

自動逐次架橋による 生分解IPNゲル を用いた細胞移植

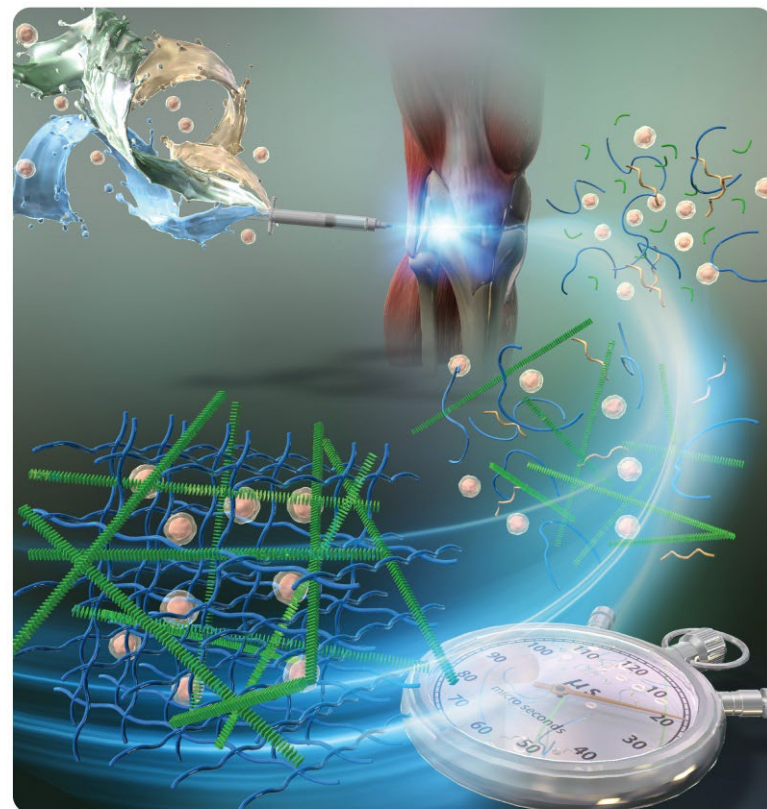
東京理科大学
理学部第一部

応用化学科

教授 大塚 英典

2022年11月8日(火)

cm CHEMISTRY OF
MATERIALS
MARCH 24, 2020 | VOLUME 32 | NUMBER 6 | pubs.acs.org/cm

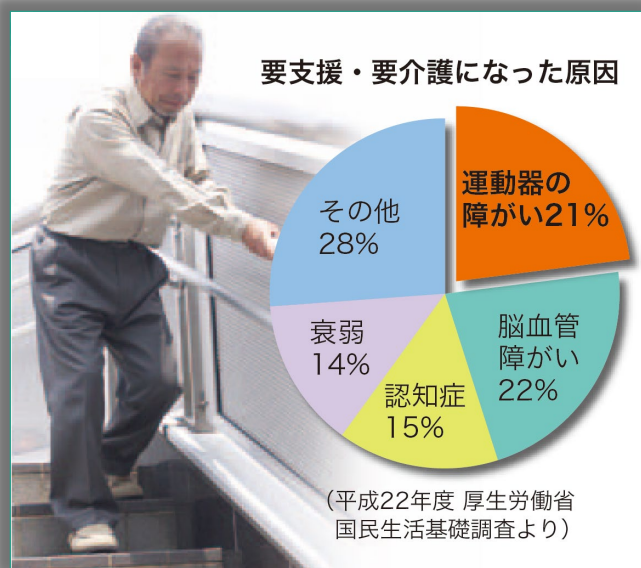


軟骨損傷

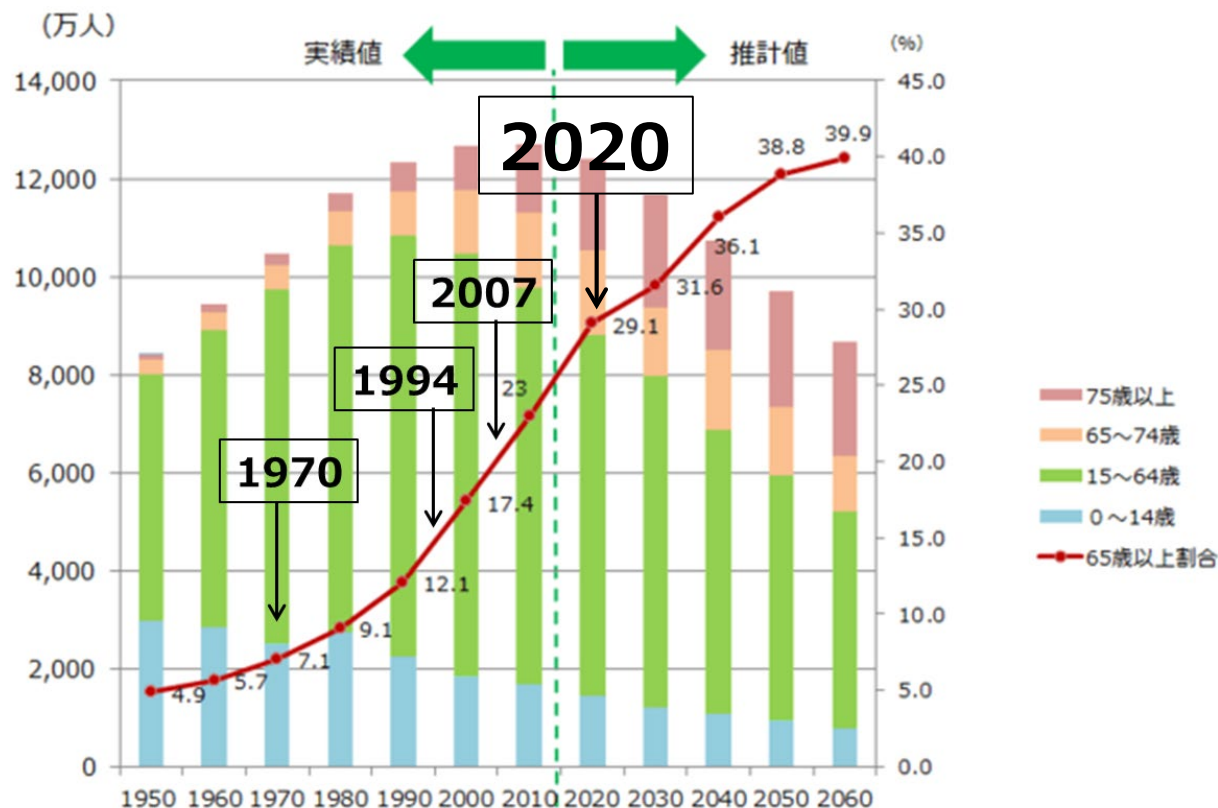
ロコモティブシンドローム：

足腰が弱くなり、転倒・骨折などで介護が必要になる危険性が高くなった状態のこと。

超高齢社会になり、寝たきりや介護を必要とする人が急速に増加。そのうち4～5人に1人は、骨・関節・筋肉といった体を動かす「運動器」の障がいが原因



65歳以上の人口が、全人口に対して21%を超えると「超高齢社会」



資料：2010年までは総務省「国勢調査」、2015年は総務省「人口推計（平成27年国勢調査人口速報集計による人口を基準とした平成27年10月1日現在確定値）」、2020年以降は国立社会保障・人口問題研究所「日本の将来推計人口（平成24年1月推計）」の出生中位・死亡中位仮定による推計結果

