

甲南大学 博士学位論文

Injectable Gel Factory システムの創成と医療応用

甲南大学大学院

フロンティアサイエンス研究科 生命化学専攻

小野 公佳

2023 年 2 月

## 目次

第1章 要旨 .....	6
第2章 緒言 .....	7
2-1 研究背景	
2-2 研究目的	
第3章 Enzyme-prodrug therapy 用「タンパク質活性保持ゲル」の開発 .....	16
3-1 序論	
3-2 実験方法	
3-2-1 試薬	
3-2-2 LP 複合ゲルの作製	
3-2-3 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの作製及び特性評価	
3-2-4 LP 複合ゲル前駆溶液に複合した $\beta$ -gal の <i>in vitro</i> 酵素活性	
3-2-5 LP 複合ゲルに複合した $\beta$ -gal の <i>in vitro</i> 酵素活性	
3-2-6 LP 複合ゲルに複合した $\beta$ -gal の <i>in vivo</i> 酵素活性	
3-2-7 LP 複合ゲル内に保持された $\beta$ -gal の定量解析	
3-2-8 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルから放出された $\beta$ -gal の <i>in vivo</i> 酵素活性	
3-2-9 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの分解特性	
3-2-10 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による <i>in vitro</i> がん細胞 死誘導効果	
3-2-11 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による長期 <i>in vitro</i> がん 細胞死誘導効果	

3-2-12  $\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による *in vivo* 抗腫瘍活性

### 3-3 結果と考察

3-3-1  $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの温度応答性、レオロジー及び構造解析

3-3-2 *In vitro* 及び *in vivo* での  $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの酵素活性

3-3-3  $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの  $\beta$ -gal 保持特性

3-3-4  $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルから放出された  $\beta$ -gal の酵素活性

3-3-5 *In vitro* 及び *in vivo* での  $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの抗腫瘍活性

### 3-4 結論

第 4 章 ゲル内にホストと物質・情報の交換が可能な血管網を形成する「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」の開発…………… 32

### 4-1 序論

### 4-2 実験方法

4-2-1 DFO/LP 複合ゲルの作製及び特性評価

4-2-2 DFO/LP 複合ゲルの DFO 放出特性評価

4-2-3 マウス筋芽細胞の生死判定

4-2-4 ヒト臍帯血管内皮細胞の環状構造形成評価

4-2-5 DFO/LP 複合ゲルの *in vivo* ゲル形成

4-2-6 DFO/LP 複合ゲルの *in vivo* 血管新生能

4-2-7 DFO/HUVEC/LP 複合ゲルの *in vivo* 血管新生能

### 4-3 結果と考察

4-3-1 DFO/LP 複合ゲルの特性評価

4-3-2 DFO/LP 複合ゲルの DFO 放出特性

4-3-3 DFO/LP 複合ゲルの細胞適合性

4-3-4 DFO/LP 複合ゲル上のヒト臍帯血管内皮細胞による環状構造形成

4-3-5 DFO/LP 複合ゲルによる *in vivo* 血管新生

4-3-6 DFO/HUVEC/LP 複合ゲルによる *in vivo* 血管新生

4-4 結論

第 5 章 ホストの組織を再建可能な「自己補給ゲル」の開発 ..... 48

5-1 序論

5-2 実験方法

5-2-1 LP 複合ゲルの作製及び特性評価

5-2-2 LP 複合ゲルの分解・吸着特性

5-2-3 LP 複合ゲルにおける細胞接着と増殖

5-2-4 レトロウイルスベクターとレトロウイルス感染

5-2-5 GFP 発現マウス筋芽細胞/LP 複合ゲルによる *in vivo* 組織形成

5-2-6 骨格筋損傷モデルマウスへの LP 複合ゲル移植

5-2-7 骨格筋損傷モデルマウスへの C2C12/LP 複合ゲル移植

5-3 結果と考察

5-3-1 LP 複合ゲルの特性評価

5-3-2 LP 複合ゲルの分解特性

5-3-3 LP 複合ゲルの ECM 吸着特性

5-3-4 LP 複合ゲルの *in vitro* 細胞適合性

5-3-5 LP 複合ゲルを用いた *in vivo* 大腿筋組織再建と機能回復

5-4 結論	
第6章 結言	63
6-1 総括	
6-2 本研究の意義	
参考文献	66
謝辞	70
業績リスト	72

## 第1章 要旨

インジェクタブルゲルは、水を溶媒とし、温度や pH などの外部刺激に応答してゾル-ゲル転移を示すことで、生体内への注射投与を可能とする生体適合性のハイドロゲルである。インジェクタブルゲルは、ゲルネットワークの網目構造によって構築される内部空間に薬剤やタンパク質、細胞などの生理活性物質を内包した状態で生体の局所に投与し、内包した物質をゲル外部環境へと放出して作用させることができる<sup>[1-4]</sup>。さらに、注射器を用いて簡便かつ低侵襲に投与可能であるため、インジェクタブルゲルは、薬物送達システム・細胞移植・組織工学などの有望な医用材料として注目を集めている (Figure 1-1)<sup>[5-8]</sup>。一方、従来のインジェクタブルゲルでは、移植細胞の低い生着率、低分子化合物 (薬剤) の初期バーストなどによる制御不能な放出、変性によるタンパク質の活性低下が生じるため、医療応用するためには、より高機能なインジェクタブルゲルを開発する必要がある。このような問題点を改善するため、様々な研究が進められているが<sup>[9-15]</sup>、依然として従来の課題点であった、担持物質の早期放出やタンパク質活性の低下、移植細胞の低い定着率などは完全に解決されていない。したがって、インジェクタブルゲル研究をさらに発展させて医療応用につなげるためには、活性を維持したまま長期的に物質を担持し、ゲル内で機能させることが可能な新しいインジェクタブルゲルを設計することが重要な課題である。

