



Title	第13章 バイオインスパイアードゲルの再生医療への応用
Author(s)	松崎, 典弥; 吉田, 裕安材; 明石, 満
Citation	
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50602
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

第13章 バイオインスパイアードゲルの再生医療への応用

松崎典弥*¹, 吉田裕安材*², 明石 満*³

1 はじめに

鳥のように自由に空を飛びたいと思った人間は、鳥のような翼を体につけ飛ぶことを試みた。有名なレオナルドダヴィンチの羽ばたき飛行機のスケッチが残っている。この試みは成功しなかったが、やがて飛行機が登場して大空を制覇し、ロケットの発明により宇宙へも人間の行動範囲を広げてきた。鳥を模倣することから始めたわけであるが、空間を自由に行き来することを考え、科学の進歩と歩調を合わせて合理的に解決した結果である。

このように、生体分子や細胞、それらの集合体を含め生体系を発想の源とするマテリアルをバイオインスパイアードマテリアルと定義することができる(図1)¹⁾。つまり、生体系から様々な相互作用や機能、マイクロおよびマクロな構造を抽出して新しい材料あるいはシステムに応用す

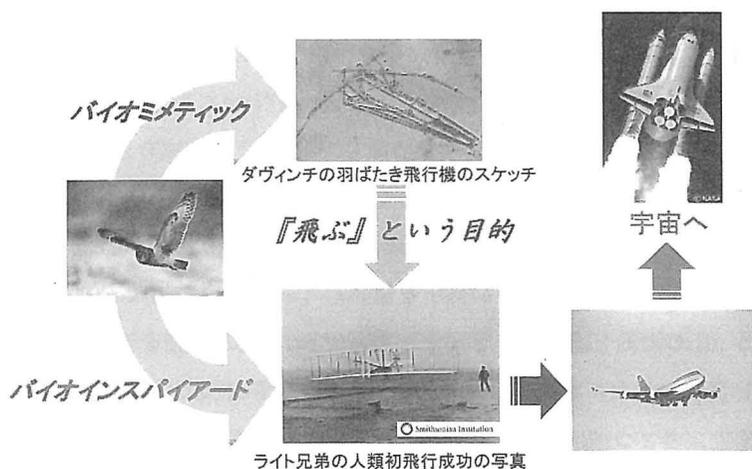


図1 バイオインスパイアードの概念図

* 1 Michiya Matsusaki 大阪大学 大学院工学研究科 助教

* 2 Hiroaki Yoshida 大阪大学 大学院工学研究科

* 3 Mitsuru Akashi 大阪大学 大学院工学研究科 教授

ることを意味する。このコンセプトにより自由な発想で先端科学と材料開発に挑戦することで、生体機能を模倣する（バイオミメティック）従来の材料開発から脱却し、これまでにない新しい材料創製の道が切り開かれると期待される。

本章では、バイオインスパイアードの発想で開発された新しい医療用ゲルに関する著者らの研究を紹介する。

2 ヘパリンインスパイアードゲル

一疾患を認識した細胞増殖因子の徐放制御一

我が国の三大死因の一つである心筋梗塞は、冠動脈の血流量が低下することで心筋が壊死する虚血性心疾患の一種である。薬剤による内科的治療が無効な虚血性疾患に対する従来の治療法として血管再建療法（バイパス手術）が行われてきたが、冠動脈本幹自体が非常に細くなっているため通常の血管再建療法では細胞レベルでの血流を確保することが困難である。そこで近年、再生医療による血管新生療法が注目されている。血管を構成する細胞の増殖を促進する塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）をアルギン酸ゲルビーズ²⁾やゼラチンゲル^{3,4)}に含浸して投与することで、徐放された FGF-2 が血管新生を誘導することが動物実験により実証されている。しかし、FGF-2 は生体寿命が短く pH や熱などの外部環境変化により変性しやすいため、マテリアルに安定に担持させることが困難である。また、FGF-2 の過剰投与は副作用を併発する危険性があるため、必要最小量の FGF-2 を変性させることなく徐放制御するシステムの開発が求められている。

