

191. 1 液型超分子インジェクタブルゲルによる組織再生

西口 昭広

物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点 ポリマー・バイオ分野

Key words : 再生医療, 組織再生, 超分子化学, インジェクタブルゲル, チキソトロピー

緒言

再生医療とは、機能不全に陥った臓器を患者自身の細胞を移植することで再生する治療法であり、慢性的なドナー不足に陥っている臓器移植に代わる革新的な治療法として注目されている。一方で、現状の細胞移植の多くが、細胞懸濁液を注入する細胞移植であり、送達効率が非常に低い。例えば、心筋細胞の懸濁液を心臓に注入した場合には、移植効率はわずか20%である [1]。細胞生着率を向上させる手法として、シリンジで注入可能なゲル（インジェクタブルゲル）による細胞送達技術が注目されている。これまでにフィブリンや化学反応型の材料を用いた細胞移植が報告されているが「2」、組織接着性と生体適合性、操作性を兼ね備えた材料の開発には至っていない。

本研究では、超分子からなるインジェクタブルゲル（超分子インジェクタブルゲル）を開発し、細胞移植時の生着率と治療効果を飛躍的に向上させるための基盤技術を確立することを目的とした（図1） [3]。損傷した組織に対して、細胞単独ではなく、超分子インジェクタブルゲルを用いて細胞を送達することで生着率を向上させる。我々は、超分子バイオマテリアル工学に基づいた独自技術によって、ブタ腱由来ゼラチンにウレイドピリミジノン (UPy) 基を修飾した UPy ゼラチンを新規に合成し、超分子インジェクタブルゲルを形成することを報告している [4]。このゲルは、可逆的な物理結合である水素結合を架橋点としている。そのため、本材料は、応力負荷によって粘性が低下しゲル化（結合の解離）することで容易に注入でき、注入後は再びゲル化し組織に接着（結合の再形成）するため、細胞毒性の高い架橋剤を使用しない1液型インジェクタブルゲルとして細胞を送達できると期待される。

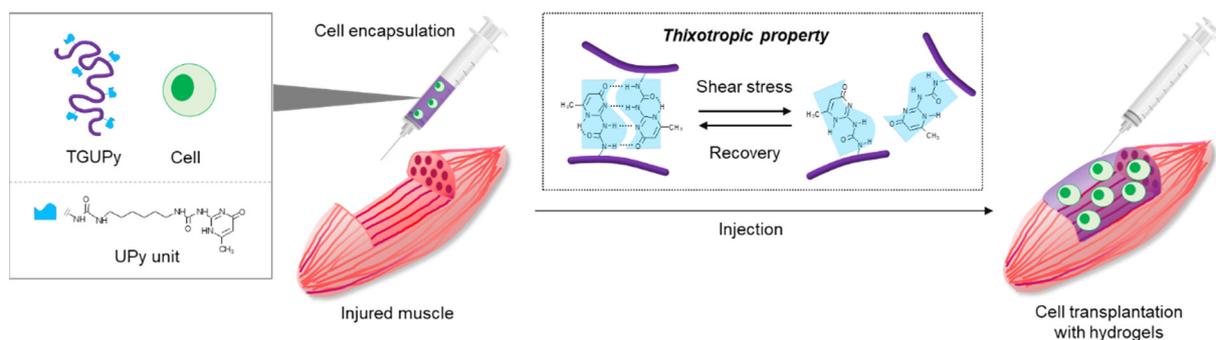


図1. 超分子インジェクタブルゲルのイメージ

チキソトロピー性を有するインジェクタブルゲルに細胞を内包し、インジェクションによって1液型として組織欠損に注入することで、組織再生を促す。

方法

1. 超分子インジェクタブルゲルの作製と粘弾性評価

ブタ腱由来ゼラチンに対して、末端にイソシアネート基を有する UPy 基を化学修飾することで、UPy ゼラチンを合成した。核磁気共鳴スペクトル測定を行うことによって、ゼラチンへの UPy 基の導入を確認した。また、UPy ゼラチンをリン酸緩衝食塩水 (PBS) に溶解し、粘弾特性をレオメーターで評価した。せん断速度変化に対する粘度変化や異なるひずみを負荷した際の弾性率変化を測定し、ゲルとしての粘弾特性を評価した。また、圧縮試験機を用いて、ゲルのインジェクタビリティーを測定した。