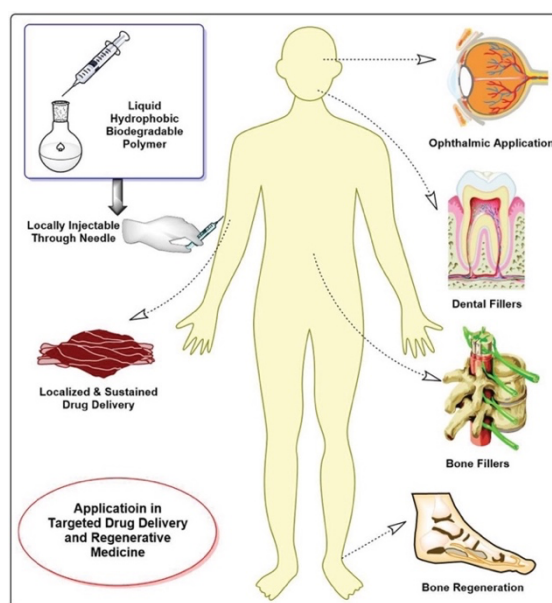


Figure 1-1 インジェクタブルゲルの応用例<sup>[8]</sup>。

本研究ではインジェクタブルゲルの「ゾル-ゲル転移を示し、様々な物質を担持可能であり、生体適合性を持つ」という特性を維持しつつ、上記の課題を解決可能なインジェクタブルゲルの開発を試みた。具体的には、従来法のようにゲルネットワークの網目構造によって構築される内部空間に生理活性物質を担持する手法とは全く異なる、「担持する生理活性物質そのものをゲルの構成成分の一つとして組み込む」という手法を用いる。この手法は、担持物質をゲル内部に組み込むことで、担持した物質がゲル内部で働くという、あたかも生体内に作られた工場のような特性を示すインジェクタブルゲルを創製することができるシステムである。本研究ではこのシステムを“Injectable Gel Factory”と名づけ、この Injectable Gel Factory システムを用いて新規インジェクタブルゲルの開発に取り組んだ。

## 第2章 緒言

### 2-1 研究背景

ハイドロゲルは、高分子鎖を化学的あるいは物理的な相互作用により架橋することで三次元構造を形成し、その隙間に水を多く含有する高分子材料である<sup>[16,17]</sup>。このようなハイドロゲルは、水を多く含むため栄養素や代謝物の透過性が高く、また、生体軟組織と構造が似ていることから、生物医学分野にて広く用いられている。

1997年にNature誌にてKimらは、ハイドロゲル研究において革新的な概念として、生体に注射投与可能なハイドロゲル、インジェクタブルゲルの概念を世界で初めて報告した<sup>[1]</sup>。彼らは、この報告にて親水性高分子ポリエチレングリコール (PEG) と生分解性かつ疎水性高分子のポリ-L-乳酸 (PLLA) からなるトリブロック共重合体を合成し、この共重合体が体温応答性ゾル-ゲル転移を示すことを見出した。このポリマーは両親媒性の ABA 型ポリマーであり、水中でミセルを形成する。このポリマー水溶液を体温まで温めると、PEG 鎖の脱水和を起因とする PLLA 鎖間の疎水性相互作用によりミセルが凝集し、この凝集部分が物理架橋点として作用することでゲルを形成する。このインジェクタブルゲルは高い生体適合性を持つことが知られている PEG や PLLA のみを使用していることから、生体内での使用が可能である。従来のハイドロゲルと比較してインジェクタブルゲルは、ゲル前駆溶液に細胞・低分子化合物・タンパク質など様々な生理活性物質を混合するだけで、注射投与により生体内への局所投与が可能である。このことから、この報告以降インジェクタブルゲルは、担持した物質を簡便に局所投与できる革新的なバイオマテリアルとして注目されている。そして、多くの研究者がインジェクタブルゲルの医療応用を目指し、「簡便に、かつ非侵襲的に細胞・低分子化合物・タンパク質などを局所投与でき、さらに周辺へと徐放するゲル」というコンセプトに基づいたインジェクタブルゲルの研究開発に取り組んでいる<sup>[2-11]</sup>。このようなインジェクタブルゲルは、様々な種類の高分子を刺激に応答して化学的 (すなわち共有結合) または物理的 (すなわち非共有結合) に架橋させることで設計され、PEG-ポリエステル共重合体<sup>[1, 2]</sup>やキトサン<sup>[3]</sup>をベースとするものが多く報告されている<sup>[18]</sup>。しかし、単に既存のインジェクタブルゲルに細胞や低分子化合物、タンパク質を内包する手法には、主に三つの課題点が存在する。一つ目は、初期バーストによって、担持した低分子薬剤やタンパク質が過剰に放出される点である<sup>[19]</sup>。既存のインジェクタブルゲルを用いる手法では、低分子薬剤やタンパク質は網目構造内に内包されているだけであるため、投与された際にゲルが膨潤しゲル内部と周辺の体液との濃度差によって、担持物質が外部へと拡散することで過剰放出が生じる。またそれだけでなく、インジェクタブルゲル中の架橋点の数や位置を分子設計の際に完全に制御できないため、不均一な構造が生じることで網目構造の