著者らは、FGF-2 を安定に担持し、疾患を認識して FGF-2 の徐放を自ら制御する機能性バイオマテリアルが開発できれば、虚血性疾患に有効であると考えた。最近の研究で、虚血性疾患部位や炎症部位は pH が弱酸性（ $\text{pH} < 6.5$ ）であることが報告されている⁵⁻⁷⁾。そこで、FGF-2 を安定に担持し、虚血性疾患に伴う pH の低下を認識して収縮することで FGF-2 を選択的に徐放し、回復に伴う pH の上昇を認識して膨潤することで FGF-2 の徐放を停止する、機能性バイオマテリアルの開発を試みた。本マテリアルの開発には、① FGF-2 との相互作用、② 疾患部位認識性、③ 生分解性、の3つがポイントであると考え、研究に取り組んだ（図2）。

生体内において、FGF-2 はヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）と静電的相互作用を駆動力としたコンプレックスを形成することで安定化している⁸⁾。このコンプレックス形成には HSPG の硫酸基（強酸）とカルボキシル基（弱酸）の割合が重要であり、また HSPG のヘリックス構造が相互作用を誘起していることが報告されている^{8,9)}。そこで、生分解性と反応性官能基を有しているポリアミノ酸の電荷とナノ構造を制御することで、FGF-2 と相互作用する新規な

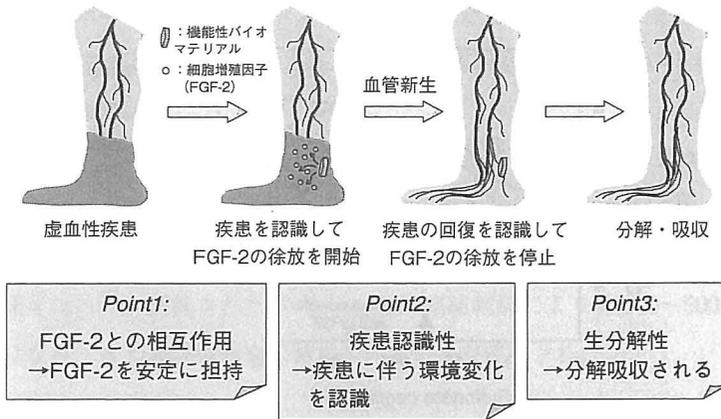


図2 虚血性疾患を認識して FGF-2 の徐放を制御する機能性マテリアルのイメージ

機能性ポリアミノ酸が開発できると考えた。

ポリアミノ酸としてカルボキシル基を有するポリ γ -グルタミン酸 (γ -PGA) を選択した。 γ -PGA は納豆菌が産生するポリペプチドで、生分解性や生体適合性に優れている¹⁰⁾。著者らはこれまで、 γ -PGA を用いた生分解性ナノ粒子や感熱応答性ハイドロゲルの調製などを報告してきた^{11~13)}。 γ -PGA のカルボキシル基に2-アミノエタンスルホン酸 (タウリン) を縮合することで、 γ -PGA にスルホン基 (強酸) を導入した¹⁴⁾。タウリンの導入は、赤外吸収スペクトル (IR) と核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR) より確認した。タウリンと縮合剤である水溶性カルボジイミド (WSC) の仕込み量を変えることで、タウリンの導入率を10~80%まで制御することが可能であり、スルホン化 γ -PGA (γ -PGA-S) のカルボキシル基とスルホン基の割合を制御することができた。

合成した γ -PGA-Sのスルホン基 (強酸) とカルボキシル基 (弱酸) の割合が電荷に与える影響を調べるため、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH=7.4) 中のゼータ電位を測定した。スルホン基の割合に従いゼータ電位は減少し、スルホン基が81%の γ -PGA-S (γ -PGA-S 81) は、FGF-2とコンプレックスを形成することが知られているヘパリン (-37.7 mV) とほぼ同じマイナス電位を示した (-36.2 mV)。そこで、72%のスルホン基を有する γ -PGA-S (γ -PGA-S 72) の1 mg/mL のPBS溶液に FGF-2 を添加した結果、FGF-2 の濃度の増加に従いゼータ電位は増加し (-11.6 mV)、ピークは単峰性であった。FGF-2 は中性環境でカチオン性を示すため (等電点は9.6)、 γ -PGA-S 72 と FGF-2 がイオンコンプレックスを形成することが示唆された。 γ -PGA-S と FGF-2 のコンプレックス形成を詳細に検討するため、HSPG の生合成を抑制したマウス L 929 線維芽細胞を用いて細胞増殖試験を行った (図3 (a))。HSPG の生合成を抑制された細胞は FGF-2 が HSPG とコンプレックスを形成できず、レセプターとの結合力が低下し、

