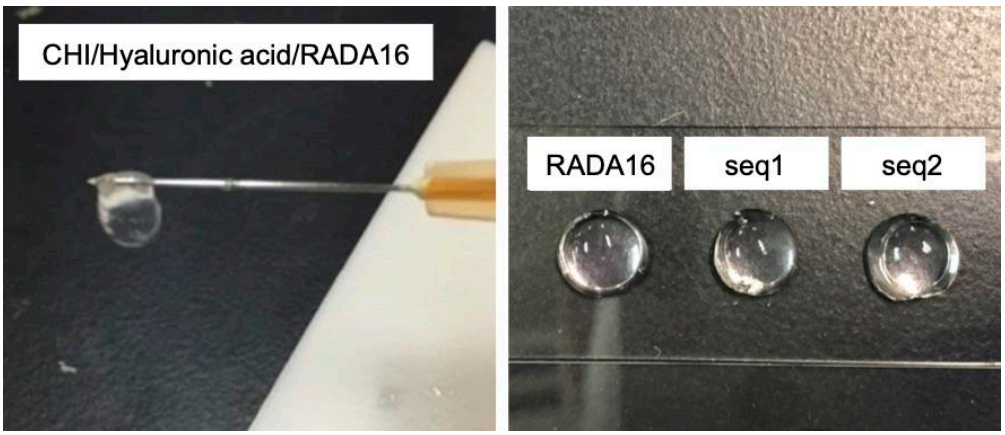
188　新規高分子網目設計に基づく幹細胞分化誘導足場の開発	飯島　一智

【目的】再生医療の実現のためには幹細胞を高効率かつ特異的に特定の組織に分化誘導する技術が不可欠であり、細胞足場材料による分化制御法が注目を集めている。細胞足場材料が幹細胞の分化特性に影響を与える主な因子として、1. 弾性率、2. 細胞周囲微小環境、3. 担持生理活性分子、が挙げられる。しかし弾性率と細胞周囲環境は相関しており、単一成分からなるゲルではそれぞれを最適化することは困難であった。本研究では、弾性率と細胞周辺環境をそれぞれ制御可能な相互侵入高分子網目ゲルシステムを用い、種々のゲルを作製して間葉系幹細胞の分化に与える影響を明らかにすることで、分化を制御可能な足場材料の開発を目的とした。具体的には、1. 弾性率を調節可能で生分解性を有するグリコサミノグリカン／キトサンを力学ネットワークとしたゲルの作製、2. 多様な自己会合性ペプチドからなるゲルを作製と間葉系幹細胞の分化に与える影響の解明、を行った。

【方法】コンドロイチン硫酸 C およびヒアルロン酸の過ヨウ素酸酸化によりグリコサミノグリカンジアルデヒドを得た。自己会合性ペプチドとしてはすでに自己会合性を示すことが報告されている seq1 ペプチドおよび seq2 ペプチドを用いた。ゲルは、キトサン溶液へ NHS 化ポリエチレングリコールまたはグリコサミノグリカンジアルデヒド溶液、自己会合性ペプチド溶液を順に加え、混合することで作製した。ゲル内でヒト骨髄由来間葉系幹細胞の骨分化および軟骨分化を誘導し、各種マーカー遺伝子の発現より分化特性を評価した。

【結果】グリコサミノグリカンジアルデヒド、キトサン、RADA16 ペプチドより透明のハイドロゲルが形成され、力学強度をもたらす化学架橋ネットワークとしてキトサン／グリコサミノグリカンネットワークも利用可能であることが示された。過ヨウ素酸量により酸化率が制御可能であることも確認し、弾性率を制御可能なゲルの構築に道筋と立てた。一方、seq1 ペプチドおよび seq2 ペプチドを用いた場合も RADA16 と同様のゲル化挙動がみられた。次に、自己会合性ペプチドがヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分化挙動に与える影響を調べた。軟骨分化において、seq2 を用いたゲルでは RADA16 を用いたゲルと比較して関節軟骨を構成する硝子軟骨のマーカー遺伝子 *COL2A1* の発現が 30 倍ほど高く、軟骨再生において有用なゲルとなる可能性が示唆された。以上より、相互侵入高分子網目ゲルを構成する自己会合性ペプチドの種類により間葉系幹細胞の軟骨分化挙動が大きく変化することが明らかになった。間葉系幹細胞の分化を制御可能な本ゲルシステムを利用することで、MSC を用いた各種組織への分化誘導技術の確立が期待される。