大きさがナノメートルレベルでばらつき、内包物質が放出されやすい構造になっていることも要因となっていると考えられる。二つ目の課題点は、ゲルに内包されたタンパク質の活性が低下する点である<sup>[9]</sup>。タンパク質は半減期が短く、構造が不安定であるため、わずかな温度変化や pH 変化により変性が生じて不活性化する。このようなタンパク質の特性に基づき、インジェクタブルゲルの不均一な網目構造によって、内包したタンパク質が体液にさらされることで変性が生じると考えられる。また、分解性高分子にて構築されるインジェクタブルゲルでは、ゲルを構成するポリマーの分解産物に起因するゲル内部の pH 変化もタンパク質の変性を引き起こす可能性がある。三つ目の課題点は、移植部位に移植した細胞の定着率が低い点である<sup>[10, 20]</sup>。これは、インジェクタブルゲルを構成するポリマーの細胞親和性の欠如や架橋点の制御ができないことにより網目構造のポアサイズが大きくなり、移植細胞に足場を提供できず細胞死アノキスを引き起こす、あるいはそのポアサイズのばらつきにより早期に移植細胞がサイズの大きなポアからゲル外部へと放出されてしまい、移植部位に定着しないことが原因であると考えられる。これらの課題点は、インジェクタブルゲルの構造や特性に起因している。そのため、上記の課題点を解決するためには担持物質の活性を保持し放出速度の制御を可能とする、より高機能なインジェクタブルゲルの開発が求められている。

近年このような問題点を解決すべく、新たなインジェクタブルゲルの研究が進められている。例えば、移植細胞の低い定着率を解決するために、Ohya らの研究チームは温度応答性の不可逆的なゾル-ゲル転移を示す poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-glycolic acid)と PEG の ABA 型トリブロック共重合体 (tri-PCG) を用いた脂肪由来幹細胞移植技術を報告している

<sup>[12,13]</sup>。彼らは、従来のインジェクタブルゲルでは体内にて可逆的なゾル-ゲル転移に起因するインジェクタブルゲルのゾル化が生じるため、早期に移植細胞がゲル外に放出されることで定着率が低下すると考えた。そこで、注射投与したゲルが体内にて再度ゾル化しないインジェクタブルゲルとして、温度上昇に応答しミセル同士の物理架橋が生じると共に、その物理架橋を受けて tri-PCG ミセル内に内包された dipentaerythritolhexakis(3-

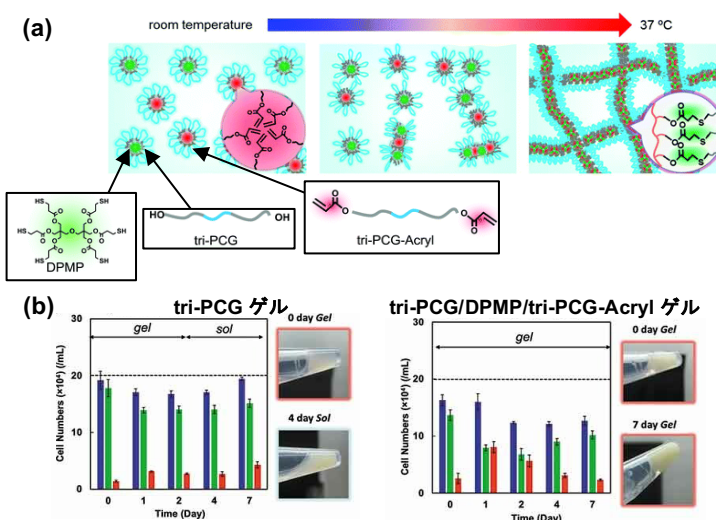


Figure 2-1 (a) tri-PCG/DPMP/tri-PCG-Acryl ゲルのゲル化メカニズム、  
(b) tri-PCG/DPMP/tri-PCG-Acryl ゲル及び tri-PCG ゲルに内包した脂肪由来幹細胞数の推移.[12,13] より引用し、一部改変。



mercaptopropionate) (DPMP) と tri-PCG-Acryl が同一空間に共存するようになり、チオール-エン反応が起こることで化学架橋を生じるインジェクタブルゲルを設計した (Figure 2-1a)。このチオール-エン反応による化学架橋が生じることで不可逆的なゲル化となり、従来のインジェクタブルゲルと比較し、より強固で、かつ長期に渡り体内でゲル状態を維持するインジェクタブルゲルとなった。インジェクタブルゲルへの化学架橋の導入により生体内での安定性は向上したが、内包した脂肪由来幹細胞の増殖は見られず細胞数の減少が見られた (Figure 2-1b)。原因として、チオール-エン反応は完全な生体直交型反応ではなく、アクリロイル基は細胞膜タンパク質のチオール基とも反応可能であり、細胞に傷害を与えたと考えられる。従って、移植細胞の生存状態を維持できるようなゲルに改良する必要がある。