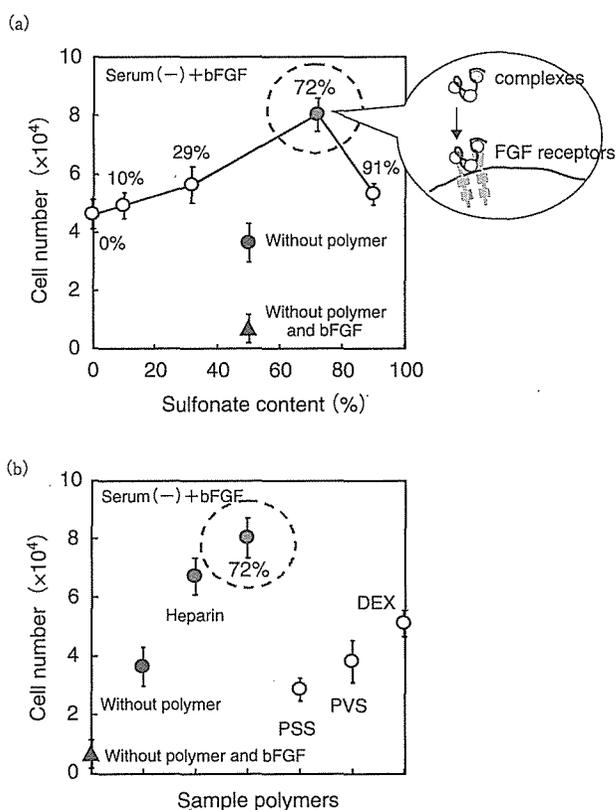


図3 マウスL929線維芽細胞の増殖試験による γ -PGA-SとFGF-2のコンプレックス形成評価 (a) と他のヘパリノイドとの比較 (b)

増殖できない¹⁵⁾。そこで、培地に添加した γ -PGA-SがFGF-2と安定にコンプレックスを形成できれば、レセプターと結合することで増殖シグナルが伝達され、細胞が増殖すると予想される。様々なスルホン化度の γ -PGA-Sについて検討した結果、スルホン化度72%の γ -PGA-S 72が最も高い細胞数を示した。他のヘパリン様硫酸化ポリマー（ヘパリノイド）と比較した結果、驚くべきことに、 γ -PGA-S 72が最も高い細胞数を示し、ヘパリンと同程度であることが明らかとなった（図3 (b)）。また、 γ -PGA-S 72は、酸や熱に対するFGF-2の保護活性を有していることも見出した¹⁶⁾。

γ -PGA-S 72とFGF-2のコンプレックス形成を解明するため、7分子の γ -PGA-S 72とFGF-2の結合部位との相互作用をMM2およびMOPAC法による分子モデリングで詳細に検討した。最安定構造を計算した結果、生体内のHSPGと同様にFGF-2のアスパラギン102ヤリシン27、アルギニン121と γ -PGA-S 72のカルボキシル基やスルホン基が静電的相互作用や水素結合を形成することが明らかとなった¹⁶⁾。細胞増殖試験とモデリングの結果より、 γ -PGA-SとFGF-2

の相互作用にはカルボキシル基とスルホン基のバランスが重要であることが示唆された。また、FGF-2との安定な相互作用にはヘパリンのような糖骨格が必要であるという従来の報告を覆すものであり、大変興味深い。

これまでの報告で、ポリメタクリル酸などカルボキシル基を有するハイドロゲルは、酸性環境下でカルボキシアニオンのプロトン化に伴う収縮を示すことが知られている¹⁷⁾。そこで、 γ -PGAで架橋ネットワークを形成し、 γ -PGA-S 72を内包した semi-IPN 様ヘテロゲル (S 72-netgel) を調製した (図4 (a))¹⁸⁾。調製された S 72-netgel は凍結乾燥により約 100~500 μ m の孔を有したスポンジ状になり、また細胞接着性に優れていることが確認された。

