

生体組織の再生を誘導するスキャフォールドに関する研究

—生体吸収性繊維補強コラーゲンスポンジの特性—

学位論文内容の要旨

再生医療の分野では、今日的な話題性が高い幹細胞に注目が集まっているが、動物体のほとんどの細胞は細胞外マトリックス (ECM) に接着しており、欠損部では細胞のみならず ECM も欠如している。従って、生体組織欠損部を再生するためには、バイオマテリアルによる三次元の細胞の足場 (スキャフォールド) が必要であり、状況に応じて幹細胞や細胞増殖因子を組み合わせる。スキャフォールドの条件としては、生体親和性があること、組織再生を妨げないために生体吸収性であること、栄養や老廃物の交換、細胞侵入のために多孔構造であることが挙げられる。これまでに、生体吸収性スキャフォールドとして、ポリ乳酸やポリグリコール酸、あるいはそれらの共重合体といった合成高分子が用いられてきたが、力学的強度には優れるものの、生体吸収期間が組織再生の観点からは長すぎることに、生体親和性が天然高分子であるコラーゲンに劣るという欠点があった。一方、動物の体タンパク質であるコラーゲンは、生体親和性や吸収性に優れており、臨床応用の歴史があるものの、力学的強度が低いという欠点があった。そこで、本研究では、コラーゲンの特徴を活かしつつ、その欠点である力学的強度不足を解決するコラーゲンベースのスキャフォールドの開発を試み、以下の知見を得た。

1. ブタ由来酵素可溶化コラーゲンを用い、凍結乾燥法によりコラーゲンスポンジを作製し、*in vitro* における L929 マウス線維芽細胞への細胞接着性および *in vivo* におけるマウス背部皮下埋入による生体親和性を評価したところ、細胞および組織への優れた親和性を示した。また、コラーゲンスポンジの内部構造は、凍結速度によって気孔の大きさを制御可能であることが示された。さらに、*in vivo* での生体吸収期間は、架橋の程度によって制御が可能であることも示された。しかし、骨髓間葉系幹細胞を培養時のコラーゲンスポンジは、経時的に収縮し、背部皮下埋入時に圧縮変形することが明らかとなり、コラーゲンスポンジに力学的強度の付与さえ出来れば、優れたスキャフォールドになると考えられた。
2. コラーゲンスポンジをスキャフォールドとし、ラット由来脂肪前駆細胞および塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の組み合わせにより、ラット脂肪組織内で脂肪組織が再生誘導されるかを検討した結果、スキャフォールド周囲に脂肪前駆細胞が存在する場合は、bFGF の徐放による血管新生および細胞の増殖が必要であることが示唆された。また、bFGF には至適濃度が存在し、脂肪前駆細胞は必ずしも必要ではないことが示され、I 型コラーゲンのスキャフォールドにより組織再生が可能であることが示された。

3. コラーゲンスポンジは、細胞接着性、生体親和性を持つ組織再生誘導に適したスキャフォールドであるが、力学的強度が不足していることが上記の如く明らかになっている。そこで、生体吸収性の合成高分子であるポリグリコール酸 (PGA) を繊維状でコラーゲンスポンジに組み込み、スキャフォールドの力学的強度を *in vitro* で評価したところ、コラーゲンスポンジに PGA 繊維を入れることで圧縮弾性率が向上し、L929 マウス線維芽細胞培養時のコラーゲンスポンジの収縮が抑制され、さらに 3 週間の骨髓間葉系幹細胞の培養においても収縮を抑制することが明らかになった。また、PGA 繊維を組み込むことによっても、乾燥時の気孔構造には変化がなく、細胞の接着性が低下することもなかった。
4. 次に、PGA 繊維補強コラーゲンスポンジをマウス背部皮下に埋入し、その力学的強度を *in vivo* で評価したところ、PGA 繊維により圧縮変形は抑制され、力学的強度が向上したことが明らかとなった。加えて、PGA 繊維補強により、コラーゲンスポンジの気孔構造が埋入時にも維持され、周囲に存在する細胞はスキャフォールド内により侵入しやすいことが明らかとなった。また、マウス背部皮下での生体親和性を評価したところ、コラーゲンスポンジ中の PGA 繊維の量が増えるにともない力学的強度が向上するものの、PGA 繊維の量が多すぎると炎症反応を惹起することが明らかとなり、コラーゲンスポンジ中の PGA 繊維の量には、最適値があることが判明した。
5. コラーゲンスポンジ内の PGA 繊維の量が多すぎるとマウス背部皮下埋入時に炎症反応を惹起したことから、より少ない PGA 繊維により強度を補強をするようなスキャフォールドの開発を検討した。そのために、PGA と融点の異なるポリ乳酸 (PLLA) を用いて隣接する PGA 繊維同士を結合させることを考え、まず PLLA の溶媒と PGA 繊維の力学的強度について検討を行ったところ、ジオキサンが強度および制御性の観点から優れた PLLA の溶媒であることがわかった。次に、隣接繊維間結合 PGA 繊維をコラーゲンスポンジに組み込み、*in vitro* および *in vivo* における力学的強度を PGA 繊維補強コラーゲンスポンジと比較検討したところ、隣接繊維を結合させることによって、L929 マウス線維芽細胞培養時のスキャフォールドの収縮性を抑制し、マウス背部皮下での圧縮変形を抑制することが明らかになった。また、L929 マウス線維芽細胞への接着性を *in vitro* で評価したところ、隣接 PGA 繊維間を結合することによっても、細胞の接着性を低下させることはなかった。そして、マウス背部皮下へ埋入し、生体親和性を評価したところ、炎症反応は観察されず、同じ PGA 繊維の量であったとしても、隣接 PGA 繊維間を結合することにより、力学的強度がより高いコラーゲンスポンジとなることがわかり、生体組織の再生誘導には最適なスキャフォールドであると考えられた。

