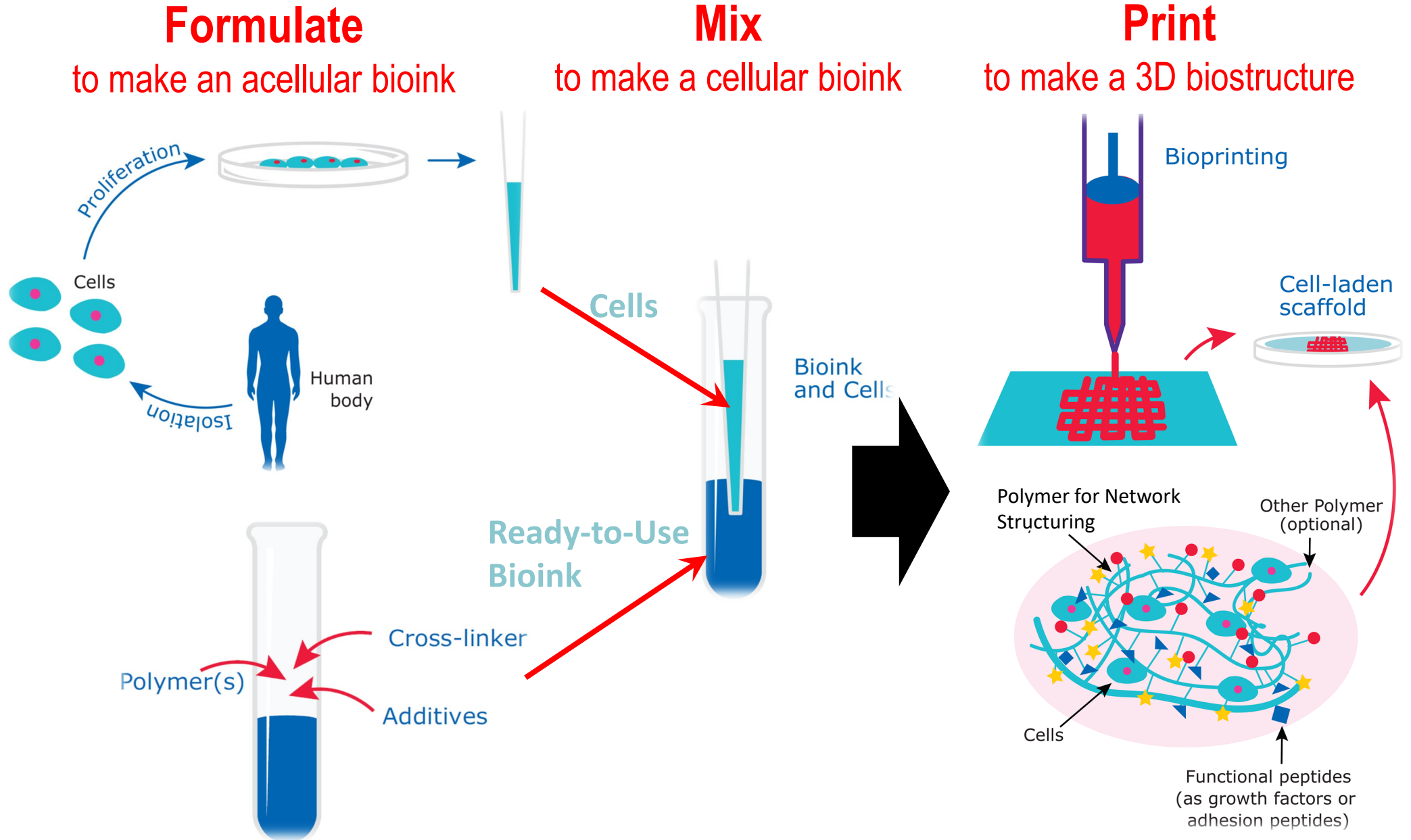


自動逐次架橋による自己修復性 IPNゲルを用いた細胞移植

東京理科大学 理学部第一部 応用化学科
教授 大塚 英典

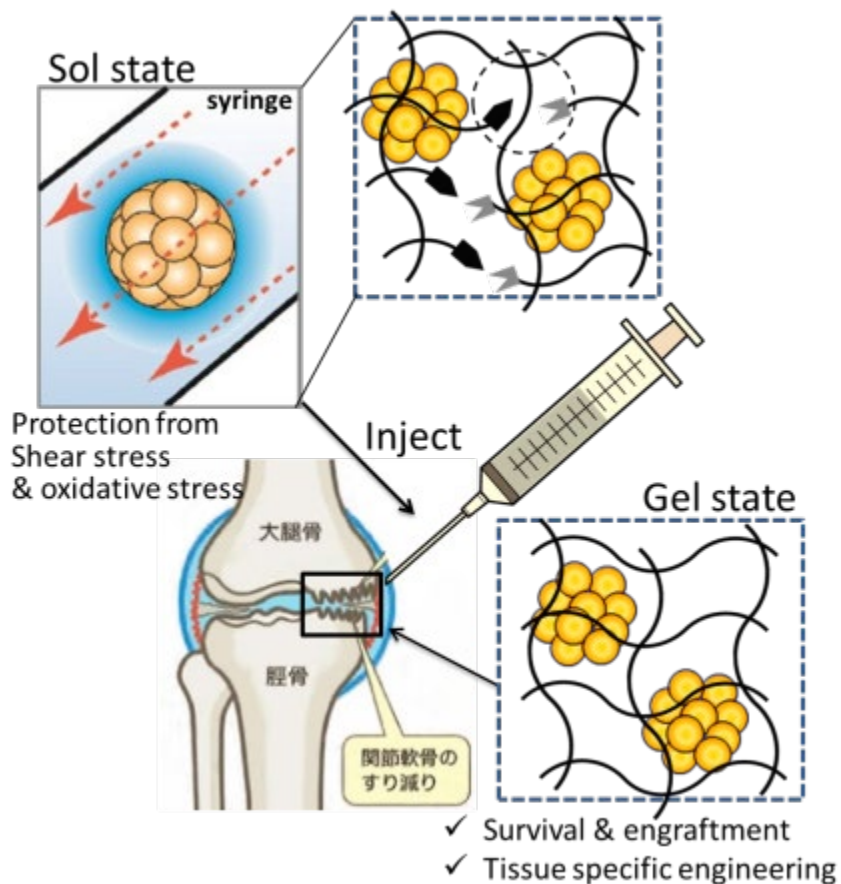
2024年11月7日

Extrusion-based bioprinting

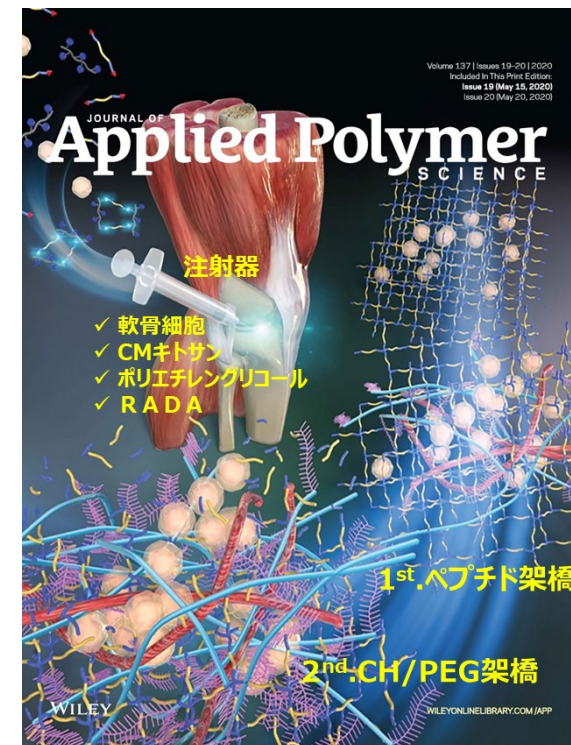


研究背景

高いせん断応力で粘度低下を示す自己修復性ハイドロゲルを用いた細胞移植は、低摩擦下で細胞を注射可能であることから低侵襲で体内に移植可能な優れた医療技術として期待されています。近年、ハイドロゲルの相互侵入高分子網目 (IPN) 構造は、細胞の移植後に炎症反応を誘起することなく生体組織に近い再生を促すため、生体適合性が高まることを我々は明らかにしました。本研究では、高い安定性を有する動的結合で架橋したヒアルロン酸 (HA) と、物理的相互作用によりゲル形成する自己組織化ペプチド (RADA) から成る自己修復性IPNゲルを開発し、細胞足場としての有効性を明らかにしました。