実際の治療で副作用を軽減するためには、回復時 (中性環境) においてマテリアルが FGF-2 を安定に保持することが重要である。そこで、S 72-netgel が中性条件で FGF-2 を保持できるか検討するため、トリス緩衝液 (pH=7.4) 中での S 72-netgel からの FGF-2 の徐放量を評価した。比較である γ -PGA ハイドロゲル (直径 1 cm, 厚さ 1 mm) の場合、FGF-2 の吸着量はおよそ 120 ng であり、6 日間のインキュベーション後にはほぼ全ての FGF-2 が徐放された。一方、 γ -PGA と等量の γ -PGA-S 72 を含む S 72-netgel (S 72-netgel-36, ゲル全体のカルボキシル基に対して 36 % のスルホン基を有する) は、およそ 280 ng の FGF-2 を吸着し、15 日間のインキュベーション後も約 60 % の FGF-2 を保持していることが確認された¹⁹⁾。これは、 γ -PGA の架橋ネットワーク中において γ -PGA-S 72 はその運動性を保持しており、FGF-2 と安定に相互作用できるためと考えられる。以上より、S 72-netgel-36 は回復環境である中性条件下で FGF-2 を保持し、非特異的な徐放による副作用の発現を軽減することが期待される。

また、虚血性疾患環境 (酸性環境) でのハイドロゲルの応答性について検討した。 γ -PGA ハイドロゲルおよび S 72-netgel 共に pH=4.0 以下で収縮することが明らかとなった (図4 (b))。これは、カルボキシアニオンのプロトン化に伴う分子鎖間の水素結合形成に起因すると考えられる。また、各 pH における収縮率は γ -PGA-S 72 の割合に依存して増加する傾向を示し、 γ -PGA-S 72 の含有割合が最も高い S 72-netgel-36 は γ -PGA の pKa (2.27) 以上の pH=6.0 (虚血性疾患部位と同じ酸性度) においても約 10 % 程度収縮することが確認された¹⁹⁾。これは、 γ -PGA-S 72 のスルホン基近傍でのプロトン濃縮効果により、架橋ネットワークを形成している γ -PGA のカルボキシルアニオンがプロトン化されたことが原因と考察される。また、酸性環境にตอบสนองして収縮したゲルを中性のトリス緩衝液に浸漬すると、再び膨潤することが確認された。しかしながら、平衡膨潤後の直径は元の直径の約 7 割程度であった。これは、酸性環境で形成された水素結合による分子間相互作用が、中性環境で完全に解離しないためであると考えられる。以上の結果より、S 72-netgel は回復環境 (中性条件) で FGF-2 を安定に保持し、虚血性疾患環境 (酸性条件) を認識して収縮する機能性ハイドロゲルであることが明らかとなった。

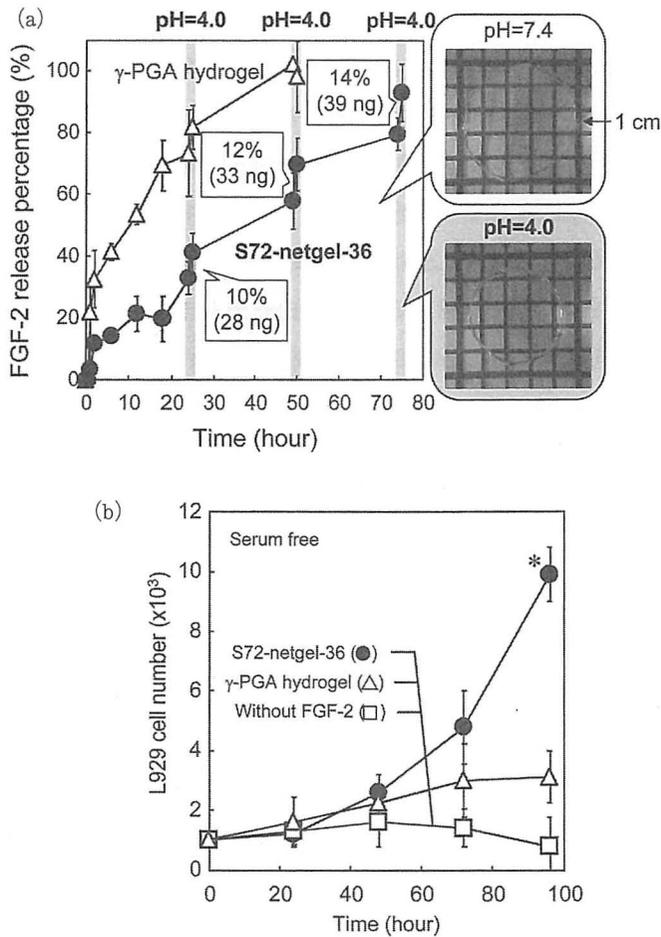


図5 γ-PGAゲル(△)およびS72-netgel-36(●)のpH=4.0に反応したFGF-2の徐放制御 (a) pH=4.0でγ-PGAゲル(△)およびS72-netgel-36(●)から徐放されたFGF-2を10ng添加した時の無血清培地中でのマウスL929線維芽細胞増殖試験 (b)