(注) 1950年～2010年の総数は年齢不詳を含む。高齢化率の算出には分母から年齢不詳を除いている。

ゲルのネットワークデザイン

❖ 繊維状ネットワーク

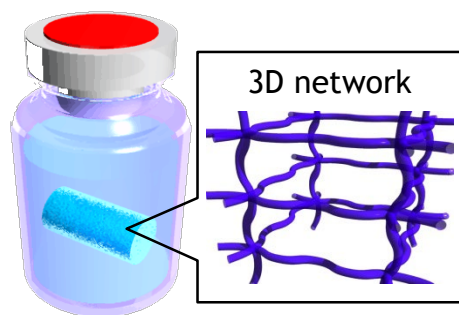
擬似細胞外マトリックス

優れた細胞生息環境の提供(=生体適合性)

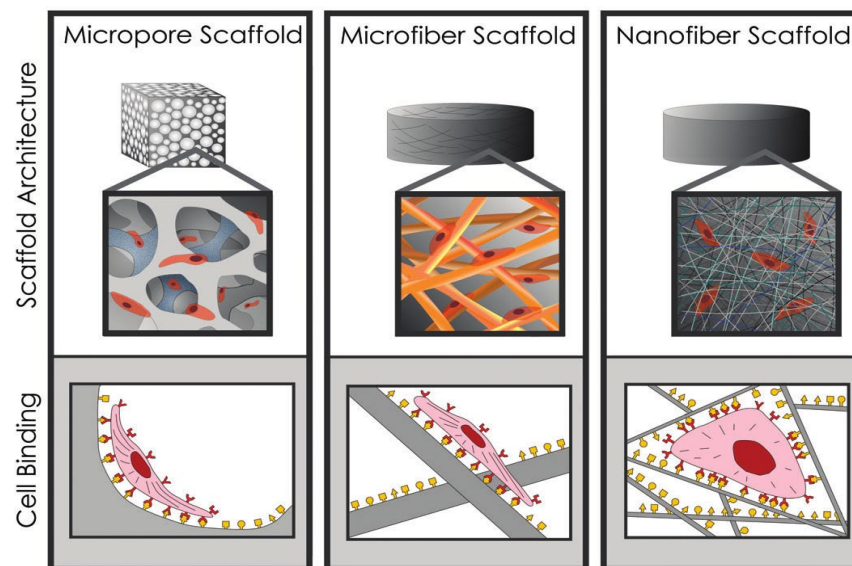
繊維状の“構造”が機能を発現

- ・ コラーゲンゲル
 - ・ フィブリンゲル
-
- 高い生体適合性
 - ✕ 抗原性・感染性
-
- ・ 合成ペプチドゲル
-
- 安全性・生体適合性
 - ✕ 力学的強度

❖ ポリマーネットワーク



- ・ 合成高分子
 - ・ 天然多糖類
-
- 性質制御性
(強度・分解性・化学修飾)
 - ✕ 細胞生息環境の提供



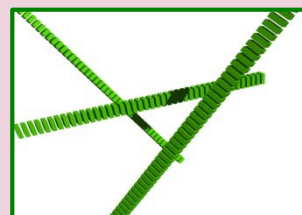
Stevens, M. M. et al. Science 2005, 310, 1135.



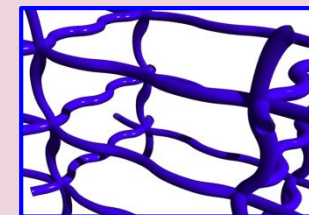
※ポリエチレングリコール=PEG

ペプチド繊維網目

高分子網目: キトサン+PEG



+



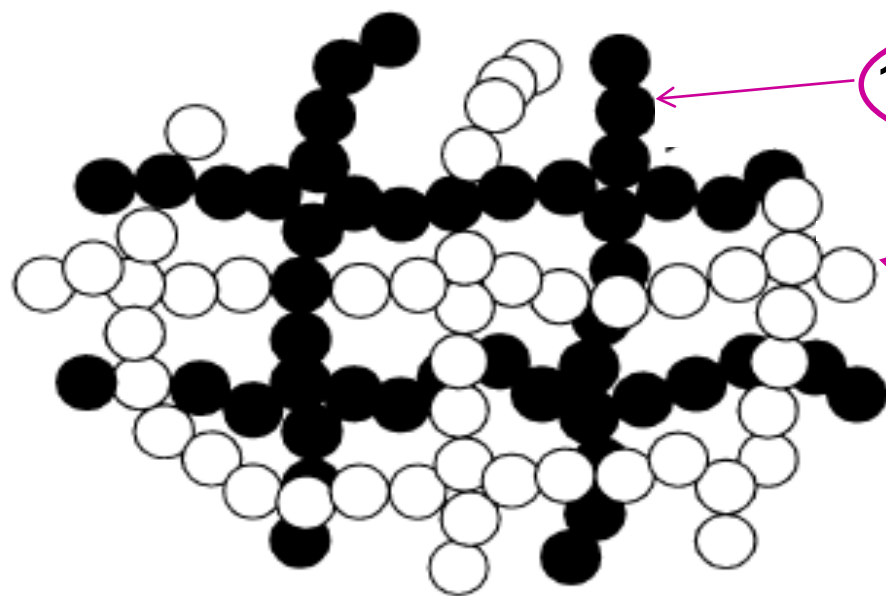
ネットワークが複合化されたIPNゲル

生体適合性&強度・生分解性を
併せ持つ足場材料(scaffold)

IPN(Interpenetrating Polymer Network) definition

An Interpenetrating Polymer Network (IPN) is defined by IUPAC as “A polymer comprising two or more networks which are at least partially interlaced on a molecular scale but not covalently bonded to each other and cannot be separated unless chemical bonds are broken.

The reason for the development of these structures is to combine the favorable properties of each constituent polymer within a new overall hydrogel network and to modulate the mechanical and biological properties of each constituent. Generally, the resulting hydrogel system possesses enhanced properties due to the synergistic effects.