本研究において作製したゲルの巨視像



188. 新規高分子網目設計に基づく幹細胞分化誘導足場の開発

飯島　一智

横浜国立大学 大学院工学研究院 機能の創生部門 医工学研究室

Key words：細胞足場，間葉系幹細胞，再生医療，ペプチド，多糖

緒　言

再生医療の実現のためには幹細胞を高効率かつ特異的に特定の組織に分化誘導する技術が不可欠である。中でも遺伝子導入などを必要とせず、移植先に合わせて任意の形状に成形できることから、細胞足場材料による分化制御法が注目されている。細胞足場材料が幹細胞の分化特性に影響を与える主な因子として、1. 弾性率、2. 細胞周囲微小環境、3. 担持生理活性分子、が挙げられる。例えば、足場材料の弾性率は間葉系幹細胞（MSC）の分化方向を決定し、弾性率の高い順に骨、筋、神経への分化が促進される［1］。また細胞外マトリックス（ECM）構造を形態的に模倣した自己会合性ペプチド足場材料では軟骨分化が促進することが報告されている［2］。さらに、足場中に担持された生理活性分子による分化制御手法も開発されている［3］。しかし弾性率と細胞周囲環境は相関しており、単一成分からなるゲルではそれぞれを最適化することは困難であった。

一方、力学強度網目と細胞周囲微小環境網目という独立した2種類の網目から構成される相互侵入高分子網目（IPN）ゲルはそれぞれを制御可能である（図 1）。例えば、自己会合性ペプチド RADA16（Ac-RADARADARADARADA-$CONH_2$）、天然由来多糖のキトサン（CHI）、ポリエチレングリコール（PEG）の3成分で形成されるゲルは、RADA16 が細胞外マトリックスの構造を模倣することで細胞の高機能化を、CHI／PEG 網目が力学特性をもたらす。本ゲルは軟骨細胞の細胞足場として優れた機能を示した［4］。さらに CHI／PEG／RADA16 ゲル内でヒト骨髄由来 MSC の軟骨分化を誘導すると、従来のスフェロイド法などと比較して顕著に高いⅡ型コラーゲン遺伝子の発現が見られ、より高効率に間接軟骨本来の硝子軟骨が誘導されることがわかった（論文未発表）。IPN ゲルを構成する各網目のそれぞれの最適化による MSC の分化制御の可能性が示唆された。

本研究では、弾性率と細胞周辺環境をそれぞれ変化させた種々のゲルを作製し、MSC の分化に与える影響を明らかにすることで、MSC の分化を制御可能な足場材料の開発を目的とした。具体的には、弾性率を調節可能で生分解性を有するグリコサミノグリカン／CHI を力学ネットワークとしたゲル、および、多様な自己会合性ペプチドからなるゲルを作製し、MSC からの各細胞系列への分化挙動を解析した。

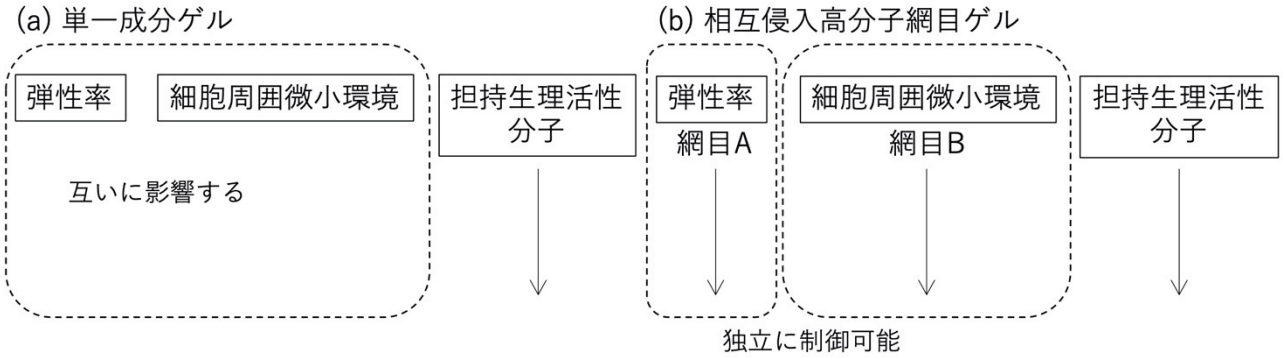


図 1. 本研究のコンセプト

独立に制御可能な複数のネットワークからなるゲルを作製し、MSC の分化への影響を解析した。

方　法

1. NHS 化 PEG とグリコサミノグリカンアルデヒドの合成

NHS 化 PEG は文献に従い合成した［4］。グリコサミノグリカンジアルデヒドは文献［5］を参考に以下の通り合成した（図 2)。コンドロイチン硫酸 C、ヒアルロン酸水溶液に過ヨウ素酸ナトリウムを加え、スターラーで攪拌を行った。その後、暗所下、室温で 6 時間反応を行った。反応後、蒸留水に対して透析を 4 日間行った。硝酸銀水溶液を用いて過ヨウ素酸ナトリウムが残存していないことを確認した後、凍結乾燥により粉末を得た。