イドロゲルは、中性条件下で約70%のFGF-2を徐放し、酸性pHに反応したFGF-2の選択的な徐放を示さなかった。一方、S72-netgel-36は中性条件下でFGF-2をほとんど徐放せず(20%以下)、pH=4.0の酸性条件下での物理収縮に反応して10~15%のFGF-2を徐放することが明らかとなった。さらに、中性から酸性への条件変化を3回繰り返した場合においても、酸性環境を認識してFGF-2を選択的に徐放する興味深い挙動が観察された。また、虚血性疾患環境であるpH=6.0の条件において、およそ6~10%のFGF-2が選択的に徐放されることが明らかとなった。γ-PGAハイドロゲルではFGF-2の選択徐放が観察されなかったことから、酸性環境に反応したFGF-2の徐放制御には、FGF-2との相互作用と酸性環境への応答性の二つの機能が重要であると示唆される。

酸性環境下で選択的に徐放された FGF-2 が変性せず、機能を保持していることを確認するため、細胞増殖試験を行った (図 5 (b))。pH=4.0 の条件で S 72-netgel-36 から徐放された FGF-2 を回収し、マウス L 929 線維芽細胞の培養シャーレに添加して無血清培地を用いて 96 時間培養を行った。 γ -PGA ハイドロゲルから徐放された FGF-2 を培地に添加した場合、細胞の増殖は観察されなかった。一方、S 72-netgel-36 から徐放された FGF-2 を添加すると細胞の良好な増殖が観察され、FGF-2 が変性せず、その機能を保持していることが示唆された。

以上より、酸性環境を認識して収縮する S 72-netgel-36 は、その収縮により内包 FGF-2 を選択的に徐放することが可能であり、徐放された FGF-2 は血管新生を誘導する機能を保持していることが確認された。

本研究の戦略では、虚血性疾患の回復後にはマテリアルが FGF-2 の徐放を停止し、分解吸収されることが副作用の軽減につながると考えている。そこで、 γ -PGA-S の分解性について検討した。 γ -PGA および γ -PGA-S 10 を 0.2 M のリン酸緩衝液 (pH=7.4) に溶解させ、80 °C で加熱することで加水分解の加速試験を行い、所定時間後の分子量をゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) を用いて評価した¹⁴⁾。 γ -PGA の場合、48 時間後には 80 % 以上がオリゴマーレベルまで分解されることが確認された。一方、 γ -PGA-S 10 (分子量 15 万) は γ -PGA と比較して分解速度が速く、24 時間後には 80 % がオリゴマーレベルに分解された。これは、スルホン基の導入に伴う親水性の向上によると考えられる。また、調製したハイドロゲルの分解性についても検討した。S 72-netgel-36 を 10 % のウシ胎仔血清を含む培地中で所定時間インキュベートすることで培地中での分解性を検討した。細胞非存在下では 20 日間の培養後においても分解は観察されず安定に存在していたが、細胞を三次元培養すると分解が顕著に観察され、およそ 15 日後にはゲルが完全に分解されることが明らかとなった。これは、細胞が産出する酵素などの作用によりゲルが分解されたと考えられる。

以上より、S 72-netgel-36 を構成する γ -PGA および γ -PGA-S は加水分解されることが確認され、S 72-netgel-36 は細胞存在下で特異的に分解されることが明らかとなった。S 72-netgel-36 は、疾患を認識して FGF-2 を徐放するバイオインスパイアードゲルとして有効であることが示唆された。

3 細胞外マトリックスインスパイアードゲル

— 生体外での三次元組織の構築 —

再生医療において胚性および組織幹細胞による細胞移植が活発に研究されている一方で、移植位置の制御や移植細胞の流出、壊死、広範囲の移植が困難といった問題が指摘されている。移植