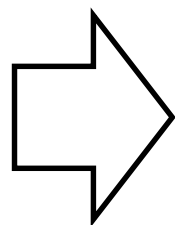
1st network

Physically cross-linking;
RADA peptide hydrogel
→differentiation, condrogenesis

2nd network

Chemically cross-linking;
Chitosan-PEG hydrogel
→mechanical strength

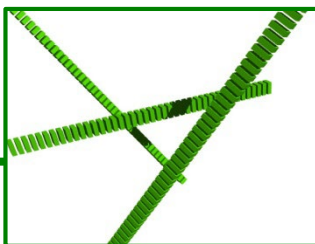
二つ以上の高分子が独立に存在する
状態で互いに絡み合ったネットワーク



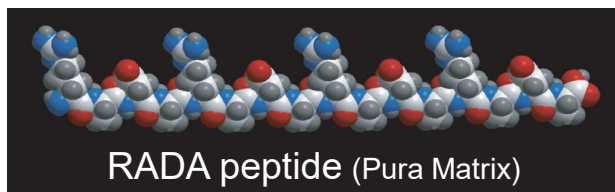
力学強度、細胞活性
の相乗的向上
(シナジー効果)

ペプチドおよび糖鎖のネットワークを構成成分とする 注射可能なインジェクタブル型IPNゲルの合成

□ RADA16 ペプチドゲル (細胞親和性ネットワーク)

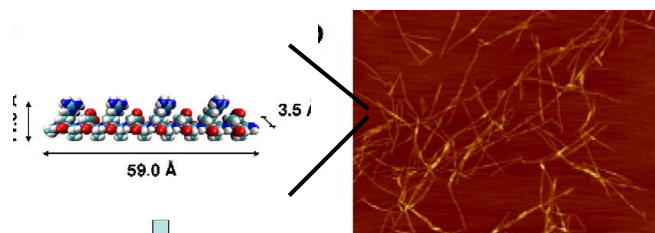


Ac- RADARADARADARADA -CONH₂



↓ in the presence of salt (e.g. in PBS)

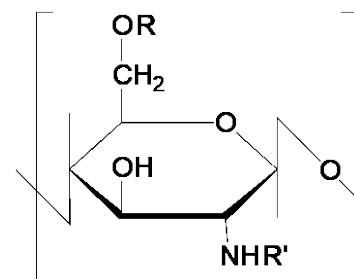
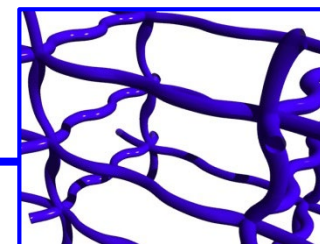
↓ self-assembly (β-sheet structure)



Nagai, Y. et al., *J. Control. Release* **2006**, 115, 18.

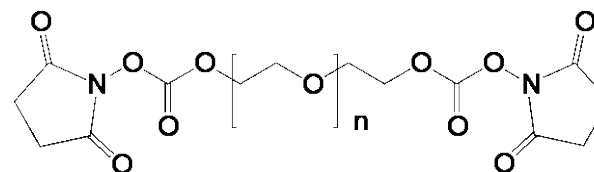
- Self-assembling peptide
- Fiber network structure (scaffold)

□ Chitosan/PEG ゲル (力学支持ネットワーク)



Carboxymethyl Chitosan
Mw = 100,000
DS 0.61, DAC 63.3%

R : -H, or -CH₃COOH
R' : -H, or COCH₃



Poly(ethylene glycol) (PEG)
Mn = 2,000
NHS substitution > 99%

- Biocompatible gel
- Improvement of mechanical strength

本研究で取組むゲル化のメカニズム

□ 高機能細胞足場の創出に向けて

繊維状ネットワーク を保持し

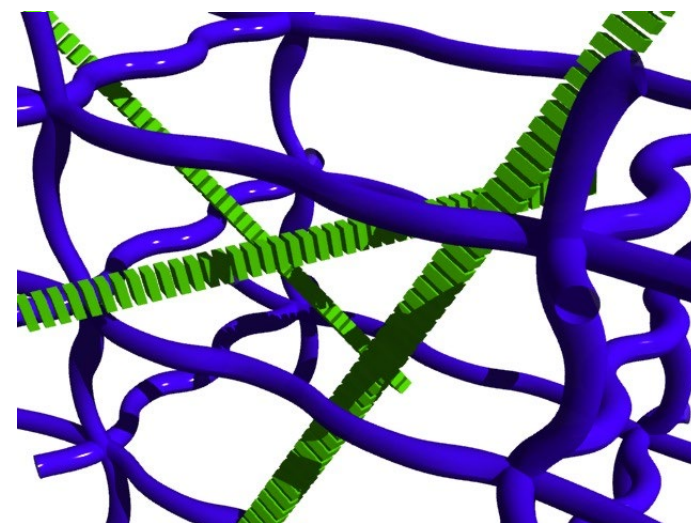
より高い力学強度 (IPN 構造) を有した

インジェクタブルなOne-pot ゲル化 システム

ペプチド繊維状ネットワーク
(組織誘導性)

Chitosan/PEGの化学架橋ネットワーク
(力学的支持)

One-pot 合成



⇒ IPN 構造は一般に、逐次的なゲル化による多段階反応

⇒ ゲル化メカニズム・反応速度のタイムラグを利用した
IPN 構造のOne-pot 形成！

Condition

Wavelength: 300-205 nm

Bandwidth: 0.5 nm

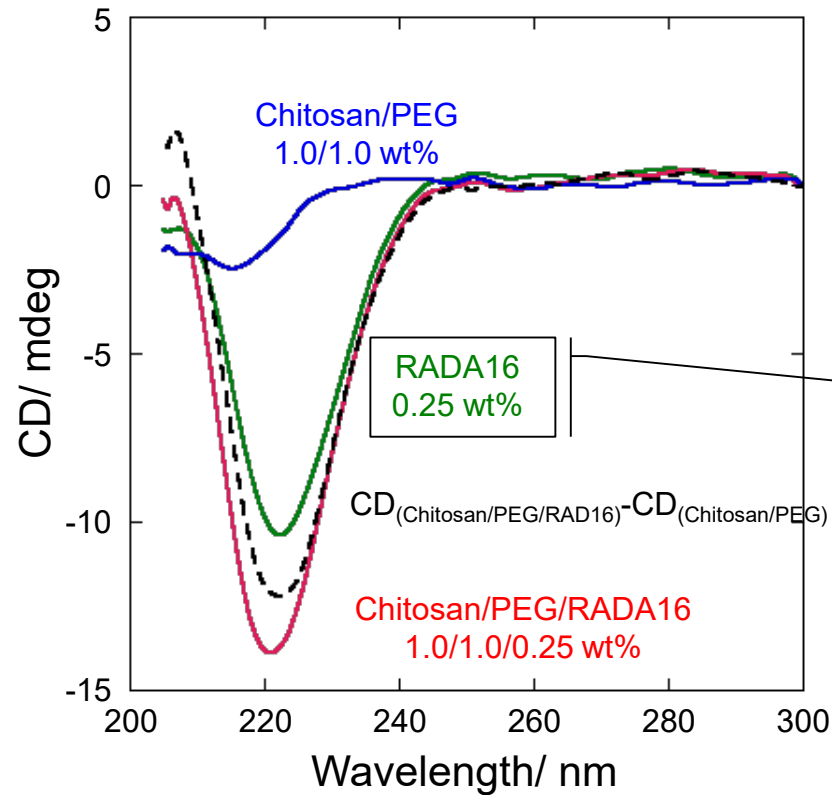
Scan rate: 200 nm/min

3 times scan for average

Path length: 0.1 mm

Temperature: 20° C

IPNのCD スペクトル測定



βシート構造由来

RADA16 の組織構造は
Chitosan/PEG ゲル中で安定に保持

ゲルの力学強度測定 (IPN の相乗効果1: 力学物性)