2. 自己会合性ペプチドの選択

本研究では自己会合性ペプチドとして、RADA16 以外にすでに自己会合性を示すことが報告されている seq1 ペプチドおよび seq2 ペプチドを用いた。seq1 ペプチドおよび seq2 ペプチドは受託合成品（純度＞80%）を用いた。

3. ゲルの作製

ミクロチューブ内に CHI 溶液を入れ、NHS 化 PEG またはグリコサミノグリカンジアルデヒド溶液、自己会合性ペプチド溶液を順に加え、混合し、37℃にて静置することでゲルを作製した。

4. 細胞担持ゲルの作製と分化誘導

細胞はヒト骨髄由来 MSC を用いた。MSC はあらかじめ CHI 溶液に懸濁させ、以降の操作は 3 と同様に行った。ゲルを作製後、通常培地を加えて 37℃、5%CO_2下で 2 日間前培養を行った。その後、通常培地および分化培地に交換し、骨分化の場合は 14 日、軟骨分化の場合は 30 日培養を行った。

5. 遺伝子発現解析

培養終了後の細胞よりトータル RNA を抽出し、cDNA を合成した。リアルタイム PCR を用い、*GAPDH* をコントロールとして用いたΔ ΔCt 法により各種マーカー遺伝子の発現を解析した。マーカー遺伝子として、骨分化では *RUNX2* および *Osteocalcin（OCN)*、軟骨分化では *COL1A1*、*COL2A1*、*COL10A1*、*Aggrecan（ACN)*、*SOX9* をそれぞれ用いた。

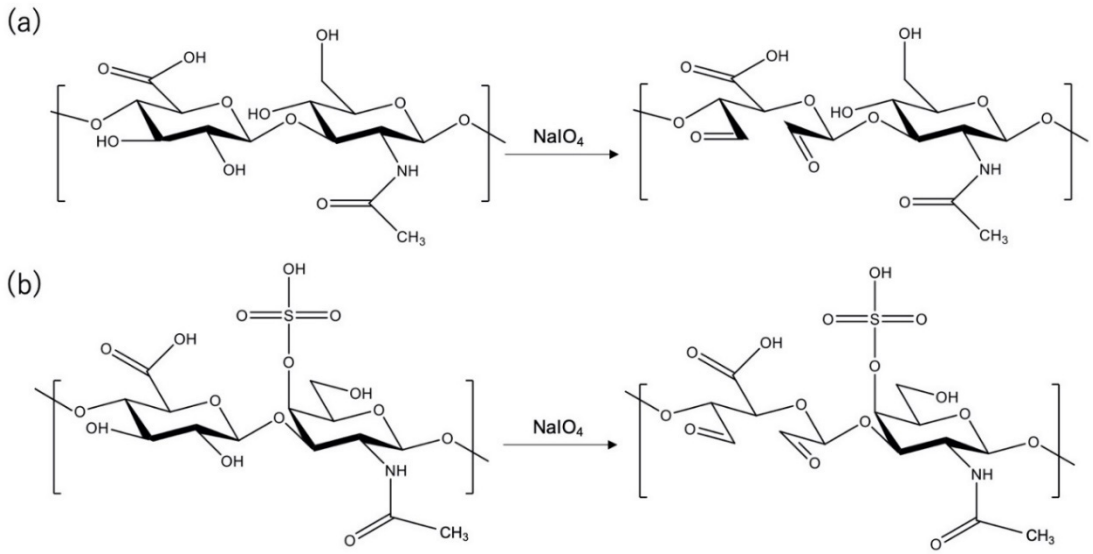


図 2. グリコサミノグリカンジアルデヒドの合成
ヒアルロン酸（a）およびコンドロイチン硫酸 C（b）を過ヨウ素酸ナトリウムにより酸化し、
それぞれのジアルデヒド体を合成した。