また、初期バーストによる低分子化合物の早期放出を解決すべく、2020年に Song らはインジェクタブルゲルの二段階放出に伴う低分子薬剤のスローリリースを目指し、熱応答性の poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)/ $\beta$ -CD ポリマーとアダマンチル基末端修飾 PEG (Ad-PEG) を構成成分とするインジェクタブルゲルを報告している<sup>[21]</sup>。この二成分は、まず宿主分子であるシクロデキストリンとゲスト分子である Ad-PEG のアダマンチル基による宿主-ゲスト複合体形成を介して擬ブロック共重合体に自己集合する。その後、環境温度の変化に伴って PNIPAAm 鎖が脱水和し、疎水性相互作用により凝集して超分子ミセルを形成する。さらに  $\alpha$ -CD を添加することで、ミセルの PEG 鎖と  $\alpha$ -CD が包接錯体 (擬ポリロタキサン) を形成し、擬ポリロタキサン部位が水素結合により凝集し、この凝集部位が物理架橋点となることでゲルが形成する。このゲルは、シクロデキストリンとポリマーの間の二種類の超分子自己集合、つまり、 $\beta$ -CD ユニットとアダマンチル基の間の宿主-ゲスト複合体形成、および  $\alpha$ -CD と PEG 鎖の間の擬ポリロタキサン形成を含む独特のネットワーク構造を持つインジェクタブルゲルである (Figure 2-2a)。このインジェクタブルゲルの疎水性ミ

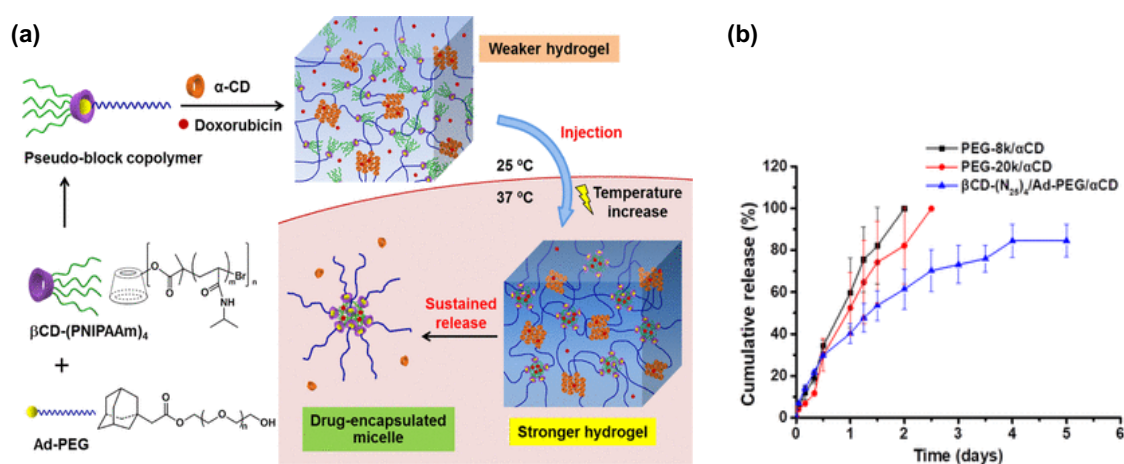


Figure 2-2 (a) DOX 内包  $\beta$ -CD-(PNIPAAm)<sub>4</sub>/Ad-PEG/ $\alpha$ -CD インジェクタブルゲルのゲル化メカニズム. (b)  $\beta$ -CD-(PNIPAAm)<sub>4</sub>/Ad-PEG/ $\alpha$ -CD インジェクタブルゲルに内包した DOX の放出試験. [21] より引用し、一部改変.

セルコアに抗がん剤 doxorubicin (DOX) を内包して生体内に投与すると、濃度希釈によりゲルが徐々に崩壊し、それに伴い DOX を含む薬物担体としてミセルの形で放出することができる。しかし、DOX 放出試験の結果より、従来の一段階放出のインジェクタブルゲルと比較すると初期バーストによる放出速度は低下したものの、試験開始から半日の時点で初期バーストに伴い内包した DOX のうち約 35%が放出され、さらに 5 日後には 80%以上が放出されている (Figure 2-2b)。このバースト放出は、弱い疎水性相互作用のみで DOX がミセルの疎水性コアに担持されていることに起因すると考えられる。従って、より長期的に薬剤を放出するためには、より強固な様式で薬剤を担持可能なゲルに改良する必要がある。

他にも、高機能なインジェクタブルゲル開発を目指した研究結果が報告されている (Table 2-1)<sup>[15,22-26]</sup>。低分子薬剤送達に用いるインジェクタブルゲルでは、Liu らの alginate-g-PNIPAAm を用いた DOX カプセル化ミセルを放出し、細胞に取り込ませることで DOX を送達可能とするインジェクタブルゲル<sup>[22]</sup>や、Qu らの chitosan-g-polyaniline ゲルに oxidized dextran を内包し、pH に応答して内包した oxidized dextran を放出するインジェクタブルゲル<sup>[23]</sup>などが報告されている。しかし、これらのインジェクタブルゲルは、特定の条件にて薬剤を放出するように設計されているものの、どちらも薬剤の初期バーストによる放出が生じており、意図しない薬剤放出が生じるインジェクタブルゲルである。また、タンパク質送達に用いるインジェクタブルゲルとして、Takata らの不可逆的なゾル-ゲル転移を示す glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 内包 poly(caprolactone-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(caprolactone-co-glycolic acid)ゲル<sup>[24]</sup>や、Pruett らの負電荷を帯びているヘパリンを共有結合により融合させた 4-arm poly(ethylene glycol) をベースとして用いた上皮成長因子 (EGF) 内包 microporous annealed particle ゲル<sup>[25]</sup>などが報告されている。これらのインジェクタブルゲルは、不可逆的なゲル化や正電荷を帯びたタンパク質とヘパリンの静電相互作用