細胞を予め *in vitro* (生体外) で三次元的に組織化することが可能であれば、上記問題を解決する新しい移植療法として期待される。これまで、細胞シート法²⁰⁾や磁性リポソーム法²¹⁾など、スキャホールドを用いずに単層の細胞シートを回収する手法が提案されているが、移植材料として治療効果がある大きなサイズの組織(ミリメートル以上)を得ることは困難である。高分子材料を基盤とする足場材料(スキャホールド)は、細胞接着のための足場としてだけでなく、分化や組織化、栄養分供給のための空間確保としても有効である。しかし、マテリアルの免疫原性や加水分解時の炎症惹起性など、安全性への課題も多い。

生体内の細胞は、細胞外マトリックス(ECM)と呼ばれる細胞から分泌された多糖(グリコサミノグリカンなど)やコラーゲンなどのタンパク質が構築する複雑な網目構造と結合することで組織化され、機能を発現している。ECMは組織の構造を作る要素として働くだけでなく、細胞の生理活性にも重要な役割を果たしている。ECMの重要な性質としてアルギニン・グリシン・アスパラギン酸(RGD)配列による細胞接着性があるが、もう1つの重要な性質に酵素分解性があげられる。細胞が産出する酵素(マトリックスメタロプロテアーゼなど)によりECMが分解されることで細胞の移動が可能となり、また連続的なECMのリモデリングが行われる²²⁾。著者らは、特異的な酵素に応答して必要な時のみ速やかに分解されるECMの性質に着目し、ECMインスパイアードスキャホールドを考案した。このスキャホールドを用いて *in vitro* で細胞を三次元培養し、細胞にECMを十分に産生させた後、スキャホールドのみを特異刺激で分解除去することが可能であれば、細胞と細胞から産出されたECM成分のみで構成される三次元組織が得られると考えた(図6)。つまり、スキャホールドを細胞が産出するECM成分に置き換えることができれば、合成化合物を含まず、かつ治療効果が期待される大きなサイズの移植組織が得られると期待される。また、得られる組織の形状はスキャホールドの形状に転写されるため、スキャホールドに依存して大きさ・厚さ・形状を容易に制御される。著者らは、本手法(ハイドロゲルテンプレート法)により生体成分のみで構成される三次元組織の構築が可能であることを見出した²³⁾。

刺激応答性分解ゲルとして架橋点にジスルフィド結合を有するハイドロゲルを調製した。ジスルフィド結合(-S-S-)はジチオスレイトール(DTT)やグルタチオン(GSH)、システイン(Cys)などの還元剤によりチオール基(-SH)へ分解することが知られている^{24,25)}。ポリ γ -グルタミン酸(γ -PGA)を両末端にアミノ基を有し、かつジスルフィド結合を有するシスタミンで架橋することでジスルフィド架橋 γ -PGAハイドロゲル(γ -PGA-SSゲル)を調製した(図7(a))。凍結乾燥した γ -PGA-SSゲルは直径50~100 μ m程度の孔を有することが走査型電子顕微鏡(SEM)観察より明らかとなった(図7(b))。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に γ -PGA-SSゲルを浸漬し、DTTやCysを所定濃度添加することでゲルの分解性を評価した(図7(c))、