Condition

Sample: 300 μ L

Stress: 1.0-3000 Pa

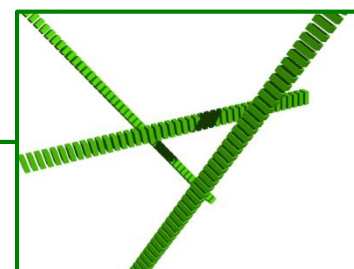
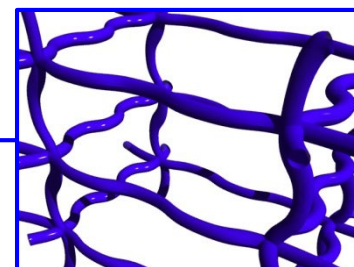
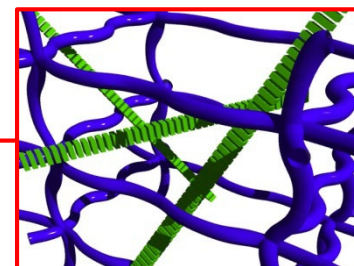
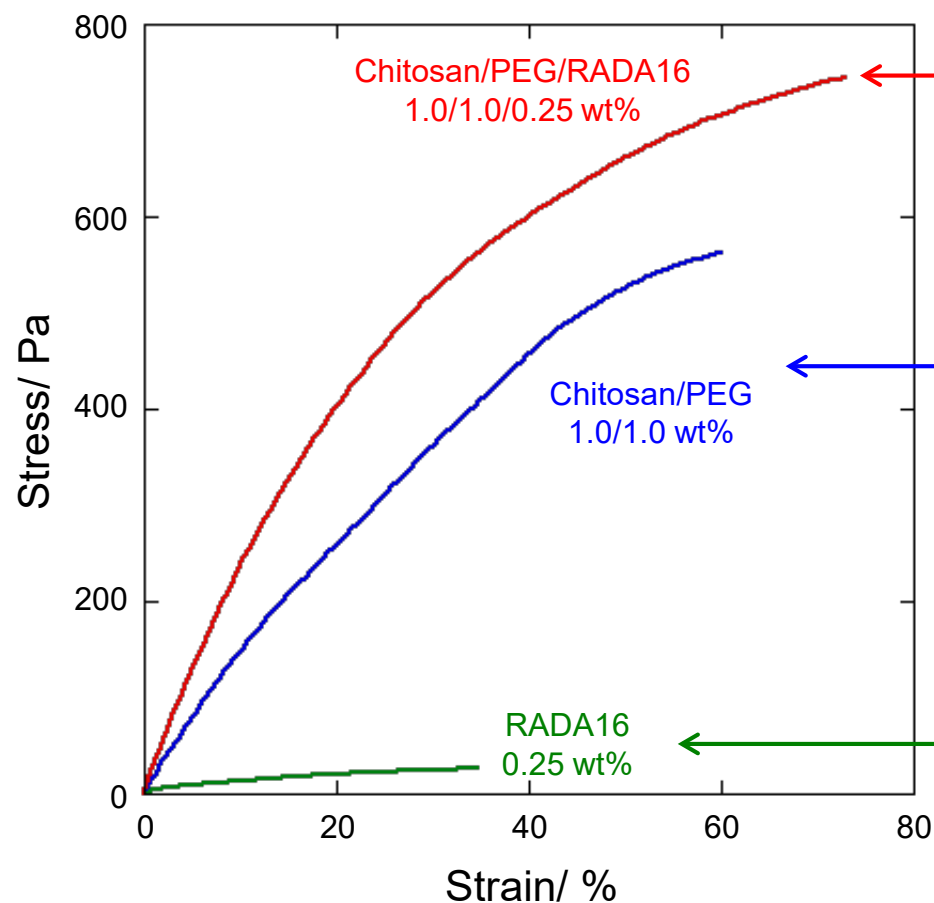
Sensor: PP20

Mode: CS

Frequency: 1 Hz

Shear amplitude: ~ 0.5 N

Temperature: 20 $^{\circ}$ C

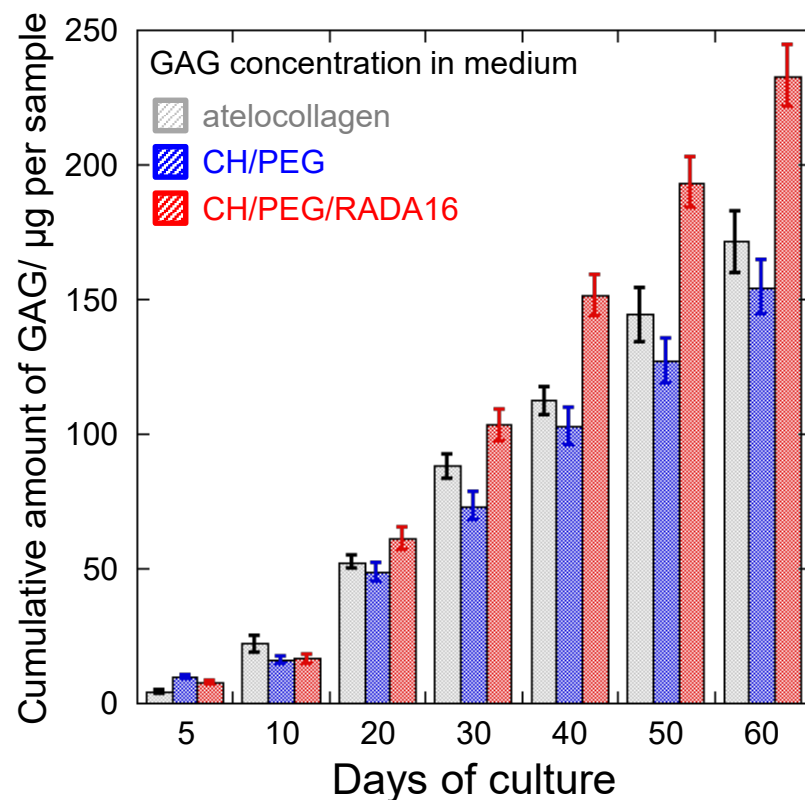


IPN 構造に由来する力学的強度の向上

Condition:
Gel composition: atelocollagen 0.5 wt%
CH/PEG/RADA16
2.0/1.0/0.25 wt%
Gel volume: 50 μ L
Medium: DMEM
Cell: chondrocyte (P1)
Cell density: 1.0×10^7 cells/mL
Incubation: 37°C, 5% CO₂

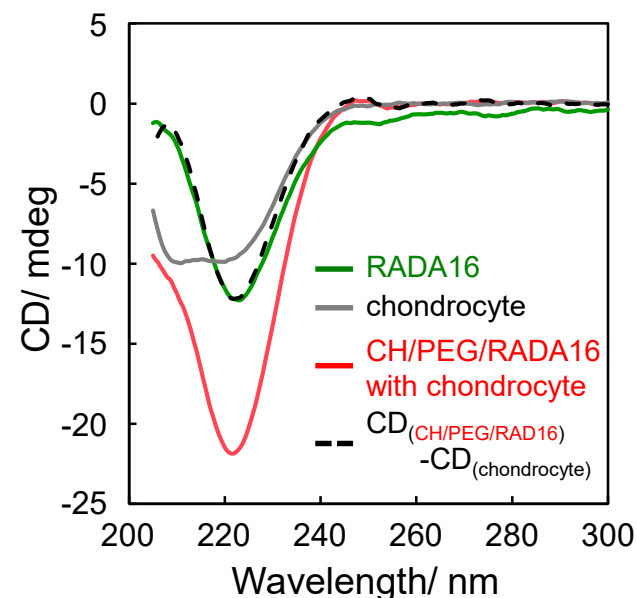
in vitro ゲル培養 (IPN の相乗効果2: 細胞活性)