によって、安定的にタンパク質をゲル内に維持できると期待される。しかし、GLP-1 内包 poly(caprolactone-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(caprolactone-co-glycolic acid)ゲルでは、1 週間後には GLP-1 活性がほとんど見られなかった。また、EGF 内包 microporous

Table 2-1 生理活性物質を担持するためのインジェクタブルゲル。

ベースとなる高分子の種類	用途	参考文献
<b>薬剤送達</b>		
Alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide)	DOX送達	[22] M. Liu et al., ACS Appl. Mater. Interfaces, 2017, 9, 35673-35682
Chitosan-graft-polyaniline	Oxidized dextranの送達	[23] J. Qu et al., Acta Biomaterialia, 72, 2018, 55-69
<b>タンパク質送達</b>		
Poly(caprolactone-co-glycolic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(caprolactone-co-glycolic acid)	glucagon-like peptide-1 (GLP-1)の送達	[24] K. Takata et al., Gels, 2017, 3, 38
Heparin/4-arm poly(ethylene glycol)	上皮成長因子 (EGF) の送達	[25] L. Prueett et al., J. Mater. Chem. B, 2021, 9, 7132-7139
<b>細胞送達</b>		
4-Arm poly(ethylene glycol)	マウス前駆軟骨細胞の送達	[15] S. Ishikawa et al., ACS Appl. Mater. Interfaces, 2022 14, 35444-35453
Hyaluronic acid/poly(β-amino ester)-tetraaniline	脂肪由来幹細胞の送達	[26] X. Jin et al., ACS Appl. Mater. Interfaces, 2020, 12, 56681-56691

annealed particle ゲルにおいても *in vivo* 上皮化実験にてコントロールと比較すると創傷 3 日後のマウスにおいて上皮化促進効果は見られたものの、完全な上皮組織の再建は見られなかった。さらに、細胞送達に用いるインジェクタブルゲルとして、Ishikawa らの高い機械的特性を示すことで細胞をゲル内に維持する 4-arm poly(ethylene glycol) をベースとしたマウス前駆軟骨細胞内包ゲル<sup>[15]</sup>や、細胞接着能を持つヒアルロン酸を融合した poly( $\beta$ -amino ester)-tetraaniline をベースとする脂肪由来幹細胞内包ゲル<sup>[26]</sup>などが報告されている。しかし、これらの報告されたインジェクタブルゲルでは、以前の報告と比較すると細胞生存率は上昇したものの、移植細胞に求めている働きである移植部位での組織化はどちらの報告においても達成されていない。このように、多くの研究者が様々な生理活性物質を担持可能な材料開発を目指して取り組むことで高機能なインジェクタブルゲルを報告しているが<sup>[27-28]</sup>、依然として従来の課題点であった、担持物質の早期放出やタンパク質活性の低下、移植細胞の低い定着率などは完全に解決されてはいない。したがって、インジェクタブルゲル研究をさらに発展させ、臨床応用につなげるためには、「担持物質の活性を維持した状態で長期的にゲル内部に保持し、局所で働かせることができるような革新的なインジェクタブルゲルの開発」が求められる。

## 2-2 本研究の目的

これまでのインジェクタブルゲル研究において、研究者たちは物質を内包したインジェクタブルゲルを生体局所に注射投与した後、ゲルが内包物質を放出させるための「担体」として機能するというコンセプトにて、インジェクタブルゲルを設計してきた (Figure 2-3)。この従来のインジェクタブルゲルの具体的な働きは、まずゲルが担体として物質を内包し、

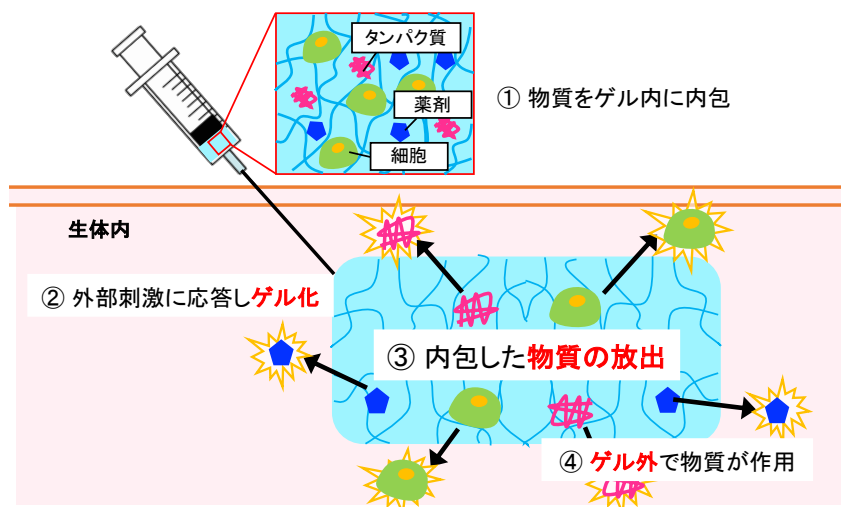


Figure 2-3 従来のコンセプトに基づき設計されたインジェクタブルゲルの機能.

