



Title	Studies on the Cellular Behaviour on Gelatin-Based Hydrogels Obtained through Hydrogen Peroxide-Mediated Cross-Linking and Degradation
Author(s)	Mubarok, Wildan
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/89643
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Wildan Mubarak)	
Title	Studies on the Cellular Behaviour on Gelatin-Based Hydrogels Obtained through Hydrogen Peroxide-Mediated Cross-Linking and Degradation (過酸化水素が関与する架橋・分解過程を経て得られるゼラチン系ハイドロゲル上の細胞挙動に関する研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Hydrogel fabrication through horseradish peroxidase (HRP)-catalysed cross-linking has garnered great interest due to its safety for cells. In HRP cross-linking, hydrogen peroxide (H_2O_2) is used as an electron donor to induce the cross-linking of polymer possessing phenol groups (Polymer-Ph). However, H_2O_2 can also degrade the Polymer-Ph through oxidation. This contradictory effect of H_2O_2 can affect the properties of the hydrogel. Subsequently, the changes in the properties of the hydrogel play a key role in regulating cell behaviours. The objective of this thesis is to investigate the contradictory effect of H_2O_2 on the hydrogel properties and its role in controlling cell behaviour.</p> <p>Chapter I describes the general explanation regarding the interaction between cells and their extracellular matrix (ECM). The role of the physicochemical properties of the ECM, <i>e.g.</i>, stiffness, viscoelasticity, molecular weight and cell adhesive ligands, in regulating cell behaviour was discussed. Attempts to study the cell-ECM interaction <i>in vitro</i> using hydrogels were discussed. The application and cross-linking of gelatin-based hydrogels and studies on H_2O_2 role in HRP-catalysed cross-linking were presented.</p> <p>Chapter II describes the contradictory effect of H_2O_2 on Gelatin-Ph hydrogel. The mechanical property of the Gelatin-Ph hydrogel could be controlled by adjusting the HRP concentration and the exposure time to air containing H_2O_2. Increasing the exposure time to air containing H_2O_2 resulted in a non-linear trend of the Gelatin-Ph hydrogels Young's modulus, with initial stiffening followed by a gradual decrease in hydrogel stiffness. This phenomenon is mediated by the contradictory effect of H_2O_2 which degrades the polymer in extended exposure time. The changes in the properties of the Gelatin-Ph hydrogels could alter the adhesion of human adipose-derived stem cells and rat fibroblasts. Overall, this system allows hydrogel fabrication with tunable properties for controlling cell behaviour.</p> <p>Chapter III describes the application of air containing H_2O_2 exposure-mediated control of the physicochemical properties of Gelatin-Ph on modulating myogenesis. To address this, the behaviour of mouse myoblasts (C2C12) cells on Gelatin-Ph hydrogels fabricated through different exposure times to air containing H_2O_2 was studied. The cytocompatibility of the hydrogelation system was demonstrated. The myoblasts showed stiffness-dependent adhesion and differentiation, with higher cell elongation and myotube formation observed on stiffer hydrogels. The findings of this study can be applied in skeletal muscle tissue engineering to control the cell fate to form new muscle cells.</p> <p>Chapter IV describes the possibility of controlling the cell-cycle progression of the cells cultured on Gelatin-Ph/hyaluronic acid (HA)-Ph composite hydrogels obtained through H_2O_2-mediated cross-linking and degradation of the polymers. Human cervical cancer cells (HeLa) and mouse mammary gland epithelial cells (NMuMG) expressing cell-cycle reporter Fucci2 showed the exposure time-dependent cell-cycle progression on the hydrogels. Cells cultured on softer hydrogel showed arrested cell-cycle progression. Additionally, the cell-cycle progression of NMuMG/Fucci2 cells was not only governed by the hydrogel stiffness but also by the low-molecular-weight HA-Ph resulting from H_2O_2-mediated degradation. These findings could be useful in cancer studies and tissue engineering purposes.</p> <p>This thesis describes the potential of H_2O_2-mediated control of hydrogel properties to modulate cell behaviour. The findings of this study are expected to contribute to the application of HRP-catalysed cross-linking in cell studies and the development of functional tissues in the biomedical engineering field.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （ Wildan Mubarak ）			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	境 慎司
	副 査	教授	西山 憲和
	副 査	教授	出口 真次
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>Wildan Mubarak氏は、本論文において、過酸化水素存在下で進行する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高分子水溶液のヒドロゲル形成に関して、これまでほとんど着目されてこなかった酵素反応を進行させるために必要な過酸化水素による高分子の分解によるヒドロゲル物性への影響を明らかにした。そして、この高分子の分解と酵素による架橋形成が、得られるヒドロゲル上で培養される細胞の挙動に与える影響を明らかにした。以下、各章の要点を辿りつつ、本論文の審査結果を記す。</p> <p>第1章では、細胞挙動と培養基材の特性の相関に関する既存の研究をまとめ、本研究の着眼点を明確にした。第2章では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼとこの酵素により架橋されるように修飾を行ったゼラチンの混合水溶液を過酸化水素含有空気に曝露した際の、曝露時間とゲル物性、ゼラチン誘導体の分子量変化について明らかにした。また、接着細胞のモデル細胞として広く使用される繊維芽細胞について、このヒドロゲル上での挙動を調べ、それらの相関を明らかにした。第3章では、機能的な細胞として筋肉を構成する筋細胞のもとになる筋芽細胞に関して、細胞生存率や細胞形状、増殖性に与える影響を調べるとともに、筋細胞への分化に与える影響を調べ、その効果を明らかにした。第4章では、前の2つの章とは異なり、ゼラチン単独のゲルでなく、その他の高分子材料でも同様のことが生じるのかを調べるために、多糖のヒアルロン酸を含有させたゲルについても検討を行った。そして、細胞の機能としては、細胞周期について着目し、ガン細胞および非ガン細胞を用いて、その効果を調べて明らかにした。</p> <p>本論文の特筆すべきポイントは、さまざまな細胞について、増殖、分化、細胞形態など多様な観点からの評価を行い、過酸化水素存在下で生じる西洋わさび由来ペルオキシダーゼによる架橋形成と高分子の分解という、ヒドロゲルの力学的特性という点からは、相反する効果を示す同時に生じる現象を、過酸化水素含有空気への曝露時間を制御するという簡単な方法で制御できることを明らかにし、これにより、細胞の挙動を制御可能であることを実証した点にある。細胞の挙動制御は、再生医療・組織工学分野のみならず、創薬などさまざまな分野で重要な事項であり、今後、そのための細胞培養基材の設計戦略の1つとなる可能性を有する成果である。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。</p>			