□ グリコサミノグリカン(GAG)産生量



CH/PEG/RADA16 ゲルを
足場とした細胞機能の向上

□ 細胞存在下でのIPN-CD スペクトル

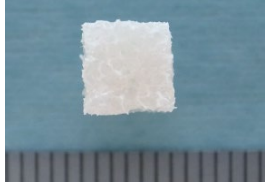
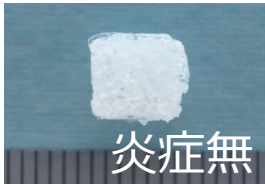
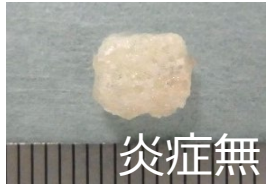


細胞存在下でのRADA16
繊維構造の保持を確認

Gel composition: atelocollagen 1.0 wt%
Chitosan/PEG/RADA16
2.0/1.0/0.25 wt%

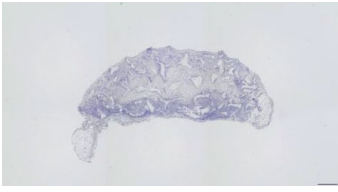
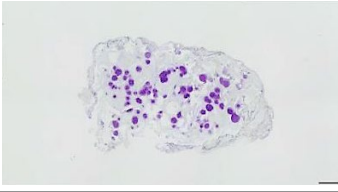
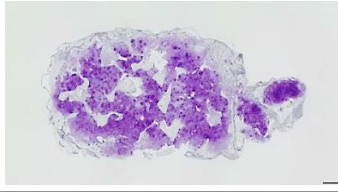
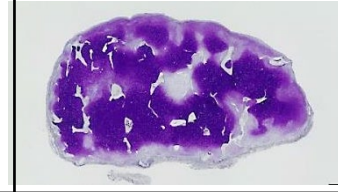
Cell: human auricular chondrocyte (P1)
Cell density: 10^6 , 10^7 , 10^8 cells/mL

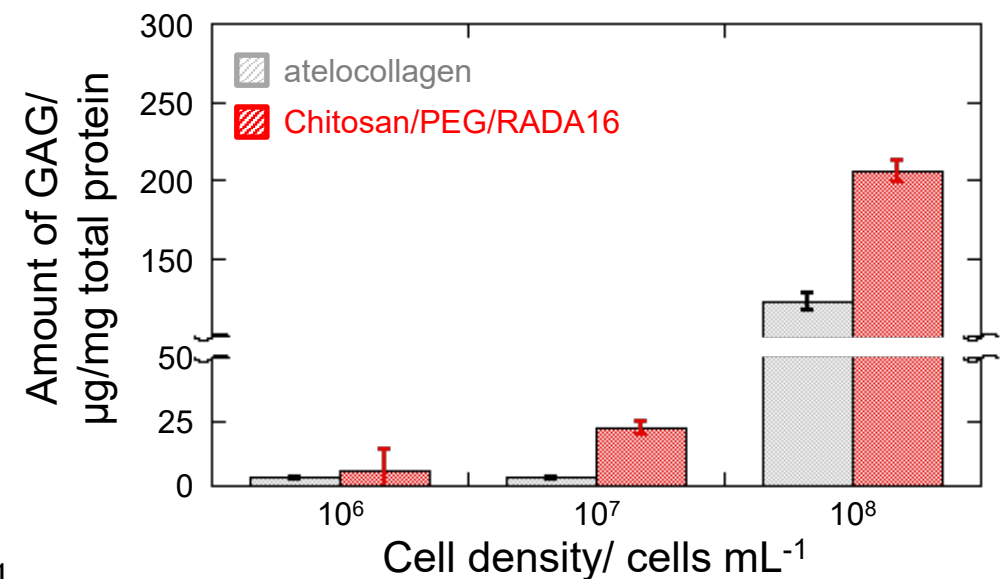
Scaffold: PLLA scaffold (KRI), porosity >95%
Nude mouse: Balb/c nu/nu (6 wks, ♂)
Incubation time: 8 weeks
Characterization: gross pathology,
toluidine blue staining, GAG

	pre-transplant	post-transplant
Atelocollagen		 炎症有
	pre-transplant	post-transplant
IPN (Chitosan/PEG /RADA16)		 炎症無

**アテロコラーゲンゲルよりも
優れたヒト軟骨の再生**

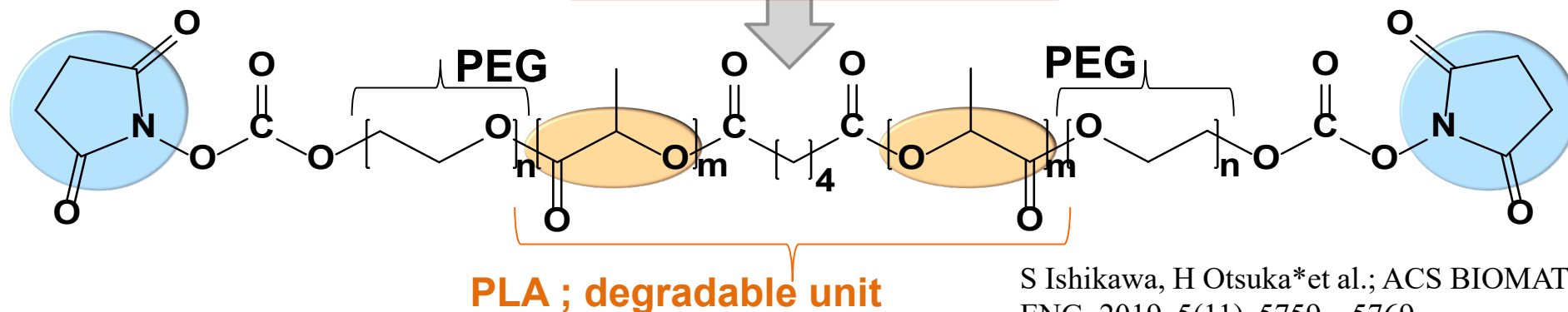
Effect of cell density(cells/mL) on GAG production