結果および考察

1. CHI／グリコサミノグリカン／RADA16 ゲルの作製

生成物は NMR、FT-IR によりキャラクタリゼーションを行い、コンドロイチン硫酸 C ジアルデヒドおよびヒアルロン酸ジアルデヒドが得られていることを確認した。次に、得られたコンドロイチン硫酸 C ジアルデヒド、ヒアルロン酸ジアルデヒドを用いて、CHI、RADA16 からなるゲルを作製した。結果、NHS 化 PEG を用いた場合と同様に透明のハイドロゲルが形成された。例として、CHI／ヒアルロン酸／RADA16 ゲルの巨視像を図 3 に示す。力学強度をもたらす化学架橋ネットワークとして CHI／グリコサミノグリカンからなるネットワークも利用可能であることがわかった。過ヨウ素酸量により酸化率も制御可能であることも確認した。酸化率の異なるグリコサミノグリカンを用いて架橋点数を制御することで、力学強度の異なるゲルを簡便に作製できる。今後、本ゲルを利用して MSC の培養を行い、その分化挙動に与える影響を明らかにする。

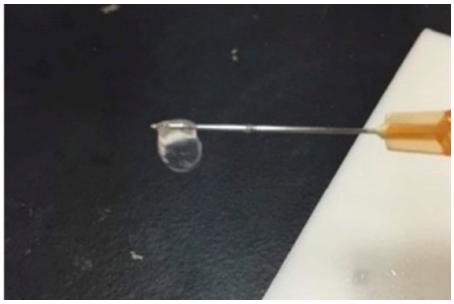


図 3. CHI／ヒアルロン酸ジアルデヒド／RADA16 ゲルの巨視像
CHI／ヒアルロン酸ジアルデヒド／RADA16 は速やかにゲル化した。

2. 種々の自己会合性ペプチドを用いたゲルの作製

seq1 ペプチドおよび seq2 ペプチドを用いて IPN ゲルを作製したところ、RADA16 と同様のゲル化挙動が確認された。ゲル化の時間や硬さにおいて目視や触診のレベルではペプチド間の差異は観察されなかった（図 4a）。また走査型電子顕微鏡観察より全てのゲルで三次元多孔質構造が確認され、構造に大きな差異はみられなかった（図 4b～d）。

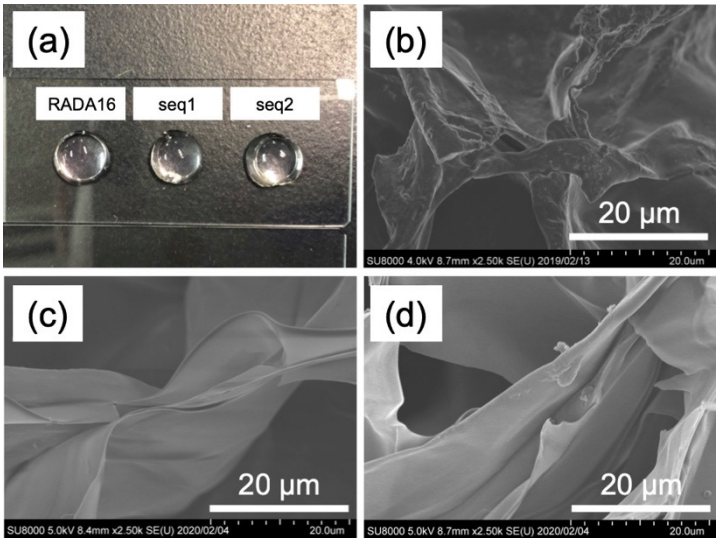


図 4. 種々の自己会合性ペプチドからなる IPN ゲル
a)　種々の自己会合性ペプチドからなる IPN ゲルの巨視像。
b～d)　種々の自己会合性ペプチドからなる IPN ゲルの走査型電子顕微鏡像。
（ b）RADA16、c）seq1、d）seq2 ）。

3. 自己会合性ペプチド成分が MSC の骨分化および軟骨分化へ与える影響

種々の自己会合性ペプチドを用いた IPN ゲルにおけるヒト骨髄由来 MSC の分化挙動を調べた。まず、骨分化挙動を解析した。骨分化の初期マーカーである *RUNX2*（図 5a）および中期・後期マーカーである *Osteocalcin*（図 5b）の発現において、IPN 構造を構築する自己会合性ペプチドによる差異はほとんど見られなかった。これより、骨分化において自己会合性ペプチドは細胞に対して同様に振る舞うことがわかった。