生体組織を再生誘導するためのスキャフォールドの検討を行い、上述した結果から、PGA 繊維補強コラーゲンスポンジおよび隣接繊維間結合 PGA 繊維補強コラーゲンスポンジは、コラーゲンの特徴である細胞接着性、生体吸収性、多孔構造を維持したまま、その欠点であった力学的強度の低さの問題を解決したことが本研究で証明され、今後の生体組織の再生誘導への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	中村	富美男
副査	教授	服部	昭仁
副査	准教授	西邑	隆徳
副査	准教授	福永	重治

学位論文題名

生体組織の再生を誘導するスキャフォールドに関する研究

—生体吸収性繊維補強コラーゲンスポンジの特性—

本論文は7章からなり、図46、表8、文献175を含む頁数133の和文論文であり、別に参考論文12編が添えられている。

医薬で治癒できないほど大きくて非可逆的に生体組織が欠損した場合の治療法としての再生医療が注目されているが、動物体のほとんどの細胞は細胞外マトリックス(ECM)に接着しており、欠損部では細胞のみならずECMも欠如している。従って、生体組織欠損部を再生するためには、バイオマテリアルによる三次元の細胞の足場(スキャフォールド)が必要である。スキャフォールドの条件としては、生体親和性があること、組織再生を妨げないために生体吸収性であること、栄養や老廃物の交換、細胞侵入のために多孔構造であることが挙げられる。これまでに、生体吸収性スキャフォールドとして、ポリ乳酸やポリグリコール酸、あるいはそれらの共重合体といった合成高分子が用いられてきたが、力学的強度には優れるものの、生体吸収期間が組織再生の観点からは長すぎることと、生体親和性が天然高分子であるコラーゲンに劣るという欠点があった。一方、動物の体タンパク質であるコラーゲンは、生体親和性や吸収性に優れており、臨床応用の歴史があるものの、力学的強度が低いという欠点があった。そこで、本論文では、コラーゲンの長所を活かしつつ、その欠点である力学的強度不足を解決するコラーゲンベースのスキャフォールドの開発を試み、以下の知見を得ている。

1. ブタ由来酵素可溶化コラーゲンを用い、凍結乾燥法によりコラーゲンスポンジを作製し、*in vitro*におけるL929マウス線維芽細胞への細胞接着性および*in vivo*におけるマウス背部皮下埋入による生体親和性を評価したところ、細胞および組織への優れた親和性を示した。また、コラーゲンスポンジの内

部構造は、凍結速度によって気孔の大きさを制御可能であることが示された。さらに、*in vivo* での生体吸収期間は、架橋の程度によって制御が可能であることも示された。しかし、骨髓間葉系幹細胞を培養時のコラーゲンスポンジは、経時的に収縮し、背部皮下埋入時に圧縮変形することが明らかとなり、コラーゲンスポンジに力学的強度の付与さえ出来れば、優れたスキャフォールドになると考えられた。

2. 上記の如くコラーゲンスポンジは力学的強度が不足しているので、生体吸収性の合成高分子であるポリグリコール酸 (PGA) を繊維状でコラーゲンスポンジに組み込み、スキャフォールドの力学的強度を *in vitro* で評価した。その結果、圧縮弾性率が向上し、L929 マウス線維芽細胞培養時のコラーゲンスポンジの収縮が抑制され、さらに 3 週間の骨髓間葉系幹細胞の培養においても収縮を抑制することが明らかになった。
3. 次に、PGA 繊維補強コラーゲンスポンジをマウス背部皮下に埋入して力学的強度を *in vivo* で評価したところ、圧縮変形は抑制され、加えて、コラーゲンスポンジの気孔構造が埋入時にも維持され、周囲に存在する細胞はスキャフォールド内により侵入しやすいことが明らかとなった。また、マウス背部皮下での生体親和性を評価したところ、コラーゲンスポンジ中の PGA 繊維の量が増えるにともない力学的強度が向上するものの、PGA 繊維の量が多すぎると炎症反応を惹起することが明らかとなり、コラーゲンスポンジ中の PGA 繊維の量には、最適値があることが判明した。
4. より少ない PGA 繊維でより強度を補強できるスキャフォールドを開発するために、PGA と融点の異なるポリ乳酸 (PLLA) を用いて隣接する PGA 繊維同士を結合させた。隣接繊維間結合 PGA 繊維をコラーゲンスポンジに組み込み、*in vitro* および *in vivo* における力学的強度を PGA 繊維補強コラーゲンスポンジと比較検討したところ、L929 マウス線維芽細胞培養時のスキャフォールドの収縮性を抑制し、マウス背部皮下での圧縮変形を抑制することが明らかになった。また、L929 マウス線維芽細胞への接着性を低下させることはなく、マウス背部皮下へ埋入しても炎症反応は観察されず、生体組織の再生誘導には最適なスキャフォールドであると考えられた。

以上のように、本論文は生体組織の再生を誘導するスキャフォールドとしてのコラーゲンスポンジの長所である生体親和性、細胞接着性、生体吸収性、多孔構造を維持したまま、その欠点であった力学的強度の低さは隣接繊維間を結合した PGA 繊維の組み込みによって補強可能であることを明らかにしており、この研究成果は再生医療分野における新知見として、また、畜産物の機能性を活用した新たな用途展開として高く評価される。よって、審査員一同は、平岡 陽介 が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。