

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10276

研究課題名(和文) 機能化ポリ乳酸系バイオアクティブフィルムの創製とiPS細胞の挙動について

研究課題名(英文) Fabrication of functionalized polylactic acid-based bioactive film and behavior of iPS cells

研究代表者

布施 恵(長井恵)(FUUSE, Megumi)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：30343578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、再生医療分野でES細胞やiPS細胞が失われた組織や臓器の再生のため大きな期待が寄せられている。歯科領域においても、歯周組織と歯槽骨の再生のためポリ乳酸やポリ-ε-カプロラクトンなどの生分解性ポリマーが、齲蝕、歯周病、口腔腫瘍や外傷によって失われた顎骨の欠損部の再建の足場として応用されている。歯槽骨は非常に複雑な形態をしており、術後そのまま放置すれば必要な組織の構築は難しい。組織・臓器の形成が進むとともに、それに見合った形態や速度で分解するフィルムが求められている。最終的に正常組織へ置換され、望みどおりの形態をした組織が構築できることを目指した機能化した再生フィルムの創製を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PLAは、安全性や生体適合性に優れていることは広く知られていが、高結晶性であるので固く柔軟性にかけるため複雑な顎骨への適合性や成形性、さらに分解速度の遅さなどが問題視されている。また、PLAは疎水性であり親和性に乏しく、細胞の接着、伸展、増殖、分化をおこすような生理活性機能はない。材料表面と細胞の親和性は組織再生に重要な要素で、高機能性を有するためには、細胞接着因子、細胞増殖因子、細胞誘導因子などの生理活性物質を足場に付与することが求められている。

本研究では、これらの問題点の解決のため、PLAの物性の制御と生理活性物質を付与し、機能化した足場材としてバイオアクティブフィルムの創製を目指す。

研究成果の概要(英文)：Recently, ES cells and iPS cells are expected to regenerate lost tissues and organs in the field of regenerative medicine. In the field of dentistry, biodegradable polymers such as poly lactic acid (PLA) and poly-ε-caprolactone (PLCL) are used to regenerate periodontal tissue and alveolar bone, and are useful in reconstructing alveolar bone defects that have been lost due to caries, periodontal disease, oral tumors, and trauma.

Alveolar bone has a very complicated morphology and is difficult to structure. As the formation of tissues and organs progresses, there is a demand for films that degrade in a form and at a rate that matches them. We created a functionalized regenerated film with the aim of finally replacing it with normal tissue and constructing a tissue with the desired shape.

研究分野：再生医療分野

キーワード：ポリ乳酸 ポリ-ε-カプロラクトン アルカリ加水分解 アパタイト 生分解性ポリマー 細胞 フィブロネクチン コラーゲン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療分野でES細胞やiPS細胞が失われた組織や臓器の再生のため大きな期待が寄せられている。歯科領域においても、歯周組織と歯槽骨の再生 (Guided Tissue Regeneration: GTR) や顎骨の再生 (Guided bone Regeneration: GBR) に組織工学材料として生分解性材料であるポリ乳酸(PLA)やポリグリコール酸(PGA)を応用した GTR メンブレン, GBR メンブレンが、齶蝕, 歯周病, 口腔腫瘍や外傷によって失われた顎骨の欠損部の再建の足場として応用されている。

PLA は、再生材料として長い歴史があり、安全性や生体適合性に優れていることは広く知られている。しかし、高結晶性であるので固く柔軟性にかけるため組織に対する適合性や材料の成形性、さらに分解速度の遅さなどが問題視されている。また、PLA は疎水性であり親和性に乏しく、細胞の接着、伸展、増殖、分化をおこすような生理活性機能はない。材料表面と細胞の親和性は組織再生に重要な要素で、高機能性を有するためには、細胞接着因子、細胞増殖因子、細胞誘導因子などの生理活性物質を足場に付与することが求められている。本研究では、これらの問題点の解決のため、PLA の物性の制御と生理活性物質を付与し、機能化した足場材の開発が求められている。

今日では、様々な組織、臓器の再生に対応するため、十分な細胞量の確保という点で、iPS細胞を応用した研究が進められている。しかし、PLA を応用したスキャホールドは頻りに研究され使用されているにもかかわらず、PLA や PLA 共重合体と iPS 細胞の挙動についての研究は少ない。また、iPS 細胞由来の細胞が骨形成を促進するという報告はほとんどない。今後の再生医療の応用範囲の拡大のため、マウス iPS 細胞を用いて PLA 系材料への接着、増殖や分化について検討する。

