



Title	Studies on Indirect Supply of Hydrogen Peroxide to Horseradish Peroxidase-Catalyzed Cross-Linking for Biofabrication
Author(s)	Gantumur, Enkhtuul
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76585
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (ENKHTUUL GANTUMUR)	
Title	<p>Studies on Indirect Supply of Hydrogen Peroxide to Horseradish Peroxidase-Catalyzed Cross-Linking for Biofabrication</p> <p>(西洋わさび由来ペルオキシダーゼ酵素反応にもとづくバイオフィabricationプロセスへの間接的過酸化水素供給法に関する研究)</p>
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Horseradish peroxidase (HRP)-catalyzed cross-linking has attracted much attention for a wide range of applications due to its mild reaction conditions for mammalian cells. HRP catalyzes the cross-linking of phenol and aniline derivatives by consuming hydrogen peroxide (H_2O_2). A major consideration in this reaction is a supplying method of H_2O_2 in terms of its effect on living cells, the enzyme activity and the hydrogel properties. Considering these effects, H_2O_2 can be supplied indirectly during the cross-linking. Moreover, discovering the potential sources and specific supplying pathways of H_2O_2 plays an important role for individual applications. The objective of this thesis is to provide a wide selection of applicable supplying sources and supplying pathway of H_2O_2 to induce HRP-catalyzed cross-linking for biofabrication applications.</p> <p>Chapter I describes co-enzymatic systems that use three kinds of oxidases: L-amino acid oxidase, choline oxidase, and galactose oxidase, in combination with the corresponding substrates for supplying H_2O_2 to enzymatic cross-linking. Stable hydrogels can be prepared independently with the type of oxidase. The gelation time and mechanical properties of the resultant hydrogels can be well controlled by varying the concentrations of HRP, oxidases and their substrates. The cytocompatibility of each hydrogel was evaluated by culturing the cells on it. The results indicated that the versatility of co-enzymatic system enables to prepare hydrogels with the desired properties by carefully selecting the type of oxidase.</p> <p>Chapter II presents reducing sugar (glucose, galactose, and mannose)-mediated enzymatic cross-linking system. In this system, HRP consumes H_2O_2 that generated from the oxidation of thiol groups in HRP in the presence of reducing sugars. The mechanical properties and microstructures of the resultant hydrogels can be well controlled by varying the concentration and the reducing power of sugars. Reducing sugar-independent cytocompatibility of the hydrogels was confirmed by the growth of cells on them. The wide selection of sugar types enables to prepare hydrogels and characterize their properties.</p> <p>Chapter III describes the use of H_2O_2 diffused from gel-phase to induce HRP-catalyzed cross-linking for cell patterning technology. A simple fabrication method for cell micropatterns on hydrogel substrates containing H_2O_2 was developed using an inkjet printing system. The hydrogel micropatterns were created from inks resulting in cell-adhesive and non-cell-adhesive printed regions by HRP reaction consuming H_2O_2 in the hydrogel to obtain the cell micropatterns. The present system permits the tailor-made cell patterning, the patterning of multiple cell types and the fabrication of microtissues with the shape defined by the micropatterns.</p> <p>Chapter IV describes the use of H_2O_2 diffused in sol-gel phase to induce HRP-catalyzed hydrogelation for fabrication of 3D constructs. Extrusion-based bioprinting in which stabilization of extruded bioink was achieved through HRP-catalyzed cross-linking consuming H_2O_2 generated from HRP and glucose was performed. The bioinks containing living cells, HRP, glucose, Polymer-Ph and cellulose nanofibers were extruded to fabricate cell-enclosing 3D constructs. The printed constructs showed good stability in cell culture medium for over a week. It is also possible to modify the surface of the printed construct with the desired materials by the further cross-linking. These results demonstrate the possibility of utilizing the present method for 3D bioprinting.</p> <p>This thesis described the potential supplying methods of H_2O_2 for HRP-catalyzed cross-linking. The findings obtained in the study are expected to contribute to expanding the applications of this cross-linking in biofabrication fields.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (ENKHTUUL GANTUMUR)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	境慎司
	副 査	教 授	岡野泰則
	副 査	教 授	西山憲和
	副 査	特任教授	田谷正仁(グローバルイニシアティブ・センター)

論文審査の結果の要旨

ENKHTUUL GANTUMUR氏は、本論文において、西洋わさび由来ペルオキシダーゼとフェノール性水酸基を含む水溶液から、この酵素の機能により過酸化水素の存在下にて組織工学や再生医療用途のヒドロゲルを得るプロセスに関して、既存の方法では一般的であった系中に過酸化水素水を添加する方法の欠点を改善するための方法論について体系的に検討した。また、その方法論の有用性を実証するために、その方法論に基づいて得られるヒドロゲルを使ったシート状、球状、繊維状などの細胞組織の構築や、3Dバイオプリンティングによる構造体の構築も試みている。以下、各章の要点を辿りつつ、本論文の審査結果を記す。

第1章では、アミノ酸オキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼなどの、オキシダーゼを使い、西洋わさび由来ペルオキシダーゼと高分子を含む水溶液中で、徐々に過酸化水素を生成させる方法を提案した。そして、得られるヒドロゲルの特性やそのヒドロゲルと接した細胞の挙動などから、この方法の有用性を示した。また、このヒドロゲルを使って、シート状の細胞構造物を作製できることを示した。第2章では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼに含まれるチオール基を、還元糖により酸化し、それにより生成する過酸化水素をその西洋わさび由来ペルオキシダーゼの酵素反応に使用するという方法を提案した。そして、メカニズムについて明らかにするとともに、細胞を生きたまま含んだヒドロゲルを作製できることを実証した。第3章では、過酸化水素を含ませたヒドロゲルを過酸化水素供給源とする方法を提案した。また、この方法とインクジェットプリンティング技術を融合させることで、微小なヒドロゲルパターンを自由に作製する方法を開発した。そして、この微小なヒドロゲルパターンを使うことで、さまざまな形状の微小组織体を作ることができることを実証した。第4章では、第2章で詳細な検討を行った間接的な過酸化水素供給法を、3Dバイオプリンティングに適用することを提案し、その有効性を実証した。

本論文の特筆すべきポイントは、酵素反応の速度的解析やそのメカニズムに関する解析を通じて、それぞれの方法に適したバイオフィabricationのターゲットを提案し、プロセスとしての最適化も含めた有用性の実証を行った点にある。特に、実際に生きた細胞を含む各種形状の構造体を作製できている結果は、それぞれの章で提案された方法の妥当性を示しており、今後、バイオフィabricationにおける重要な戦略の1つとなる可能性を有する研究成果である。以上の理由により、本論文を博士（工学）の学位を授与するにふさわしいものと認める。