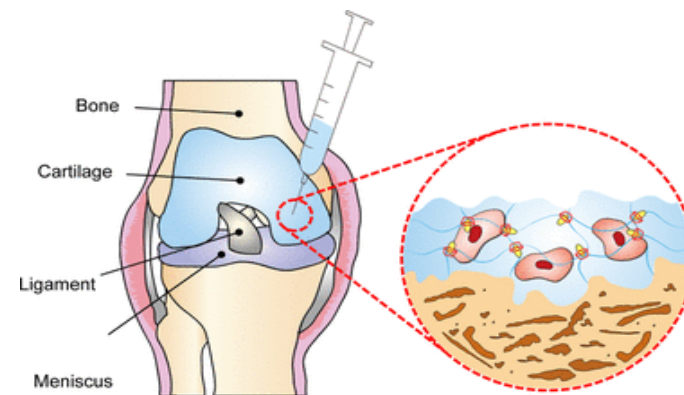
S Ishikawa & H Otsuka* et al., Chem. Mater., 32, 6, 2352-2364 (2020).



S Ishikawa, H Otsuka* et al.; J. Appl. Polym. Sci. 2019, 137, 48893.

■ 組織再生足場材料としてのハイドロゲル

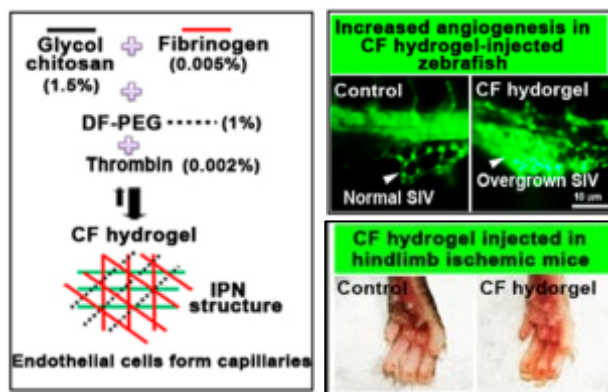
- ◎ 生体軟組織に類似した高い柔軟性・弾力性
- ◎ 細胞の表現型維持に不可欠な
3次元微小環境を提供



Sang Hoon Jeong, *et al.*, ACS Bio Mater. 2020, 3, 5040-5047

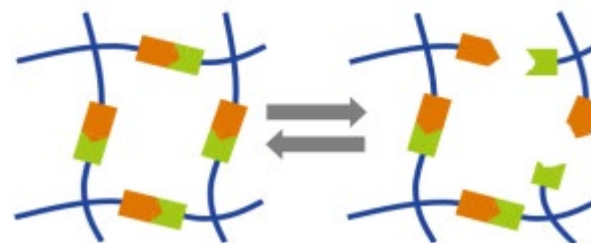
■ 自己修復性の付与

- ◎ ネットワークが力学的刺激により崩壊しても修復可能
- ◎ 細胞の遊走、栄養素の運搬を促進する
- ◎ せん断応力が増加すると粘度が低下する (Shear-thinning性) → 注射可能



F-Y Hsieh *et al.* NPG Asia Materials, 9, 2017, e363

自己修復性を付与した
足場材料で細胞機能が向上



自己修復性を有し細胞増殖・分化を誘導するハイドロゲルの創成

研究概要

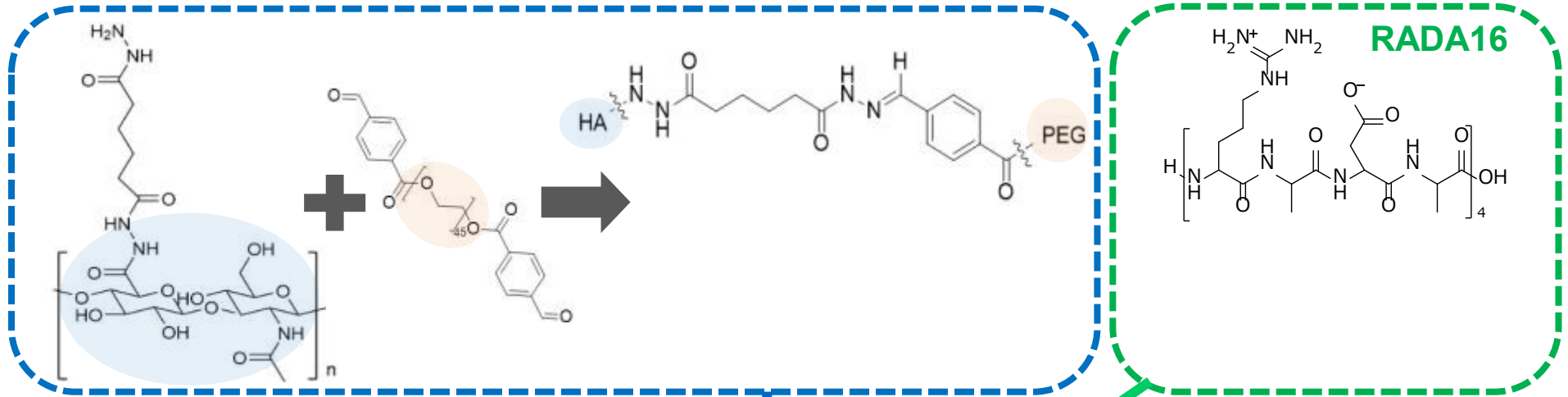
半バイオ直交クリック反応として、ヒドラゾン形成はタンパク質の存在下で速やかに起こり、オフターゲット反応が少ないことが知られています。私たちは、ヒドラゾン・ハイドロゲルが示す細胞送達の注入性と生体内安定性を、細胞移植の用途に合わせて調整することに取り組みました。

注射可能なハイドロゲルの開発という観点から見ると、ヒドラゾン動的結合は、剪断減粘性や自己修復性といった有利な特性を持ちます。しかし、可逆的な架橋は、生体内に移植されたり、in vitroで培養されたりすると、急速な浸食につながる可能性もあります。高分子量のゲル前駆体ポリマーを用いた先行研究では、生体内で安定化する一方、注入性に関して、高い押し出し力につながる鎖のもつれによって制限されてきました。この問題に対処するため、低分子量のポリマーを用いて処方すると、それによって押し出し力が減少することが示されました。分子量を低くすることは有用な戦略ですが、特に低分子量のヒアルロン酸はマクロファージを炎症促進状態に偏向させるとともに、生体内安定性の低下につながります。

