行うために必要な量の範囲では、85% 以上の細胞が生存し、ゲル内部で増殖することを確認した。

以上、本実験結果により、作製した多重修飾ゼラチンハイドロゲルが骨リモデリングを促進可能なインジェクタブルマテリアルとして利用可能であることを示した。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Shintaroh Iwanaga, Makoto Nakamura, Osteo-balls with Organic-Inorganic Chimeric Hydrogel Microbeads, 44th ESAO and 7th IFAO Congress, Vienna, Austria (2017)
- (2) Shintaroh Iwanaga, Yoshiyuki Tsuchiyama, Shiro Moriyama, Takuma Hojo, Keiji Amemiya, Makoto Nakamura, Biofabrication of 3D tissue models by assembling cell-laden hydrogel units, Basel Life 2017, Basel, Switzerland (2017)
- (3) 岩永進太郎, 中村真人: ダブル物理架橋ゲルを用いた内腔構造組織の作製, 化学工学会金沢大会 2017, 金沢 (2017)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 進太郎 ( SHINTAROH IWANAGA )

富山大学・特命助教

研究者番号：70587972