生体内にて外部刺激によりゲル化したのち、ゲルに内包した物質をゲル外部へと放出し働かせるというものである。しかし、多くの研究者によりインジェクタブルゲル研究が進められているものの、未だ、ゲルに内包された物質が初期バーストにより拡散される、外部へ放出される前の段階で活性が低下してしまう、あるいは内包した細胞の生存率が低下するなどといった課題点は完全には解決されていない。

そこで本研究では、上記の課題点を完全に解決できるインジェクタブルゲルを開発するためには、ゲル設計のコンセプトを見直す必要があると考えた。具体的には、従来の「ゾル-ゲル転移を示し、性質の異なる様々な物質を担持可能であり、生体適合性を持つ」という有用な特性を維持しつつ、担持物質を放出することで機能させるのではなく、「担持物質をゲル内部で作用させる」インジェクタブルゲルを開発すれば、従来のインジェクタブルゲル研究の課題点を解決できるのではないかという仮説を立てた。この仮説に基づき、本研究では、「担持する生理活性物質そのものをゲルの構成成分の一つとして組み込むことでゲル内部にて働かせる」という新しいコンセプトを考案した。そして、このコンセプトでは、まるでインジェクタブルゲルが「目標とする量の製品を継続的に生産するために、一定の機械・器具を設備した場と定義される“工場 (factory)” のようである」ことから、このコンセプトを“Injectable Gel Factory”と名付けた。そして本研究では、発案した Injectable Gel Factory システムに基づく「担持する物質そのものが構成成分の一つとして組み込まれ、その物質が生体内に投与されたゲル内部で働き、機能を発揮する場となるような新規インジェクタブルゲル」の創製、及び Injectable Gel Factory の概念実証を目的とした。

Injectable Gel Factory システムに基づくインジェクタブルゲルの創製を達成するためには、「様々な担持物質（低分子薬剤、タンパク質、細胞などの生理活性物質）とマルチに相互作用して、それら物質を安定に担持可能な基盤インジェクタブルゲル」を設計する必要がある

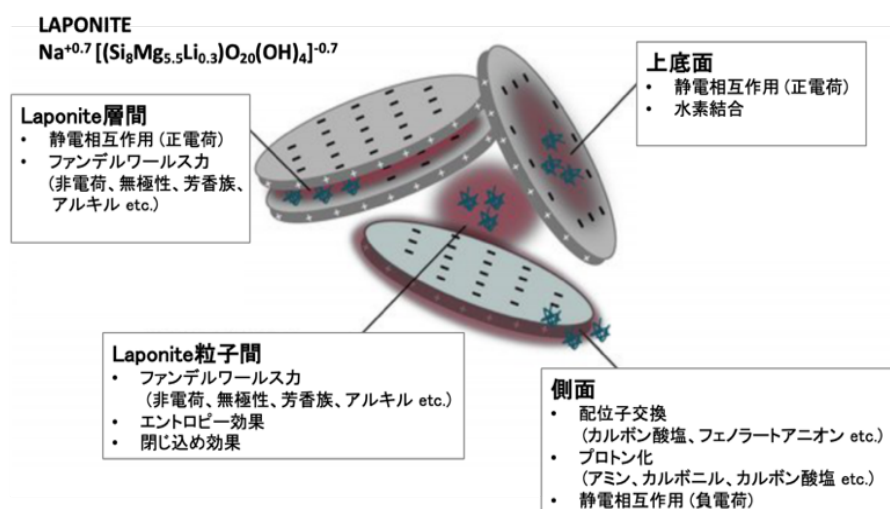
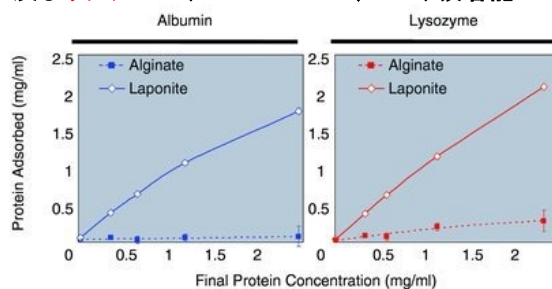


Figure 2-4 LAPONITE の構造と特徴<sup>[27-29]</sup>. [29]より引用し、一部改変.

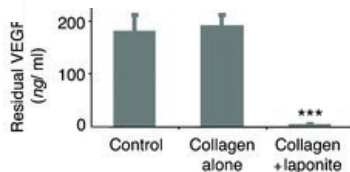
る。インジェクタブルゲルに物理化学的性質やスケールが異なる様々な物質とマルチに相互作用するという機能を新たに付与するため、本研究ではクレイナノ粒子の LAPONITE に着目した。LAPONITE はカチオン性のナトリウムイオン、マグネシウムイオン、リチウムイオン、そしてアニオン性のオルトケイ酸からなるナノ粒子であり、直径 25 nm、厚み 1 nm の円盤状の構造を持ち、上底面が負、側面が正に帯電している (Figure 2-4)<sup>[29-31]</sup>。大きな比表面積や電荷異方性に基づき、LAPONITE はサイズや化学的性質を問わず、低分子化合物、分子レベルで存在するタンパク質、また細胞膜タンパク質や糖鎖など構造体中の生体高分子など、性質や状態の異なる様々な分子を非特異的に強く吸着する性質が知られている。