その結果、二次的な安定化架橋やネットワークが必要となります。私たちの示すIPNゲルは急速な剪断減粘性による抗炎症性、生体内安定性と細胞生着の向上というすべてを満たしました。

研究概要

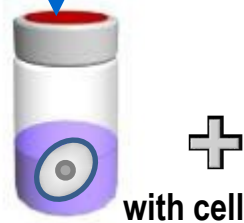
~CH or HA/PEG/RADA16 によるIPN~



Hyaluronic acid (HA)

HA10 (Mn=10万 Da)
HA20-50 (Mn=20~50万 Da)
HA50-70 (Mn=50~70万 Da)

CMキトサン(CH)
Or ヒアルロン酸 (HA)
+両末端CHO化PEG

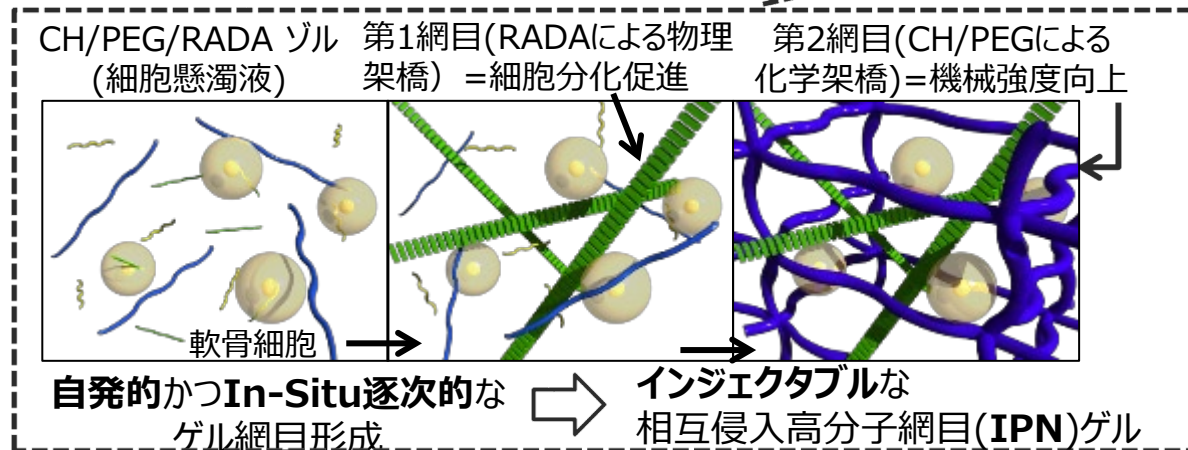


+



自己組織化ペプチド
(RADA16)