### 2. 研究の目的

(1) 物性の向上と生理活性物質を付与し機能化した PLA を応用したバイオアクティブフィルムを創製する。足場の物性の制御は、PLA は硬くて脆い性質があるため、 $\epsilon$  カプロラクトン (PCL) の比率を変えたポリ乳酸と  $\epsilon$  カプロラクトンの共重合体 (PLCL) を創製する。PLA に PCL を複合化することで柔軟性を向上し、様々な分解性をもった材料が設計できる。これにより性質の異なる細胞、組織に対応したバリエーションをもつ足場材を作製する。

(2) フィルム表面に接着タンパクを固定化し、機能化したフィルムを作製する。

(3) PLCL フィルム上のマウス骨芽細胞用細胞, あるいは, マウス iPS 細胞の挙動について調べる。

### 3. 研究の方法

(1) PLCL (PLCL: PLA/PCL=50:50) をクロロホルム 20mL に溶解し、溶液を調整した。この溶液を円形スライドガラス (直径 15mm) 上にキャストし、PLCL50 フィルムを得た。

(2) 足場の機能化は、アルカリ加水分解法により PLCL50 フィルム表面に NaOH に浸漬しカルボキシ基を導入した (PLCL50-COOH)。

さらに、カルボジイミド法により脱水縮合剤を用いてタンパク質中のアミノ基との間にペプチド結合を形成して、細胞接着タンパクである Co11 や FN を PLCL フィルム表面上に固定化した。

#### 4. 研究成果

(1) リン酸塩緩衝液(PBS)中でのフィルムの分解挙動では、浸漬初期においては、PLCL-COOH フィルムでは、内部の分解性に影響があることが示唆された。浸漬 35 日では、PLCL50-COOH と PLCL50 では、PLCL50-COOH の方が、PLCL50 より重量の低下が大きい傾向が見られた ( $p > 0.05$ )。PLCL50 表面にカルボキシル基を導入すると、PLCL50 フィルムの分解を加速する傾向を示すことが明らかになった。

(2) PLCL50 フィルムおよび PLCL50-COOH フィルムについて各表面に対する純水の接触角を測定した。PLCL50-COOH フィルムは、PLCL50 と比べて有意に接触角の低下が認められた ( $p < 0.05$ )。

(3) PLCL50 および PLCL50-COOH フィルムを疑似体液に浸漬すると、アパタイトの形成が認められた。浸漬 3, 7 日のフィルム表面の電子顕微鏡像(SEM)の観察では、PLCL50-COOH は PLCL50 よりも大きな粒状の沈着物が多くみられた。浸漬 14, 28 日のフィルム表面の PLCL50-COOH と PLCL50 フィルムで明確な差は認められなかった。浸漬 28 日の断面の SEM 観察では、PLCL50-COOH フィルムは PLCL50 フィルムよりも結晶沈殿物の層が厚くアパタイト層が形成している様子が見られた。アパタイトの形成速度は、PLCL50 フィルム表面の化学的特性に依存し、PLCL50 へのカルボキシル基の導入は、アパタイトの形成速度を促進することが明らかとなった。

(4) アルカリ加水分解法とカルボジイミド法を用いて、豚皮コラーゲン (PSCo11) あるいは、ティラピア魚鱗コラーゲン (TFCo11) をポリ乳酸 (PLA) に固定化し、PS, TF 固定化 PLA (PSCo11-PLA または TFCo11-PLA) フィルムを創製することができた。PSCo11-PLA, TFCo11-PLA フィルム上に付着したマウス骨芽細胞様細胞数 (MC3T3-E1) は、90 分後、3 日後、7 日後に PLA フィルムに付着した細胞数より有意に多かった ( $p < 0.05$ )。14 日後の PSCo11-PLA, TFCo11-PLA, PLA フィルム上のミネラル化の定量化を検討したところ、PSCo11-PLA, TFCo11-PLA フィルムは、PLA よりも石灰化が有意に促進した ( $p < 0.05$ )。付着した骨芽細胞様細胞の形態的な違いは、走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。特に、PSCo11-PLA および TFCo11-PLA フィルムに接着した細胞は、90 分後に PLA フィルムに接着した細胞よりも平坦に見えた。これらの結果から、PSCo11 および TFCo11 の PLA への固定化が細胞の接着、増殖、分化に有効であることが示唆された。魚由来の鱗コラーゲンのティラピア魚鱗コラーゲンは、人畜共通感染症の心配がないのでヒトに安全に使用できる。アルカリ加水分解法とカルボジイミド法を用いて機能化した足場材の作製ができた。