例えば、2011 年に Dawson らは、電荷的性質や大きさが異なるタンパク質であるアルブミンとリゾチームを用いて LAPONITE による吸着実験を行い、異なる特徴をもつ二成分のどちらも吸着することを報告している (Figure 2-5a) <sup>[32]</sup>。さらに彼らは、タンパク質である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を LAPONITE 含有コラーゲンゲルに吸着させ、さらにそのゲルを生体内に投与することで吸着した VEGF による血管新生を調査した (Figure 2-5b, c)。その結果、LAPONITE によって吸着された VEGF が変性せず生体内で働くことで、血管新生を促進させることを報告している。これらの結果より、LAPONITE は電荷的性質や大きさが異なるタンパク質と相互作用可能であり、さらに生体内という夾雑環境でも、活性を維持した状態でタンパク質を保持できることが示された。

(a) 5% LAPONITE のアルブミン (Mw:66400 Da、PI:4.7) 及びリゾチーム (Mw: 14400 Da、PI:11) 吸着能



(b) LAPONITE 複合コラーゲンゲルの VEGF 吸着能



(c) VEGF 吸着 LAPONITE 複合コラーゲンゲルの *in vivo* 血管新生能

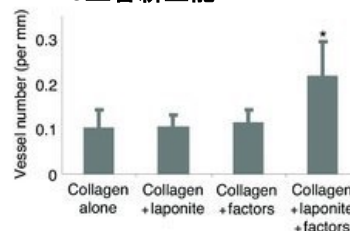


Figure 2-5 (a) LAPONITE ゲルにおける 2 種類の異なる性質を持つモデルタンパク質 (アルブミン、リゾチーム) を吸着能. (b) LAPONITE 含有ゲルの VEGF 吸着能. (c) VEGF をあらかじめ添加した LAPONITE 含有ゲルによる新生血管数. エラーバー=S.D. [32]より引用し、一部改変.

また、LAPONITE 複合ハイドロゲルを用いた Ordikhani らによる親水性の薬剤である抗生物質のバンコマイシン吸着実験 (Figure 2-6a)<sup>[33]</sup> 及び Basu らの疎水性の薬剤であるデキサメタゾン吸着実験 (Figure 2-6b)<sup>[34]</sup> の結果より、どちらの報告においても LAPONITE の存在下にて薬剤吸着能の向上が示された。これらの報告より、LAPONITE が親水性や疎水性といった異なる性質を持つ薬剤を吸着可能であることが明らかになった。

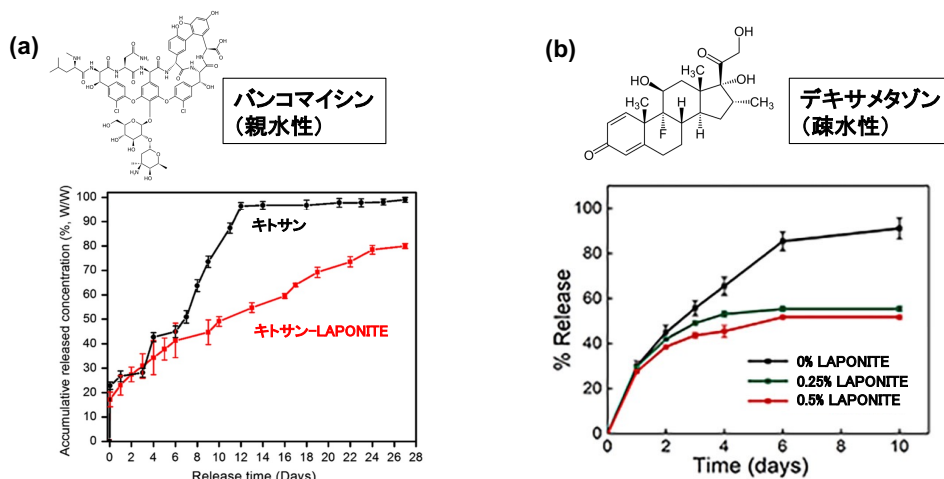


Figure 2-6 (a) LAPONITE 複合キトサンゲルによる時間経過に伴うバンコマイシン放出特性<sup>[33]</sup>. (b) LAPONITE 非複合ゲルと LAPONITE 複合ゲルによるデキサメタゾン放出特性<sup>[34]</sup>. the mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). それぞれ<sup>[33]</sup>及び<sup>[34]</sup>より引用し、一部改変。

さらに、2011年に Akhilesh らは、LAPONITE の細胞適合性を調査するために細胞接着能を持たない合成高分子 PEG と LAPONITE を複合して作製した PEG-LAPONITE ゲル上にて骨芽細胞の培養実験を行なった<sup>[35]</sup>。その結果、LAPONITE 濃度の上昇に伴い細胞接着率が向上したことから、LAPONITE が細胞との接着能を持つことを明らかになった (Figure 2-7)。これらの結果より、LAPONITE は低分子薬剤から細胞までマルチな生理活性物質と相互作用可能な材料であることが実証された。