atelocollagen		
10^6	10^7	10^8
		
IPN (Chitosan/PEG/RADA16)		
10^6	10^7	10^8
		

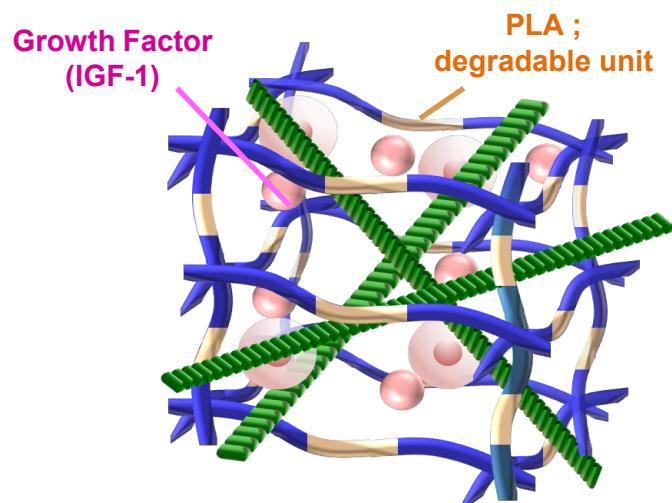


IPN 構造を有する インジェクタブルゲルへの生分解性付与

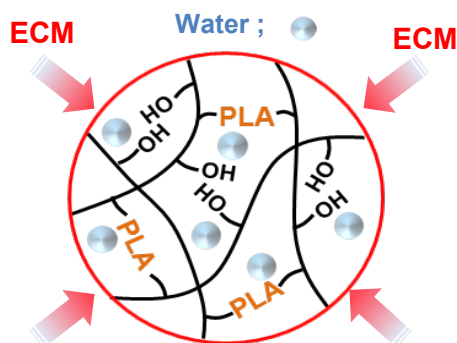
生分解性架橋剤の合成 (PEG-PLA-PEG)



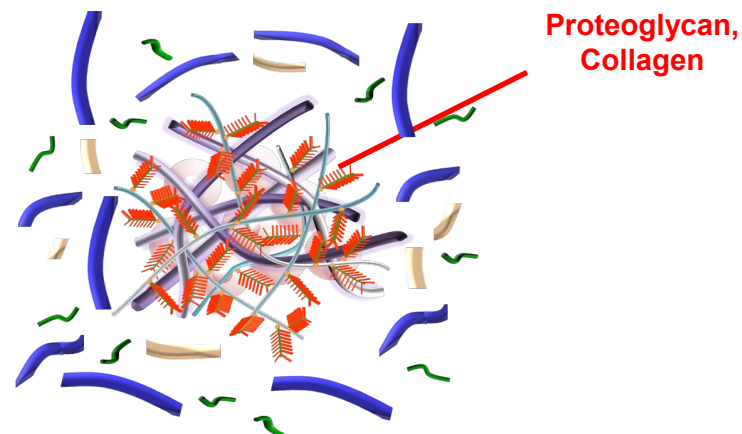
S Ishikawa, H Otsuka*et al.; ACS BIOMATER SCI ENG, 2019, 5(11), 5759 – 5769.



CH/PEG-PLA-PEG/RADA16
Injectable gel



Tissue
regeneration



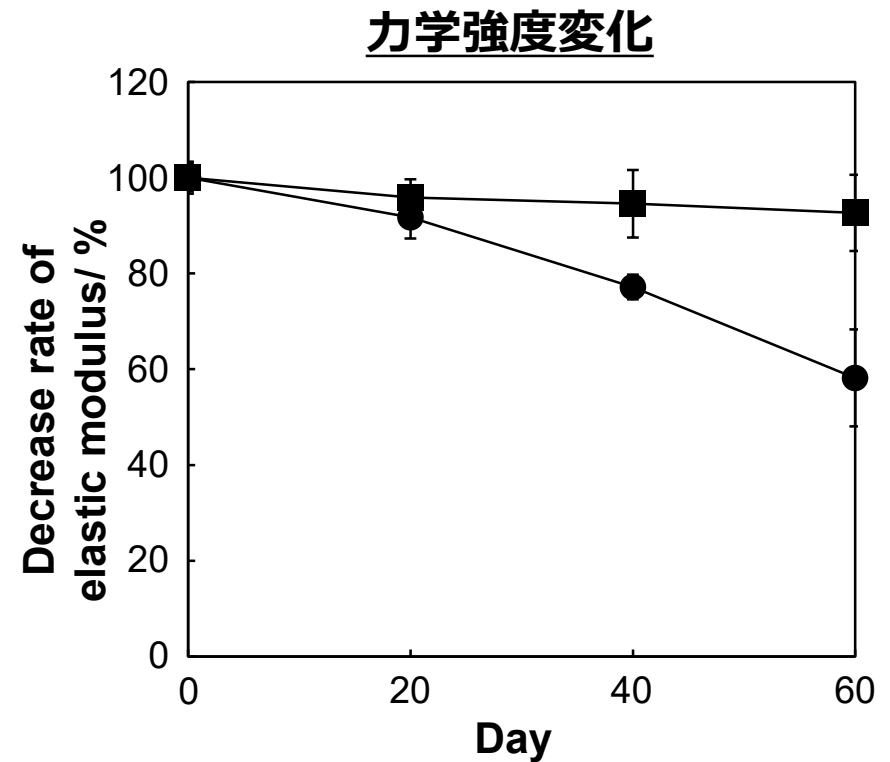
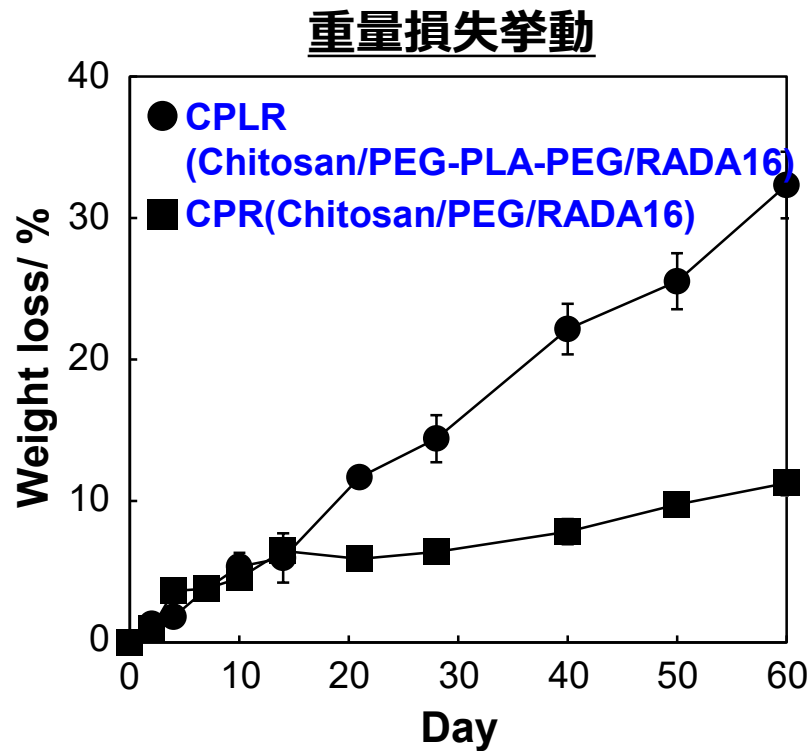
Host ECM structure
(Produced by cultured cell)