(5) 本研究では、PLCL50 フィルムの特性を調べた。細胞接着タンパク質であるフィブロネクチン (FN) または、細胞接着阻害タンパク質であるアルブミン (A1b) の 2 種類のタンパク質を PLCL フィルム上に固定化し、骨再建のためのバリア膜を作製した。アルカリ加水分解法と縮合反応を使用してフィルム表面を改質した。

各フィルム表面に対する純水との接触角は、FN-PLCL50, A1b-PLCL50 フィルムは、PLCL50 と比べて有意に減少した ( $p < 0.05$ )。PLCL50 フィルム上のフィブロネクチンとアルブミンの存在は、X 線光電子分光分析 (XPS) によって確認できた。FN-PLCL50 フィルム

に付着した細胞の数は、培養 90 分および 3 日後に Alb-PLCL50 および PLCL50 フィルムに付着した細胞の数よりも有意に増加した ( $p < 0.05$ )。一方、PLCL50 表面にアルブミンを固定化すると、90 分後と 3 日後に付着細胞が大幅に減少した ( $p < 0.05$ )。アリザリンレッド染色および石灰化アッセイの結果では、7、14、および 21 日後の FN-PLCL50 フィルム上の骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞の石灰化の定量化は、Alb-PLCL50 および PLCL50 フィルムの定量化よりも有意に高かった ( $p < 0.05$ )。FN-PLCL50、Alb-PLCL50、および PLCL50 上に付着した MC3T3-E1 細胞の形態学的差異を走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察を行った。90 分、3 日および 7 日の培養後、FN-PLCL50 フィルム上に付着した MC3T3-E1 細胞は、Alb-PLCL50 および PLCL50 フィルム上の細胞よりもさらに広がりが観られた。これらの結果から、フィブロネクチンとアルブミンを固定化した PLCL50 フィルム上で生物学的活性を示すことが明らかになった。これより、機能化した足場材の作製ができた。

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 Megumi Fuse, Tomomi Hashizume-Takizawa, Chieko Taguchi, Kou Fujita-Nakajima, Takao Kuwada-Kusunose	4. 巻 20
2. 論文標題 Effect of alkaline-hydrolyzed bioactive poly (Lactic Acid- -caprolactone) film on apatite precipitation in simulated body fluid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5466/ijoms.20.11	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 Megumi Fuse, Tomomi Hashizume-Takizawa, Arata Watanabe, Chieko Taguchi, Kou Fujita-Nakajima, Takao Kuwada-Kusunose, and Hiroyuki Okada	4. 巻 21
2. 論文標題 Study of Bioactive Film: Fabrication of Poly (lactic acid) Film Immobilized the Tilapia Fish Collagen or Porcine Collagen and Behavior of MC3T3-E1Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5466/ijoms.21.14	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 Megumi Fuse, Tomomi Hashizume-Takizawa, Chieko Taguchi, Kou Fujita-Nakajima, Takao Kuwada-Kusunose, and Hiroyuki Okada	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Adhesive or Non-Adhesive Protein-Immobilized Bioactive (Lactic Acid- -Caprolactone) Films on Mouse Osteoblast-Like Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-10
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 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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

〔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
研究分担者	中島 光 (藤田光)  (NAKAJIMA Kou)  (00147737)	日本大学・松戸歯学部・講師    (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	楠瀬 隆生 (桑田隆生)  (KUSUNOSE Takao)  (10398852)	日本大学・松戸歯学部・准教授    (32665)	
研究分担者	瀧澤 智美 (橋爪智美)  (TAKIZAWA Tomomi)  (50419785)	日本大学・松戸歯学部・講師    (32665)	
研究分担者	田口 千恵子  (TAGUCHI Chieko)  (80434091)	日本大学・松戸歯学部・助教    (32665)	

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