2. 細胞培養試験による細胞適合性評価

マウス筋芽細胞 (C2C12 細胞) を 37°C でピペッティングすることで、超分子インジェクタブルゲル中に内包し、37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した。タイムラプス観察および蛍光顕微鏡観察を行うことで細胞適合性と細胞接着性の評価を行った。

3. 生分解性評価と筋組織損傷モデルへの移植試験

マウス皮下に超分子インジェクタブルゲルを埋植し、*in vivo* イメージングシステム (IVIS) によって、経時的な分解挙動を評価した。筋組織損傷モデルとして、大腿四頭筋に創部を作製した volumetric muscle loss (VML) モデルを用いた。マウス筋芽細胞を超分子インジェクタブルゲルに内包し、VML モデルに移植した。IVIS によって細胞生着を観察した。

結果および考察

1. 超分子インジェクタブルゲルのチキソトロピー特性

超分子インジェクタブルゲルのチキソトロピー性を粘弾性測定によって評価した結果、せん断粘度はせん断速度の増加とともに減少し、せん断応力は増加することがわかった。また、周期的にひずみを変化させて弾性率を測定したところ、ゲルは 1% ひずみでゲルを形成し ($G' > G''$)、300% のひずみでゾル状態になり ($G' < G''$)、ひずみが 1% に戻るとゲルは G' を回復した (図 2)。これは、せん断応力を除去された際に UPy 基の間で分子間水素結合が再形成され、物理架橋が形成されたためであると考察される。これらの結果より、超分子インジェクタブルゲルは、チキソトロピー性を有していることが示された。実際、ゲルのインジェクタビリティーを評価したところ、ゲルは 37°C で 80% 以上のインジェクタビリティーを有することが示された。超分子的に架橋された本ゲルは、体温でインジェクション可能であり、細胞移植のための送達キャリアとして使用できることが示された。

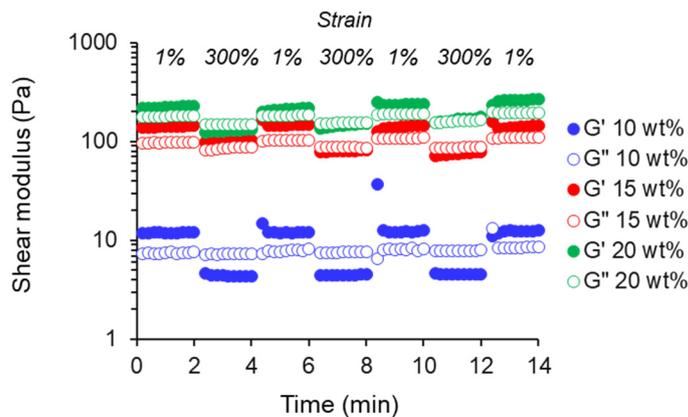


図 2. 超分子インジェクタブルゲルのチキソトロピー性
ひずみの変化に対して、ゲルはせん断弾性率を回復した。

2. TGUPy ハイドロゲル中の細胞モルフォロジー

マウス筋芽細胞である C2C12 細胞をゲルに内包して培養したところ、UPy ゼラチンの濃度に依存して、細胞はゲルに良好に接着し、伸展している様子が確認された (図 3a)。アクチン染色した細胞の蛍光顕微鏡観察結果を定量したところ、ポリスチレンプレートの上で 2 次元培養された細胞と比較して、アスペクト比が増大していることが示された (図 3b)。本ゲルは細胞の接着、伸展、遊走に適しており、再生医療における足場材料として有用であった。