→



HA-IPN gel の物性評価

- 未架橋HA₂₀-50-AHD/OH-PEG存在下でのRADAのCDスペクトルを測定
⇒ ピーク増強がHA/PEG存在によるものなのか、架橋の影響を調査

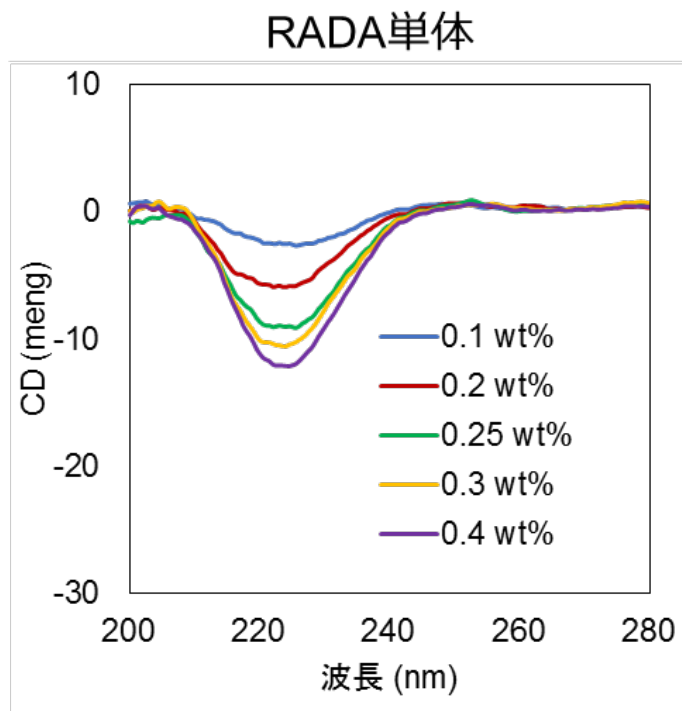


Fig.5 RADA(CK12-01747)単体のCDスペクトル

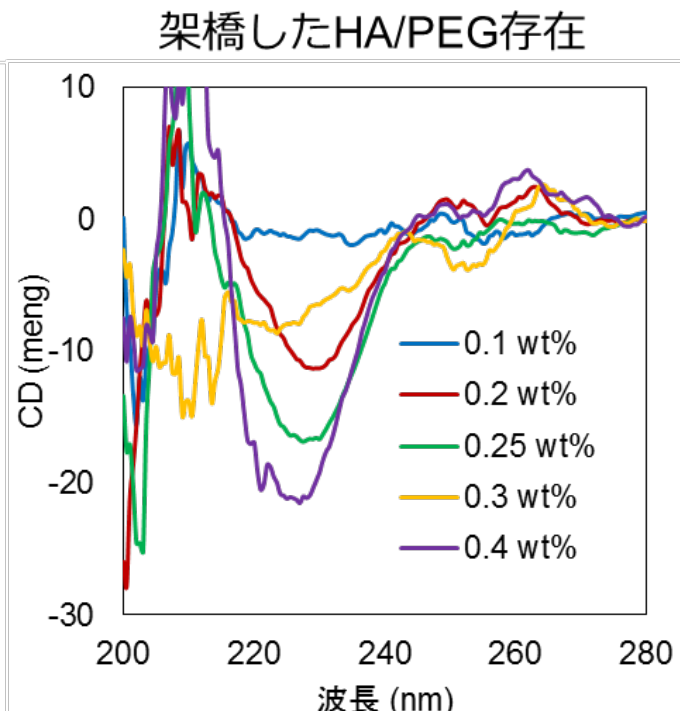


Fig.6 HA₂₀-50-AHD/CHO-PEG中でのRADA(CK12-01747)のCDスペクトル

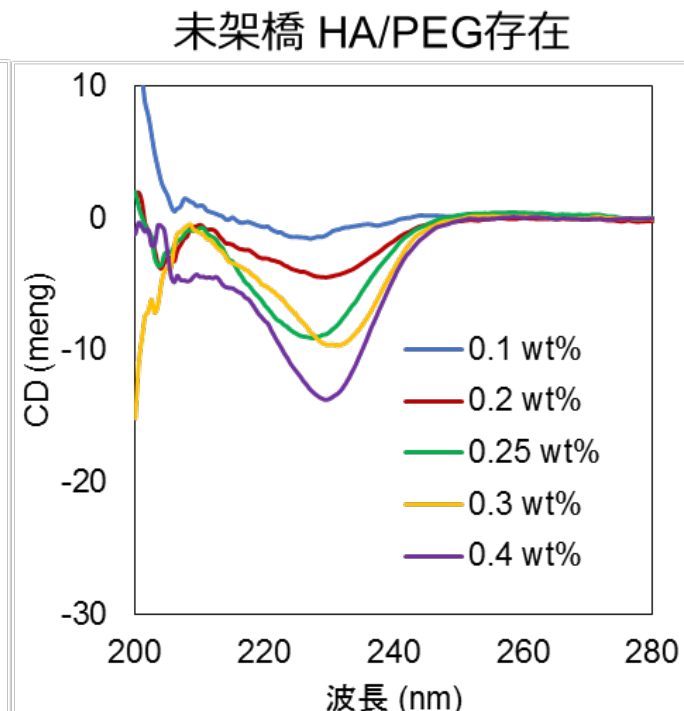
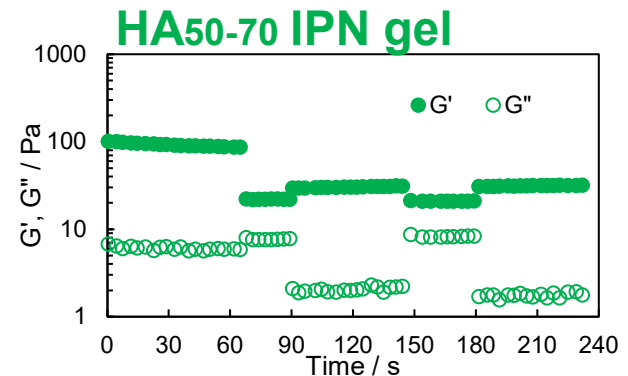
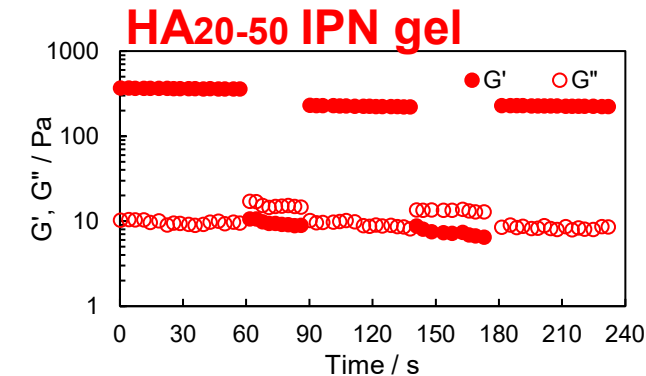
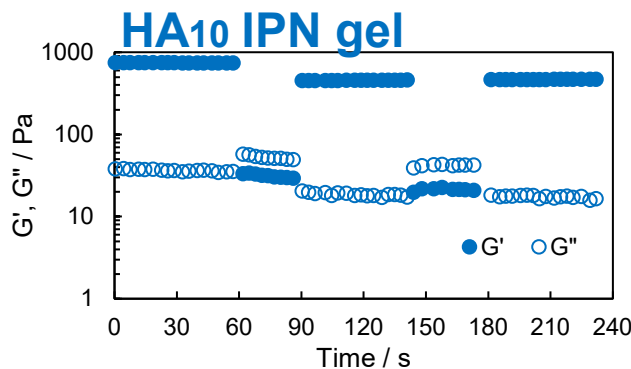
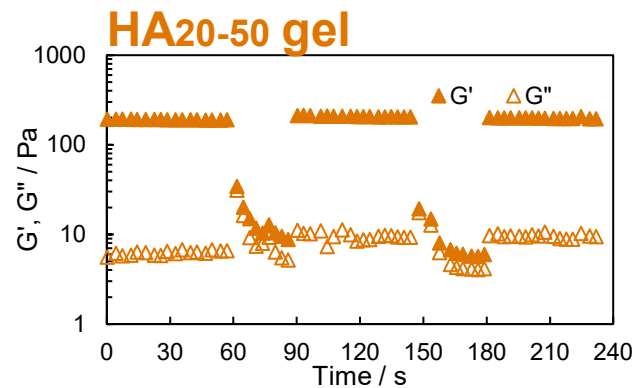
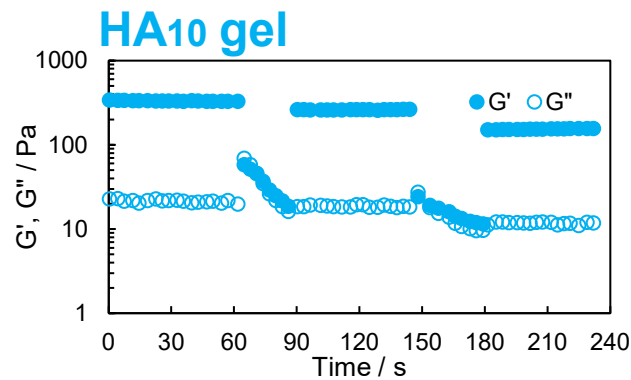
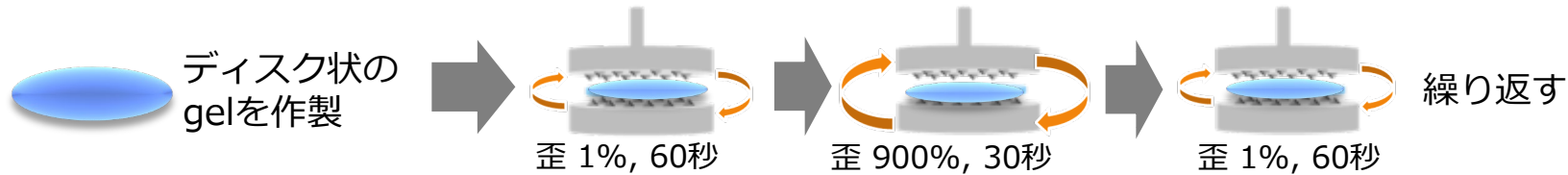


Fig.12 HA₂₀-50-AHD/CHO-PEG中でのRADA(CK12-01747)のCDスペクトル

- 未架橋HA/PEG存在下ではRADA16単体に近いスペクトル
⇒ **βシート形成向上は架橋したHA/PEGネットワークの存在に由来**

HA-IPN gel の物性評価

歪交互測定によるゾル-ゲル転移検出



Gel volume : 600 μ L, Strain : 1% or 900%,
Sensor : PP20, Normal force : 1 N,
Frequency : 1Hz
HA10/PEG/RADA=1.5/1.5/0.25 (wt.%),
HA10/PEG=1.5/1.5 (wt.%),
HA20-50/PEG/RADA=1/1/0.25 (wt.%),
HA20-50/PEG=1/1 (wt.%),
HA50-70/PEG/RADA=0.5/0.5/0.25 (wt.%),