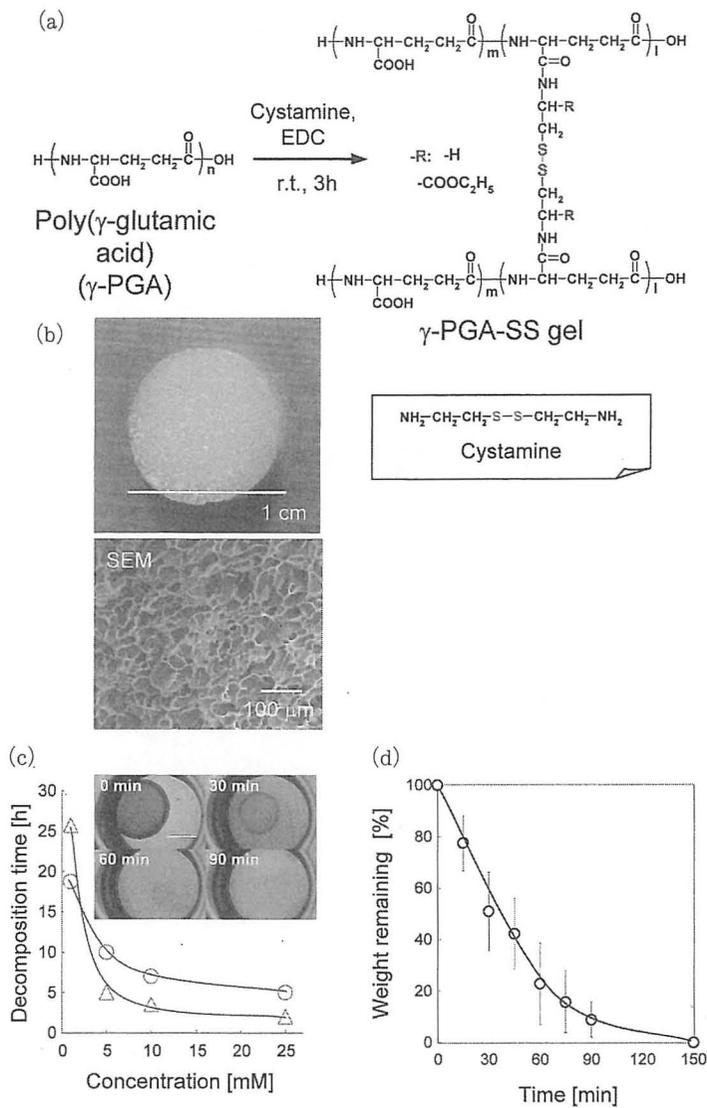


図 7 γ -PGA-SS ゲルの合成スキーム (a) と凍結乾燥ゲルの写真および SEM 観察結果 (b) DTT (Δ) と Cys (\circ) の濃度に依存した γ -PGA-SS ゲルの分解挙動変化と DTT による分解写真 (c) DTT による分解に伴うゲルの重量変化 (d)

た、組織中の ECM 成分を評価するためコラーゲン染色を行った結果、培養した L929 マウス線維芽細胞がコラーゲンを産出していることが明らかとなった。得られた組織中への γ -PGA-SS ゲルの分解成分である γ -PGA-SH ポリマーの残存を評価する目的で、蛍光ラベル化 γ -PGA-SS ゲルを用い、三次元組織を作成した (図 9)。三次元培養後に Cys を用いて蛍光ラベル化テンプレートゲルを分解した直後は組織内に蛍光物質が確認されたが (図 9 (d)), PBS を用いて 5 回