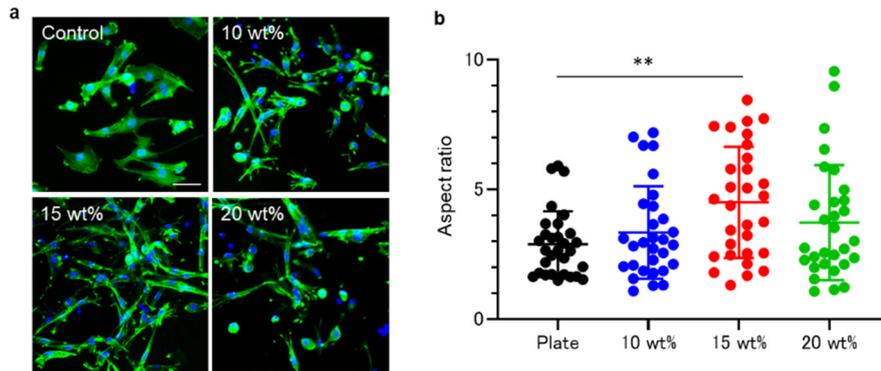


図 3. 超分子インジェクタブルゲルの細胞接着性

- a) ゲルに内包したマウス筋芽細胞の蛍光顕微鏡画像。スケールバー：50 μ m。
 b) アスペクト比。** $P < 0.01$ 、Tukey's multiple comparison post hoc test.

3. ハイドロゲルを用いた細胞移植

ハイドロゲルの生体内での分解挙動を、IVIS によって評価したところ、ゲルは 3 日目から分解され始め、7 日後にはほぼ消失していた。また、ゲルが欠損部に細胞を送達し、細胞増殖をサポートするかどうかを調べるために、ルシフェラーゼ発現 C2C12 細胞を VML モデルマウスに移植した。VML モデルは、大腿四頭筋を解剖し、回復不能な体積の筋欠損を引き起こすことによって作製した。ゲルを用いて移植した C2C12 細胞は、VML の欠損部に生着し、組織内で増殖することが分かった (図 4)。この結果は、ゲルが生体内の環境で細胞の接着や増殖のための足場として機能することを示している。

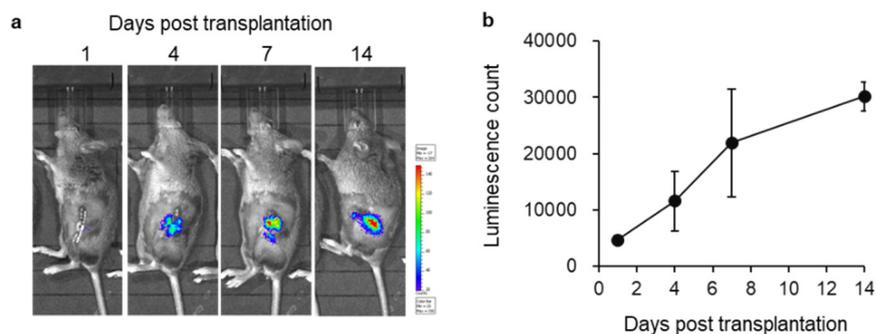


図 4. 超分子インジェクタブルゲルの VML への移植試験

- a) 移植した筋芽細胞の IVIS による観察。
 b) 細胞の発光強度の定量。

本研究では、再生医療用の超分子インジェクタブルゲルを開発し、そのチキソトロピー性・インジェクタビリティ・水中安定性・細胞接着性・生分解性・組織移植について報告した。本ハイドロゲルは、細胞だけでなく薬剤の局所デリバリー担体として、組織工学や再生医療の発展に貢献すると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は、上原記念生命科学財団の助成および日本学術振興会科学研究費補助金（22H03962）を受けて遂行しました。

文 献

- 1) Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp J R, Smolenski R T, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppen S R, Partridge T A, Yacoub M H. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J.* 2004 Jul;18(10):1153-5. Epub 2004 May 20. PMID: 15155562 DOI: 10.1096/fj.03-1308fje
- 2) Wang J, Zhang F, Tsang W P, Wan C, Wu C. Fabrication of injectable high strength hydrogel based on 4-arm star PEG for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2017 Mar;120:11-21. Epub 2016 Dec 20. PMID: 28024231 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.12.015
- 3) Nishiguchi A, Taguchi T. Engineering thixotropic supramolecular gelatin-based hydrogel as an injectable scaffold for cell transplantation. *Biomed Mater.* 2022 Dec 5;18(1). PMID: 36541468 DOI: 10.1088/1748-605X/aca501
- 4) Nishiguchi A, Ichimaru H, Ito S, Nagasaka K, Taguchi T. Hotmelt tissue adhesive with supramolecularly-controlled sol-gel transition for preventing postoperative abdominal adhesion. *Acta Biomater.* 2022 Jul 1;146:80-93. Epub 2022 Apr 30. PMID: 35500814 DOI: 10.1016/j.actbio.2022.04.037