※HA50-70 gelは強度が低く
測定困難のためIPN gelのみ測定

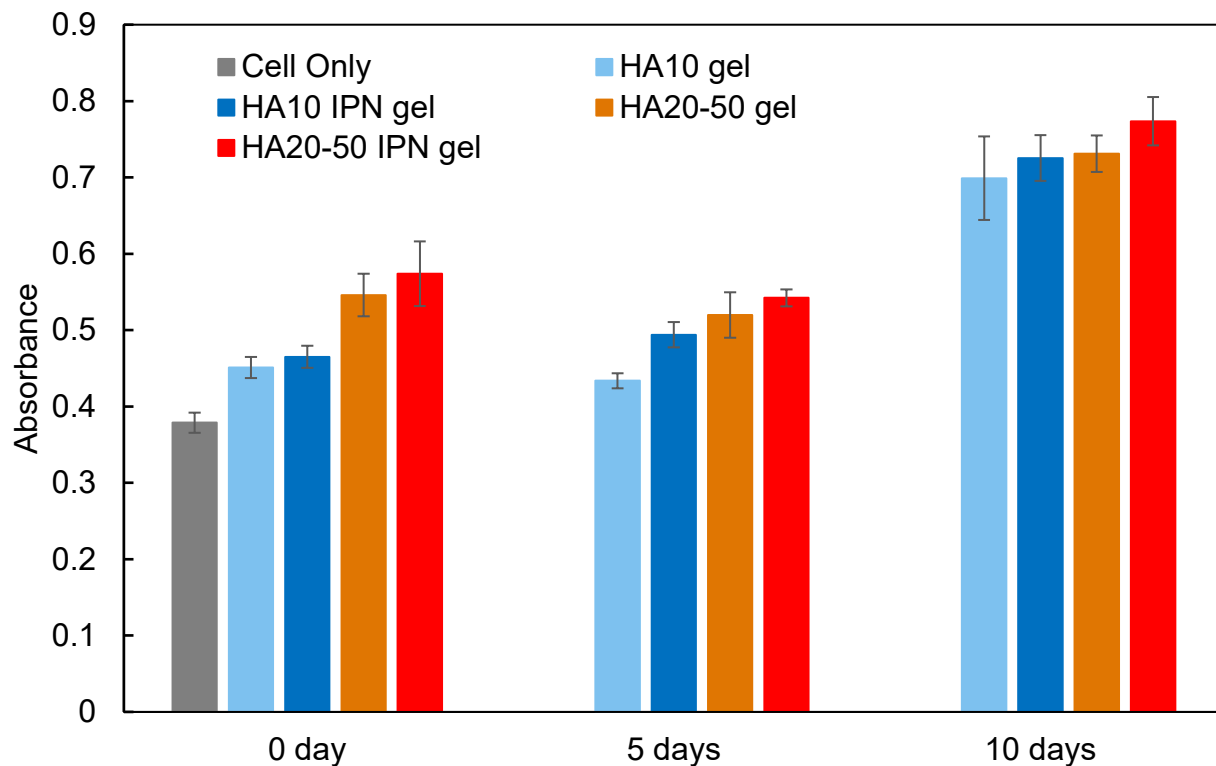
Fig. The rheological recovery test of HA gel and HA IPN gel under the varied oscillatory shear strain (1 – 900%).

**HA10 IPN gel, HA20-50 IPN gel で良好なゾル-ゲル転移
HA50-70 ではIPN化によりゾル-ゲル転移は見られない**

HA-IPN gel 内での細胞培養

MTT assayによる細胞活性評価

ゲルに細胞を内包し、0, 5, 10日目にホルマザン産生を測定



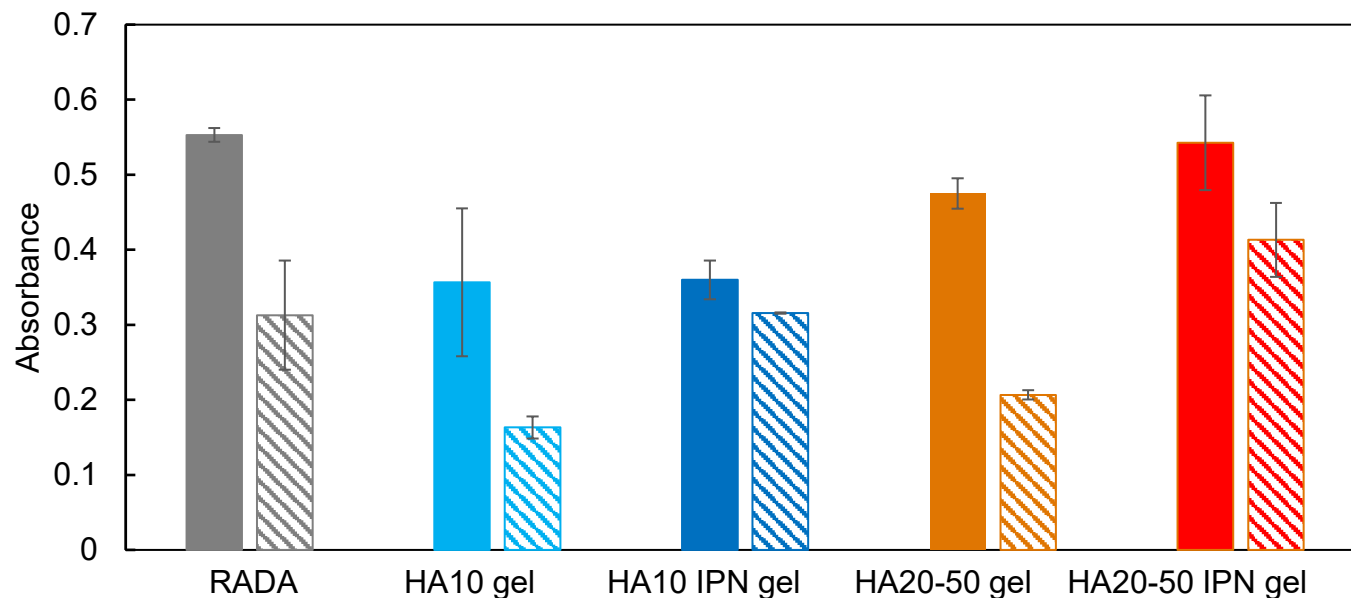
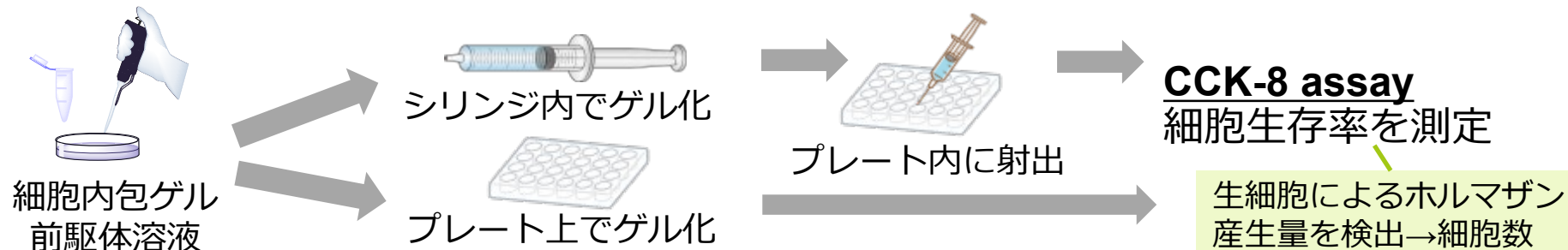
Cell : HepG2 (P10), Gel volume : 50 μ L,
Cell concentration : 1×10^7 cells/mL,
HA10/PEG/RADA=1.5/1.5/0.25 (wt.%),
HA10/PEG=1.5/1.5 (wt.%),
HA20-50/PEG/RADA=1/1/0.25 (wt.%),
HA20-50/PEG=1/1 (wt.%)

Fig. Absorbance of HA gels and HA IPN gels obtained from MTT assay at 0, 5, 10 days.