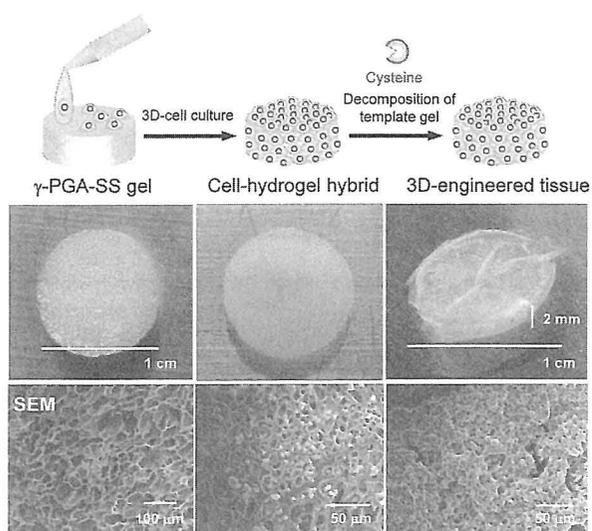


図8 γ -PGA-SSゲルで三次元培養後、ゲルの分解により得られた三次元組織の写真およびSEM観察結果

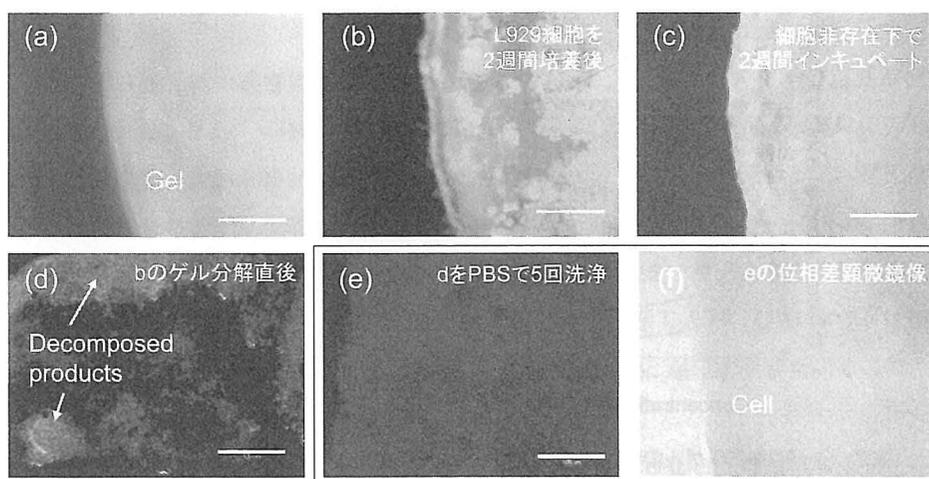


図9 蛍光ラベル化 γ -PGA-SSゲル (a) と L929 細胞存在 (b) および非存在下 (c) で 2 週間培養後の写真。Cys による (b) ゲルの分解直後 (d) と PBS で 5 回洗浄後の蛍光顕微鏡写真 (e)。 (e) の位相差顕微鏡写真 (f)。

洗浄することで蛍光物質が除去され、分解成分である γ -PGA-SH ポリマーの溶解除去が確認された (図 9 (e))。以上より、得られた組織はコラーゲンを主成分とする ECM と細胞のみから構成され、ゲル成分は除去されていることが明らかとなった²³⁾。

ECM の機能にインスパイアードされ考案されたハイドロゲルテンプレート法により、生体外

において細胞由来成分のみで構成された三次元組織を構築できることが見出された。本手法は、ミリメートルサイズ以上の移植用組織を構築するための新しい再生医療技術として期待される。

4 おわりに

バイオインスパイアードゲルの再生医療への応用に関する研究を紹介した。これまでの化学の歴史を振り返ると、タンパク質インスパイアードマテリアルとしてナイロンが生まれ、高強度繊維アラミドから高強度炭素繊維へと発展したように、バイオインスパイアード的発想で新しいマテリアルが生まれてきたことは歴史が証明している。生体の巧みなシステムに着目し、そのシステムを模倣するのではなくヒントとすることによって、これまでにはない新しい材料が生み出されると期待される。

文 献

- 1) 明石満, 未来材料, 3, 15 (2003)
- 2) R. J. Laham *et al.*, *Circulation*, 100, 1865 (1999)
- 3) Y. Tabata *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31, 287 (1998)
- 4) H. Nakajima *et al.*, *J. Artif. Organs*, 7, 58 (2004)
- 5) K. Na *et al.*, *J. Control. Release*, 97, 513 (2004)
- 6) I. F. Tannock *et al.*, *Cancer Res.*, 49, 4373 (1989)
- 7) M. Stubbs *et al.*, *Mol. Med. Today*, 6, 15 (2000)
- 8) S. Faham *et al.*, *Science*, 271, 1116 (1996)
- 9) M. Kunou *et al.*, *Biomacromolecules*, 1, 451 (2000)
- 10) H. Kubota *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1212 (1993)
- 11) M. Matsusaki *et al.*, *Chem. Lett.*, 33, 398 (2004)
- 12) T. Shimokuri *et al.*, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 42, 4492 (2004)
- 13) T. Akagi *et al.*, *J. Control. Release*, 108, 226 (2005)
- 14) M. Matsusaki *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 13, 23 (2002)
- 15) K. M. Keller *et al.*, *Biochemistry*, 28, 8100 (1989)
- 16) M. Matsusaki *et al.*, *Biomacromolecules*, 6, 400 (2005)
- 17) J. Zhang *et al.*, *Macromolecules*, 33, 102 (2000)
- 18) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 73 A, 485 (2005)
- 19) M. Matsusaki *et al.*, *Biomacromolecules*, 6, 3351 (2005)
- 20) J. Yang *et al.*, *Biomaterials*, 26, 6415 (2005)

- 21) A. Ito *et al.*, *Tissue Eng.*, **10**, 833 (2004)
- 22) J. A. Hubbell, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 551 (2003)
- 23) M. Matsusaki *et al.*, *Biomaterials*, **28**, 2729 (2007)
- 24) Y. Kakizawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11247 (1999)
- 25) N. Hisano *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 115 (1998)