成長因子内包型IPN ゲルの物性評価と再生組織置換性評価

分解挙動評価

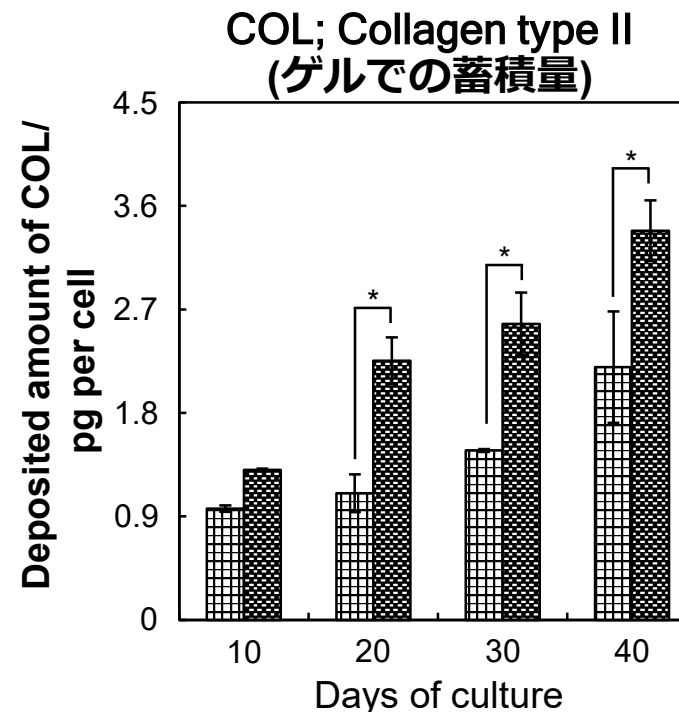
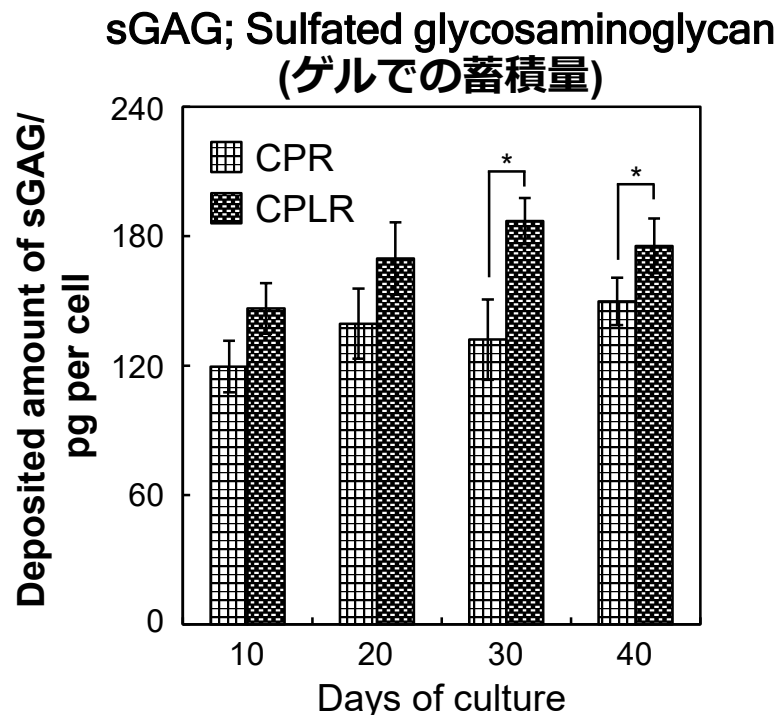
□ 生理条件下分解試験 (in PBS at 37 °C)

Weight loss = $(W_{do} - W_d) / W_d$ Gel volume : 300 μ L
 W_s : weight of swollen gel Temp. : 20 °C
 W_{do} : Initial weight of dry gel
 W_d : weight of dry gel



⇒ 時間経過につれてCPLR の重量損失向上、力学強度減少
 ⇒ **CPLR はPLA のエステル加水分解に基づき分解**

□ タンパク質産生量 sGAG → DMMB assay (570 nm), COL → Hydroxyproline assay (570 nm)



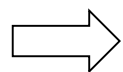
(n = 3, *p < 0.05 (Student's t-test))



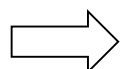
CPR(Chitosan/PEG/RADA16)



CPLR (Chitosan/PEG-PLA-PEG/RADA16)



CPLR のsGAG, COL 蓄積量向上



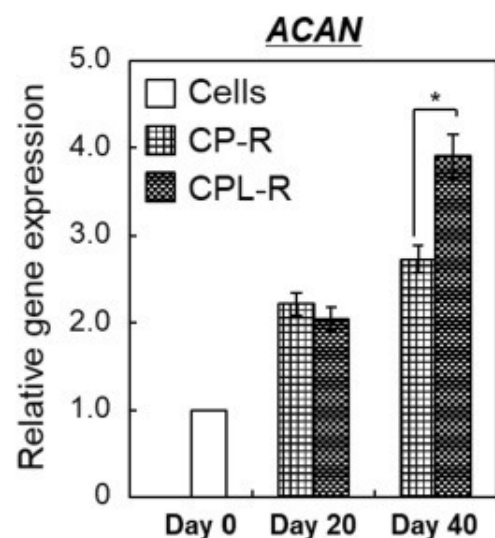
RADA16 複合化とゲル分解による細胞機能向上

軟骨細胞機能評価

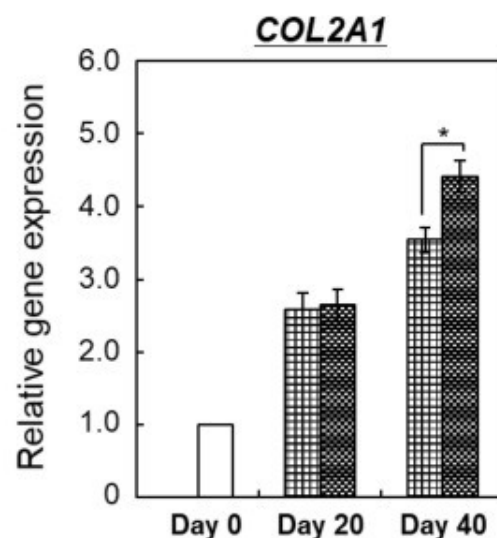
□ 遺伝子発現量評価 (RT-PCR)