- ✓ HA20-50の細胞適合性が高い：gel濃度が低く毒性が出にくい
- ✓ IPN化により細胞適合性は向上

HA-IPN gel 内での細胞培養

細胞内包ゲル射出時の障害性評価



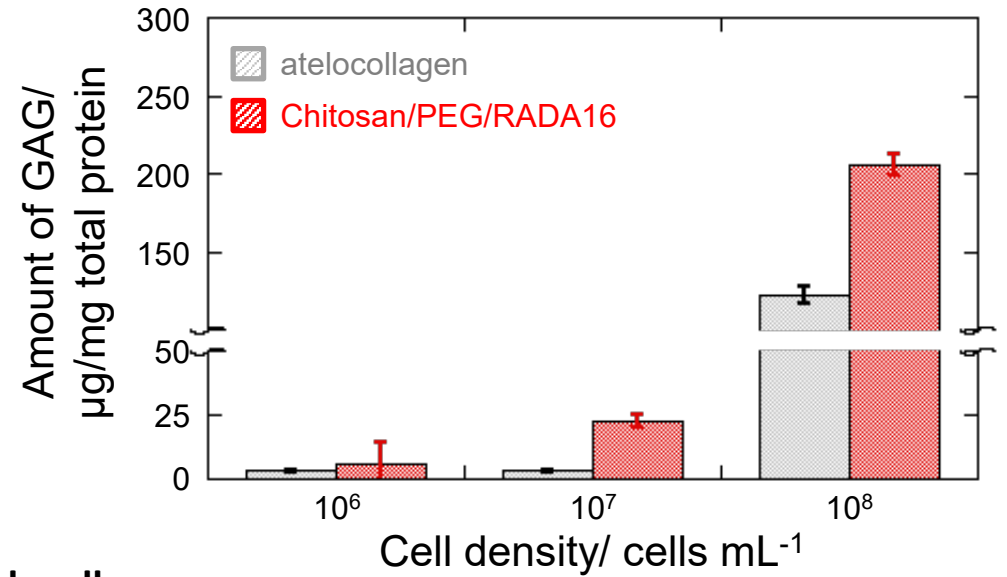
Cell : HepG2 (P12), Gel volume : 100 μ L,
Cell concentration : 5×10^6 cells/mL,
RADA16=1.0 (wt.%),
HA10/PEG/RADA=1.5/1.5/0.25 (wt.%),
HA10/PEG=1.5/1.5 (wt.%),
HA20-50/PEG/RADA=1/1/0.25 (wt.%),
HA20-50/PEG=1/1 (wt.%)

Fig. Absorbance of cells encapsulated HA gels and HA IPN gels before/after injection.