次に、軟骨分化挙動に与える影響を調べた。まず関節軟骨を構成する硝子軟骨のマーカー遺伝子 *COL2A1* に注目すると、RADA16 を用いたゲルと比較して seq2 を用いたゲルでは発現量が 30 倍ほど高く（p-value＜0.05）、seq1 では有意差は得られなかったものの約 8 倍高かった。seq2 ペプチドを用いたゲルで誘導された軟骨は RADA16 を用いたゲルで誘導されたものと比較してより特に硝子軟骨性が高く、関節軟骨再生において有用なゲルとなる可能性が示唆された。一方、線維軟骨マーカー*COL1A1* では、自己会合性ペプチドの種類による大きな差はなく、スフェロイドと比較して線維軟骨化が抑制された RADA16 と同程度であった。一方、肥大軟骨マーカー*COL10A1* は seq1 において発現量が低く、肥大軟骨化が抑制されていることが示唆された。*ACN* および *SOX9* には大きな差は認めなかった。以上より、IPN ゲルを構成する自己会合性ペプチドの種類により MSC の軟骨分化挙動が大きく変化することが明らかになった。

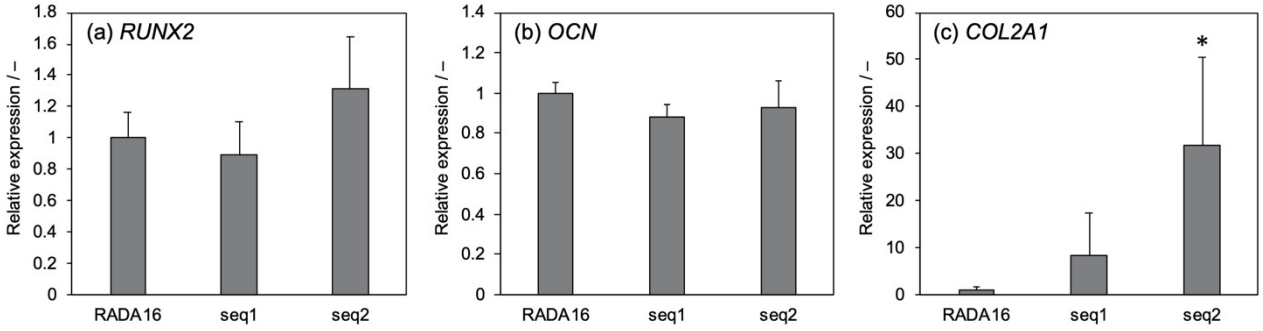


図 5. 種々の自己会合性ペプチドからなる IPN ゲルにおける MSC の分化

a) 骨分化 14 日目の *RUNX2* 発現。

b) 骨分化 14 日目の *Osteocalcin*（*OCN*）発現。

c) 軟骨分化 30 日目の *COL2A1* 発現。

p-value＜0.05（student's t-test）。

本研究では、新たに CHI／グリコサミノグリカンを力学ネットワークとしたゲルの作製に成功し、弾性率を制御可能なゲルの構築に道筋と立てるとともに、細胞周辺環境をもたらす自己会合性ペプチドが MSC の分化に与える影響を明らかにした。MSC の分化を制御可能な本ゲルシステムを利用することで、MSC を用いた各種組織への分化誘導技術の確立が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜国立大学医工学研究室の竹中康祐、山内一輝である。

文　献

1) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell. 2006 Aug 25;126(4):677-89. PMID: 16923388 DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.044.

2) Hauser CA, Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber biological materials. Chem Soc Rev. 2010 Aug;39(8):2780-90. Epub 2010 Jun 3. PMID: 20520907 DOI: 10.1039/b921448h.

3) Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. Genes Dis. 2016 Mar;3(1):56-71. Epub 2015 Oct 17. PMID: 27239485 DOI: 10.1016/j.gendis.2015.09.004.

4) Ishikawa S, Iijima K, Matsukuma D, Asawa Y, Hoshi K, Osawa S, Otsuka H. Interpenetrating polymer network hydrogels via a one-pot and in situ gelation system based on peptide self-assembly and orthogonal cross-linking for tissue regeneration. Chem Mater. 2020, 2020 Feb;32(6);2353-64. DOI:10.1021/acs.chemmater.9b04725.

5) Li L, Wang N, Jin X, Deng R, Nie S, Sun L, Wu Q, Wei Y, Gong C. Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention. Biomaterials. 2014 Apr;35(12):3903-17. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24507411 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.050.