遺伝子増幅後、電気泳動を行いバンド強度にて相対的なmRNA 発現量 (GAPDH で規格化した後、Day0 のウシ膝軟骨細胞との相対値) を評価

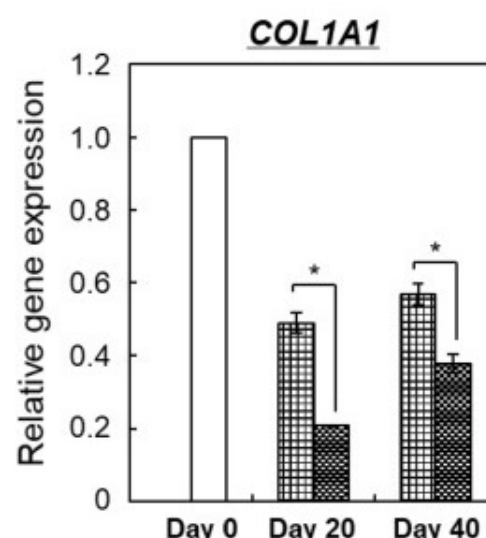
軟骨分化性



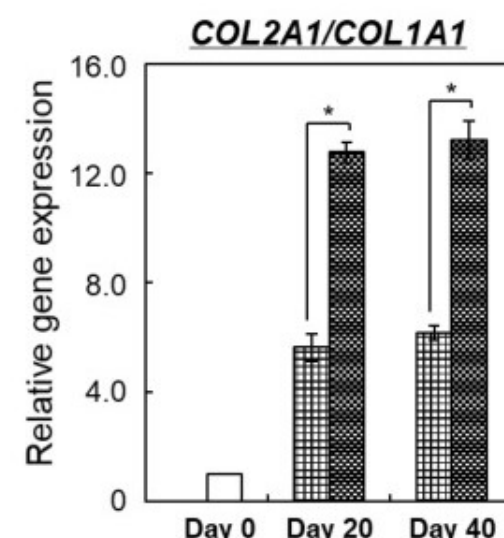
硝子軟骨性 (関節軟骨)



線維軟骨性 (椎間円板)



硝子軟骨への選択性



(n=3, *p < 0.05 (Student's t-test))

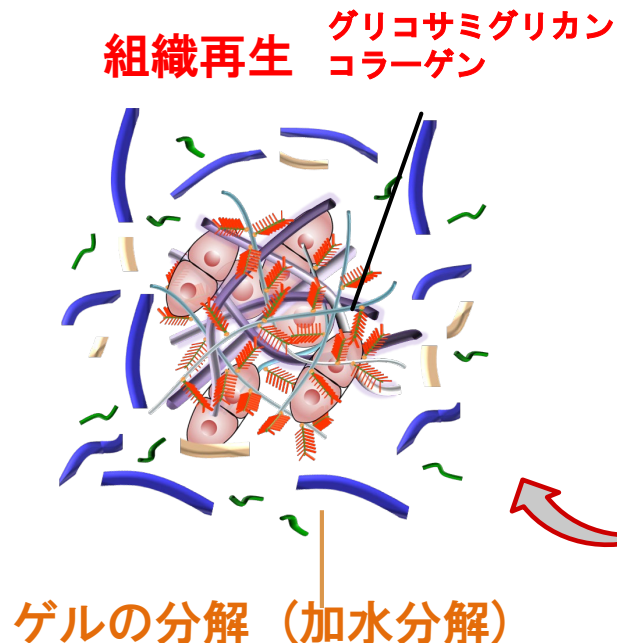
ACAN . . . CPLR > CPR
COL2A1 . . . CPLR > CPR

COL1A1 . . . CPLR < CPR

分解性IPN ゲル中での硝子軟骨細胞への分化

切らずに注射のみで関節の軟骨再生を助け、自然に起こる加水分解で術後の炎症を防ぐ、注射可能なゼリー状物質「インジェクタブルハイドロゲル」の開発

体を傷つけず、
かつ低炎症性
な関節軟骨の
再生を実現



1. S Ishikawa, H Otsuka*et al.; Materials Today Advances 9 (2021) 100131
2. S Ishikawa, H Otsuka*et al.; CHEM MATER, 2020, 32(6), 2353 – 2364.
3. S Ishikawa, H Otsuka*et al.; J. Appl. Polym. Sci. 2019, 137, 48893.
4. S Ishikawa, H Otsuka*et al.; ACS BIOMATER SCI ENG, 2019, 5(11), 5759 – 5769.



従来技術とその問題点

細胞の足場となっている実際の生体内の細胞外マトリックス(ECM)は、さまざまなタンパク質などから構成されている。そのため、生体外で細胞を培養する際に足場として用いる材料も、複数の物質が組み合わさって立体的な骨格を形成するものが望ましいとされている。そのため、複数の独立した材料が機能的なネットワークを形成しているIPNゲルが注目されている。

従来、IPNゲルを合成するには、薬剤の添加や放射線の照射を含む多段階の合成反応系が必要であった。しかし、医療応用のためには、余分な刺激物などを添加せずにone-pot(単一の反応容器内)で簡便合成でき、細胞毒性を生じさせず、損傷部位で効率よく三次元構造を構築できるゲル材料であることが求められる。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来、薬剤の添加や放射線の照射を含む多段階の合成反応系が必要であった人工ECMを、簡便にone-pot合成できる合成経路の確立に成功した。
- 軟骨細胞の足場となる材料は、まだ十分に生体内の足場材を模倣できていなかったが、本研究で開発した細胞足場材料の簡易な合成系は再生効率が高く、生体に問題を引き起こしにくい。
- ペプチドが自律的に繊維状の構造を形成する現象(自己組織化)と、それに続くキトサンとポリエチレングリコールの共有結合形成によって形成されたIPNゲルは足場材料として適した構造を持ち、かつ軟骨細胞がIPNゲルを足場として自律的に増殖することも確認された。
- 現状では、損傷した軟骨は自然に修復することはないため、唯一の治療法である人工関節に代わる軟骨の再生医療の発展に大きく寄与すると期待できる。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、研究材料製造に適用することで細胞培養用基材としてのメリットが大きいと考えられる。
- また、達成された細胞増殖や分化能力に着目すると、生体外三次元培養や薬物スクリーニングといった分野や用途に展開することも可能と思われる。
- 上記以外に、代替動物実験の効果が得られることも期待される。
- 軟骨以外の組織再生に適用可能な足場材料となることが期待できる。

実用化に向けた課題

- 現在、in vivo実験について組織再生が可能のところまで開発済み。しかし、安全性試験の点が未解決である。
- 今後、細胞ソースや施術法について実験データを取得し、臨床応用に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、材料合成の精度を大量生産、均一な品質確保まで向上できるよう技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- 未解決の細胞ソースの確保や施術法の確定については、医学部との連携により克服できると考えている。
- 生体高分子の大量合成技術、安全性試験、ヒトへの臨床応用などの経験を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、タンパク質医薬を開発中の企業、医療分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 生分解性インジェクタブルゲル
- 出願番号 : 特願2017-536444 (国内登録
6886402)、15/754393 (US登録
10835637)
- 出願人 : 東京理科大学、(株)スリー・ディー・
マトリックス
- 発明者 : 大塚英典、松隈大輔、松田範昭

産学連携の経歴

- 2008年- 2011年 JST(CREST)事業に採択
- 2010年-2014年 NEDO実用化促進事業に採択
- 2007年-2009年 NEDO健康安心プログラム・再生医療評価研究開発事業に採択
- 2007年-2011年 三菱レイヨン株式会社と共同研究実施
- 2012年- 2013年 JST(CREST)事業に採択
- 2011年-2016年 日本バイリーン株式会社と共同研究実施
- 2016年-2018年 株式会社スリー・ディー・マトリックスと共同研究実施

お問い合わせ先

東京理科大学

産学連携機構 是成 幸子

T E L 03-5228-7431

F A X 03-5228-7442

e-mail ura@admin.tus.ac.jp