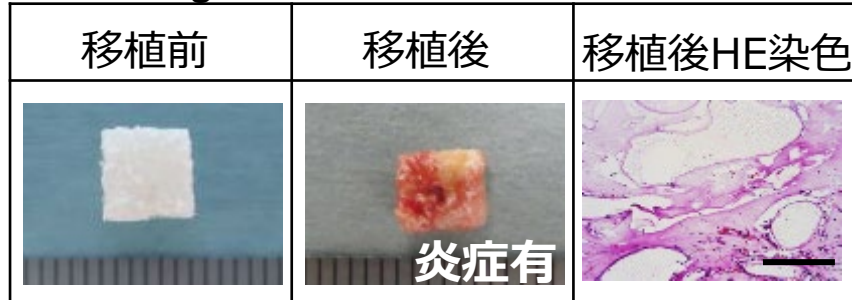
IPN化により細胞内包ゲルインジェクト時の障害性が低下

in vivo 移植実験

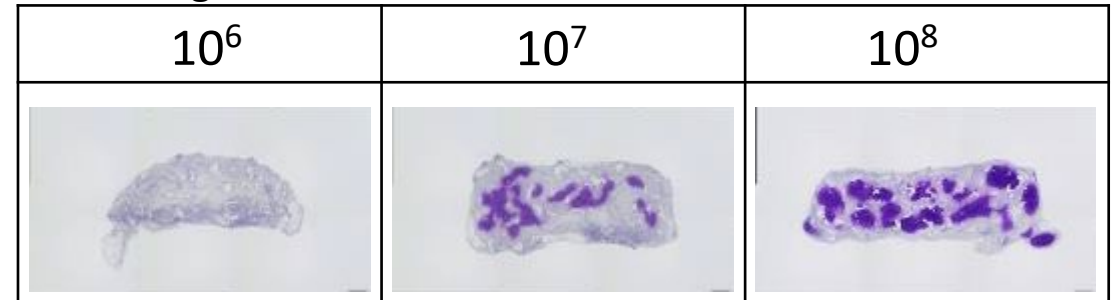
アテロコラーゲンゲルよりも 優れたヒト軟骨の再生



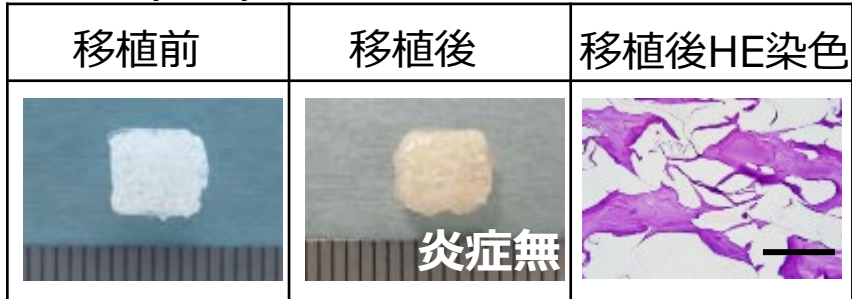
Atelocollagen



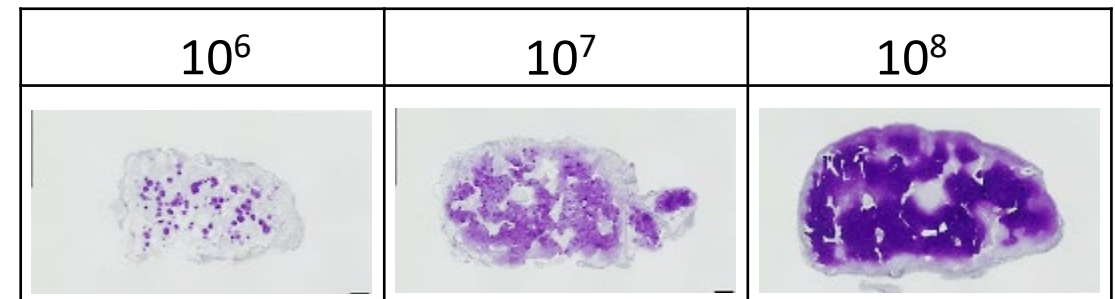
Atelocollagen



Chitosan/PEG/RADA16



Chitosan/PEG/RADA16

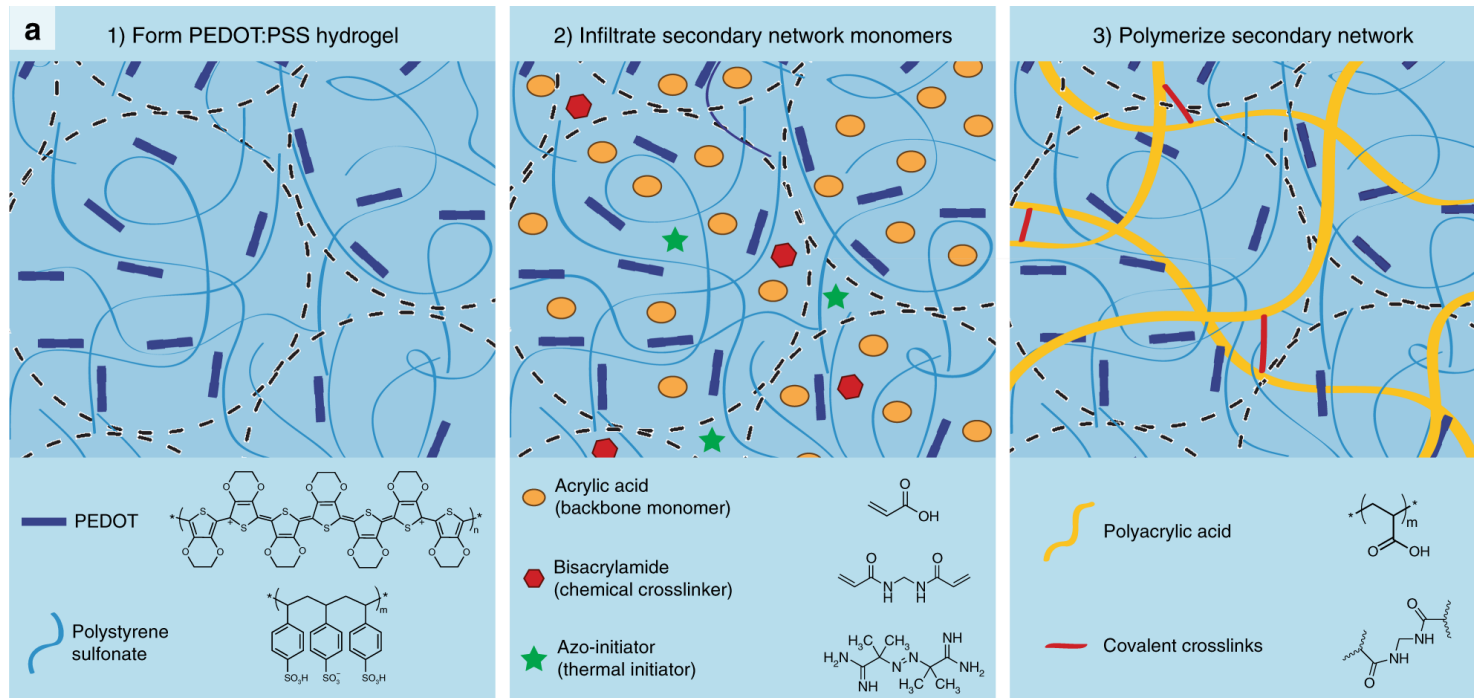


マウスでの移植後肉眼所見とHE染色

各細胞密度(cells/mL)でのマウスでの移植後TB染色

有力な競合技術①

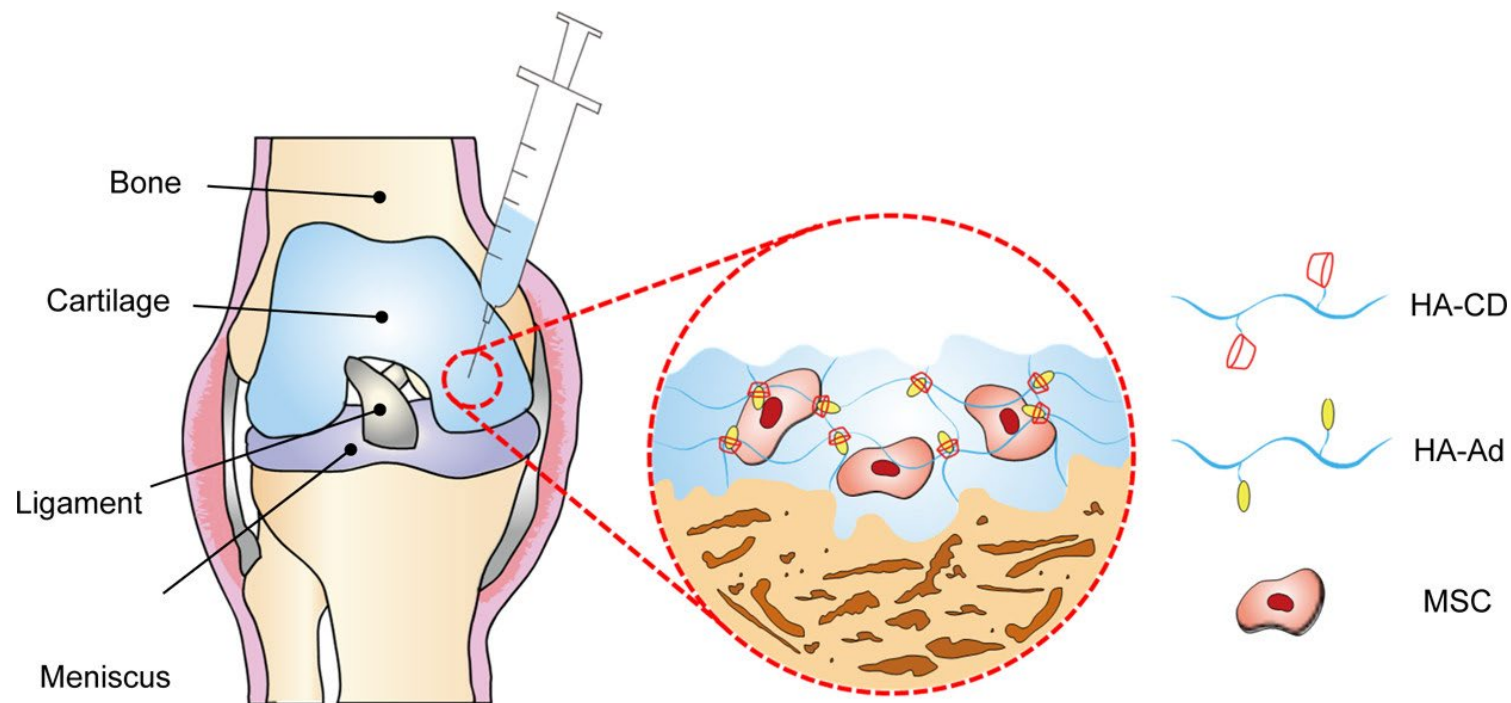
Mechanically tunable conductive interpenetrating network hydrogels that mimic the elastic moduli of biological tissue. Nature Communications 9, 2740 (2018).



- ・多段階架橋によるIPNゲル：PEDOTとPolystyrene sulfateの π - π スタッキングにより物理架橋を形成 (第一ネットワーク)
- アクリル酸 (AAc) のラジカル重合によりポリアクリル酸を形成 (第二ネットワーク)
- ・電気伝導性とイオン電導性を二重に備えた高導電性ゲルである。
- ・IPN構造であり、第一ネットワークが物理架橋、第二ネットワークが化学架橋により構成されている点が本研究と同一。
- ・架橋反応が多段階であり重合開始剤を必要とする点で本研究と異なる。

有力な競合技術②

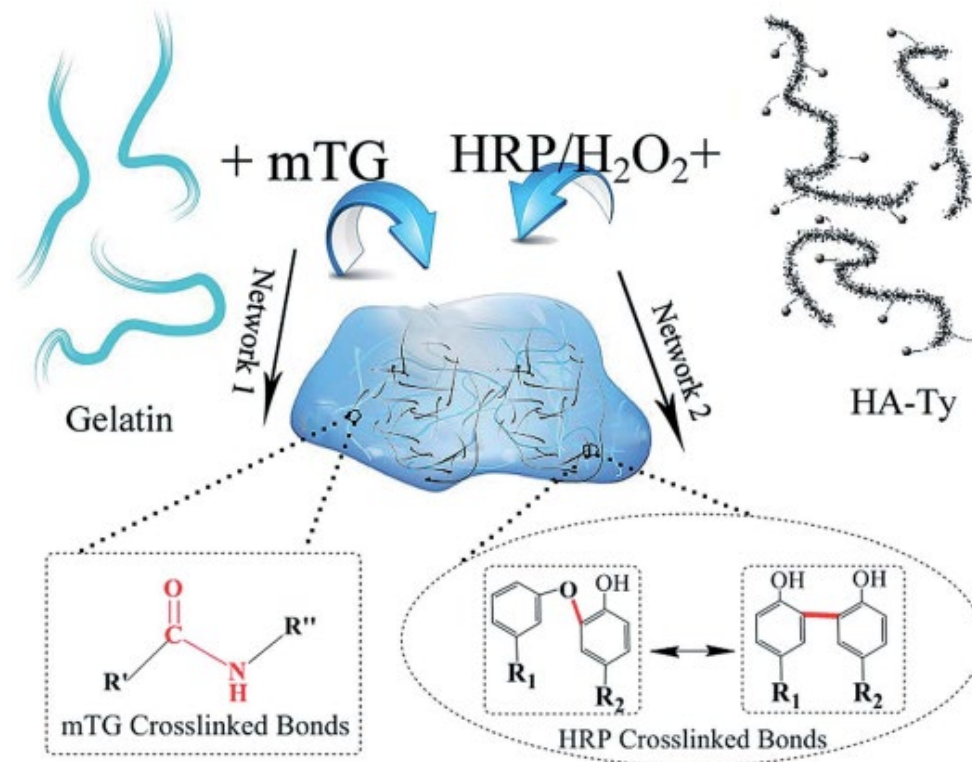
Supramolecular Injectable Hyaluronate Hydrogels for Cartilage Tissue Regeneration.
ACS Applied Bio Materials 2020, 3, 8, 5040-5047. DOI: 10.1021/acsabm.0c00537



