

B217 酵素反応により得られるヒドロゲルを利用した再生医療用技術の開発

(九大院工・化工) ○(正)境 慎司*・(正)川上 幸衛

【緒言】 再生医療分野においては、高い含水率がもたらす細胞や生体との高い親和性により多くのヒドロゲルが研究されてきた。一般に、それらのヒドロゲルは高分子水溶液をゲル化させることによって作製されており、そのゲル化にはさまざまな方法が用いられている。そのなかでも、最近、酵素を利用したヒドロゲル作製法が、グルタルアルデヒドなどの化学的な架橋剤を使用する方法と比べて細胞や生体に対しても穏和な条件下で適用可能であることから注目を集めている。本研究では、分子中にフェノール性水酸基を導入することで、ペルオキシダーゼの酵素反応を利用して細胞や生体に穏和な条件で数秒～数十秒でゲル化させることができ多糖やタンパク質の誘導体を作製し、細胞シートの作製やスフェロイドの作製、生体内での組織の再生などに利用する検討を行っているのでその結果を報告する。

【実験方法】 水溶性カルボジイミドおよびN-ヒドロキシコハク酸イミドを用いてチラミン塩酸塩との脱水縮合反応により、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびゼラチンにフェノール性水酸基を付与した（それぞれ Alg-Ph, CMC-Ph, Gelatin-Ph と表記）。

細胞シートの作製 Krebs Ringer Hepes (KRH) 緩衝液に CMC-Ph を溶解した後、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) ならびに H_2O_2 を溶解させた KRH 緩衝液と最終濃度がそれぞれ 0.75% (w/v)、5 units/mL, 25 mM となるように混合後、細胞培養ディッシュ上に混合液を注いでゲルシートを作製した。洗浄後、L929 繊維芽細胞を播種し培養した。コンフルエントになった後、セルラーゼ (5 units/mL) 含有培地に浸した。

細胞スフェロイドの作製 HRP および細胞を分散させた CMC-Ph 溶液を 26G の注射針から過酸化水素を溶解させた層流の流動パラフィン流中に押し出すことで直径約 150 μm の CMC-Ph ゲルビーズを作製した。このゲルビーズを HRP を溶解させた Alg-Ph 溶液に分散した後、再度過酸化水素を溶解させた層流の流動パラフィン流中に押し出し、CMC-Ph ゲルビーズを Alg-Ph ゲルで被覆した。その後、セルラーゼ (1.0 mg/mL) を含む培地に浸することで内部の CMC-Ph ゲルビーズを分解し、球状組織体の鋳型となる中空空間を作製した。27 日間の培養後、アルギン酸リーゼ (0.2 mg/mL) を含む培地に浸してアルギン酸ゲルを分解した。

生体内での *in situ* ゲル化 HRP (1 unit/ml) を溶解させた Gelatin-Ph (3% (w/v)) 溶液を 1/10 体積量の過酸化水素溶液 (10 mM) と混合後、ゲル化する前に DDY マウスの皮下に注入し、皮下注入部でゲル化させた。1 週間後にこのマウスを斃死させ、ゲルと周辺組織を回収した。

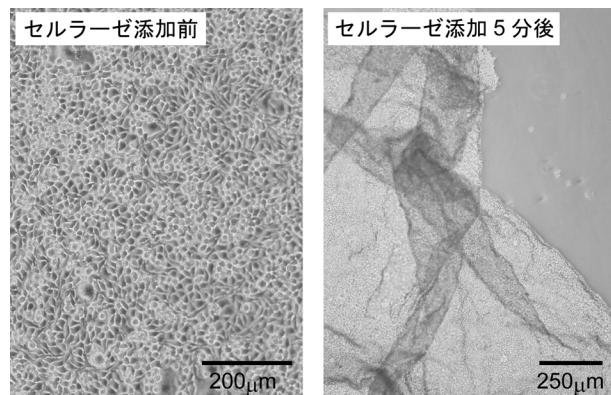


図 1. CMC-Ph ゲル上で得られたコンフルエント状態（左）と剥離した細胞シート（右）。

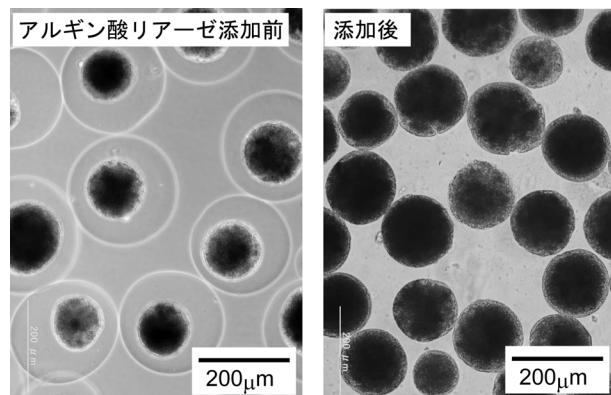


図 2. Alg-Ph カプセル内にある細胞組織体（左）と回収された球状組織体（右）。

【結果と考察】 CMC-Ph ゲル上では細胞が細胞培養皿上とほぼ同じ増殖挙動を示し、コンフルエントとなった。その後、セルラーゼで CMC-Ph を分解すると数分で細胞シートを回収することができた（図 1）。この細胞シートは新しい培養皿に移動させると数十分で培養皿に付着したことから CMC-Ph ゲルの新しい細胞シート作製基材としての可能性が示された。CMC-Ph ゲルビーズを鋳型として作製された Alg-Ph カプセルの中空空間に包括された細胞は中空径と同じサイズにまで増殖することができた。また、アルギン酸リーゼを使用することにより、数分で球状の組織体を回収することができる（図 2）、新たな球状組織体作製のためのツールとなり得ることを実証できた。マウス皮下でゲル化させた Gelatin-Ph は周囲の組織に重度な炎症反応や壊死層を発生させず、この材料ならびにゲル化プロセスの安全性の高さが示された。以上よりフェノール性水酸基を導入した多糖やタンパク質を HRP でゲル化させて得られるヒドロゲルの再生医療用材料としての有用性を実証できた。

*E-mail: sakai@chem-eng.kyushu-u.ac.jp