- ・ホスト-ゲスト相互作用により架橋した自己修復性ゲル:シクロデキストラン (CD) 内にアダマンタン (Ad) が物理的相互作用により取り込まれることでゲル化
- ・可逆的結合であり自己修復性を有する点、材料にヒアルロン酸を用いている点が本発明と同一である。
- ・毒性を引き起こす可能性のある化学結合や外部刺激が不要で、生体への高い安全性を有する。
- ・物理架橋による単一ネットワーク構造であり、IPN構造でない点で本研究と異なる。

有力な競合技術③

Bienzymatically crosslinked gelatin/hyaluronic acid interpenetrating network hydrogels: preparation and characterization. RSC Adv, 2015, 5, 1929-1936. DOI: 10.1039/c4ra12446d



- 酵素的架橋によるIPNゲル: ゼラチンはトランスグルタミナーゼによる酵素反応で化学的に架橋される(40分、第1ネットワーク)。ヒアルロン酸-チラミン結合体はペルオキシダーゼと過酸化水素による酵素反応で化学的に架橋される(数分、第2ネットワーク)
- ネットワークが相互侵入高分子網目構造(IPN)という点で本発明と同一である
- 酵素反応による架橋であることに加えて、自己修復性を持たないという点で本発明と異なる
- **細胞共存化でのゲル化の際に、酵素反応による細胞毒性が生じる可能性**

有力な競合技術④

VitroGel Hydrogel



架橋構造は物理的架橋。説明書によると糖鎖のイオン架橋ゲル。

https://bio-gems.com/media/product_pdfs/ECMs/VitroGel.pdf

<https://cdn.thewellbio.com/wp-content/uploads/2020/07/VitroGel-FAQ.pdf>

- 二次元/三次元培養可能なアニマルフリーなハイドロゲル。
- 三次元細胞培養後に、[VitroGel® Cell Recovery Solution](#) を添加し、通常の遠心分離で細胞を回収。
- *in vivo*へのインジェクションが可能。
- 架橋構造がIPNではないという点で本発明と異なる。

helps to release the ionic molecules from the hydrogel matrix, converting the solid hydrogel back to the soft hydrogel state.

本発明の優位性 比較表

	本発明	競合技術1	競合技術2	競合技術3
構成	<ul style="list-style-type: none"> ・RADA16とHAのヒドラゾン結合からなるIPNゲル 	<ul style="list-style-type: none"> ・π-π相互作用でPEDOT:PSS構造 ・ラジカル重合でPAAを形成するIPNゲル 	<ul style="list-style-type: none"> ・ホスト-ゲスト相互作用による自己修復性ヒアルロン酸ゲル ・単一ネットワーク 	<ul style="list-style-type: none"> ・ゼラチン及びチラミン結合HAが酵素反応により架橋されるIPNゲル
得られる特性	<ul style="list-style-type: none"> ・長期に渡る構造安定性 ・自己修復性 ・細胞内包ゲルの状態で注射可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・高伝導性 ・機械的特性を高度に調整可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・自己修復性 ・せん断減粘性 ・高い細胞適合性 	<ul style="list-style-type: none"> ・IPN化による強度向上 ・良好な細胞拡散と増殖
適用分野	<ul style="list-style-type: none"> ・再生医療(軟骨, 皮膚等)における足場材料 ・細胞内包インジェクト材料 	<ul style="list-style-type: none"> ・生体への装着・移植可能デバイス 	<ul style="list-style-type: none"> ・再生医療における足場材料 	<ul style="list-style-type: none"> ・再生医療及び創傷被覆材料
その他	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞の保管及び輸送 	<ul style="list-style-type: none"> ・第2ネットワーク(PAA)の形成に重合開始剤と加熱が必要 	<ul style="list-style-type: none"> ・単一成分の物理架橋ゲル 	<ul style="list-style-type: none"> ・過酸化水素を使ったゲル化、細胞毒性の懸念

従来技術とその問題点

間葉系幹細胞を用いる再生医療に期待が集まっているが、生体で見られる複雑で階層的な細胞外基質(ECM)を再現した細胞足場の提供は現状では不可能であり、生体内生着率が低いことが課題となっている。近年、我々はECMを模倣した材料として、相互侵入高分子網目構造(IPN)を有するハイドロゲルを前例のない方法によりOne-Pot合成できる経路を確立した。実際、細胞毒性となるラジカル発生などの余分な架橋刺激が不要なインジェクタブル性を持ち、MSCの生着率向上と凝集塊形成による関節特有の硝子軟骨への選択的分化が明らかとなった。しかし、注射投与という外科的処置に伴う炎症反応により、その幹細胞特有の遊走と凝集塊形成、組織再生能力が消失する点は未だに課題である。実際の細胞注入プロセスにおいて、機械的な細胞膜の摩擦破壊が生着率の著しい急性損失をもたらすことが報告されている (Brian A. A. et al. Tissue Eng. Part A 2012)。

このような損傷力から細胞を保護する戦略として、我々は、特定の注入力において、摩擦緩和を示すハイドロゲル内に細胞をカプセル化すると、アポトーシスを減少させ生着率が著しく向上するという仮説を立てた。実際、動的化学結合の一種であり、高い安定性を有するヒドラゾン結合でヒアルロン酸 (HA)を架橋した自己修復性HA-IPNゲルとすると、剪断速度増加に対する粘度が急速低下 (=シアニング) し、高い細胞生着率が維持された。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、細胞注入プロセスにおける機械的な細胞膜の摩擦破壊による生存率の著しい急性損失を改良することに成功した。
- 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、簡便かつ非侵襲的にone-pot合成できる合成経路の確立に成功した。
- 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、それに続くヒアルロン酸とポリエチレングリコールの動的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。

想定される用途

- 注射器を用いる細胞移植において、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。
- 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。
- 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。
- 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。

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に**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、再生医療には細胞成長因子が不可欠なため、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。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術はゲル前駆体の冷蔵保存が可能のため、キット化することでより企業に貢献できると考えている。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- 本格導入にあたっての技術指導等

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ハイドロゲル、及びハイドロゲルを形成するための組成物
- 出願番号 : 特願2023-070135(2023-04-21 出願), PCT/JP2024/000752(2024-01-15 出願)
- 出願人 : 学校法人東京理科大学[100%]
- 発明者 : 大塚英典, 大澤重仁, 山村明未

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

TEL 03-5228-7440

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