### PEO-LAPONITEゲル上での骨芽細胞培養

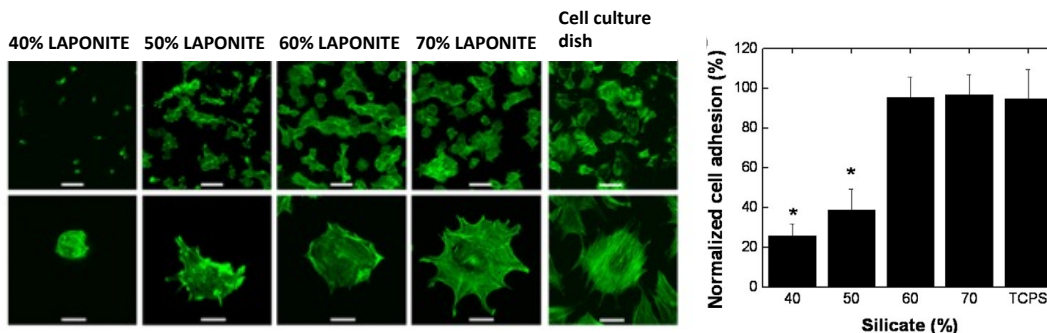


Figure 2-7 LAPONITE 濃度別の LAPONITE ゲル上で培養された骨芽細胞の観察画像 (左) 及び細胞接着面積(右). スケールバーは 100  $\mu$ m (上段) および 40  $\mu$ m (下段) を示す. 細胞接着は ImageJ を用いて定量した. <sup>[35]</sup> より引用し、一部改変。

このような特性を持つ LAPONITE を従来のポリマーのみで構成されるインジェクタブルゲルに複合することで、本研究のコンセプトである *Injectable Gel Factory* に基づいた「低分子医薬、タンパク質、細胞などの生理活性物質とマルチに相互作用して、内部に安定に保持する」特性を示す基盤インジェクタブルゲルを設計可能になるのではないかと考えた。そこで、本博士論文では、生体適合性かつ生分解性を示す両親媒性ポリマーの poly(lactide-co-glycolide)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(lactide-co-glycolide) (PLGA-PEG-PLGA, Figure 2-8a) と LAPONITE をナノレベルで複合した PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルを設計した。なお、この PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE 複合ゲルを以後 LP 複合ゲルと表記する。そして、この LP 複合ゲルを基盤材料として用い、①複合した  $\beta$ -gal により継続的にプロドラッグを変換可能な EPT 用「タンパク質活性保持ゲル」<sup>[36]</sup>、②デフェロキサミン (DFO) と血管内皮細胞を組み込みゲル内にて機能させることで、ゲル内に生体血管網と接続された血管を新生可能な「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」<sup>[37]</sup>、③生体内に存在する生理活性物質をゲルの周辺からゲル内へと補給可能な組織再生用「自己補給ゲル」<sup>[38]</sup>といった *Injectable Gel Factory* システムに基づき設計した三種類の新規インジェクタブルゲルの創製及び *Injectable Gel Factory* の概念実証に取り組んだ。これらの成果をそれぞれ第3章～第5章に記す (Figure 2-8b)。

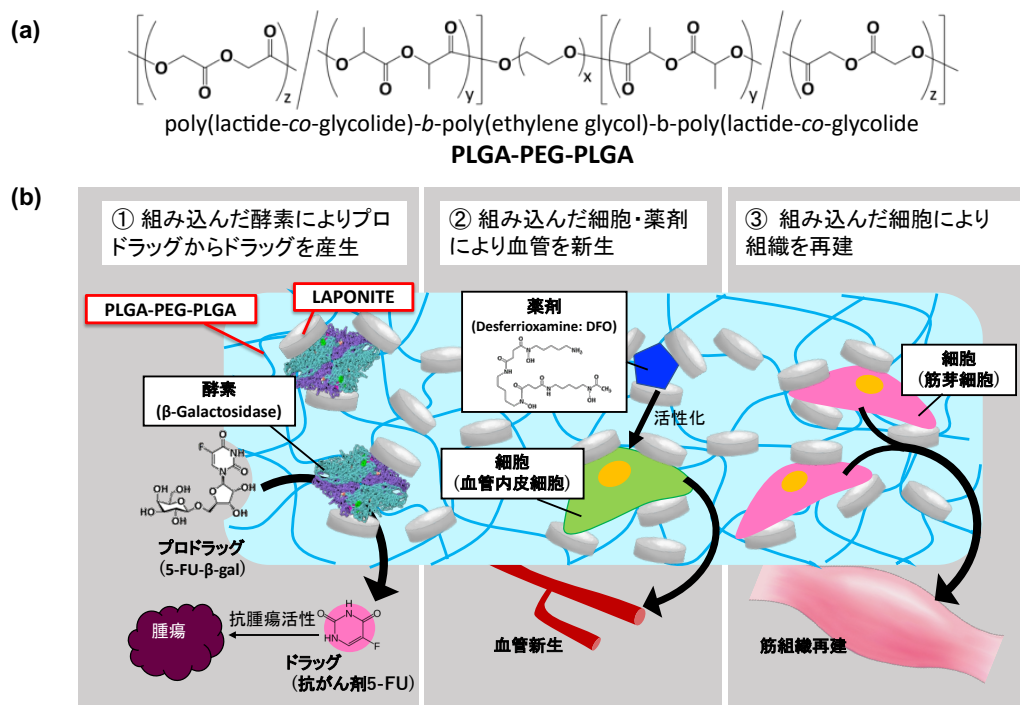


Figure 2-8 (a) PLGA-PEG-PLGA の構造. (b) 本研究の概念図.

## 第3章 Enzyme-prodrug therapy 用「タンパク質活性保持ゲル」の開発

### 3-1 序論

抗がん剤のプロドラッグとそのプロドラッグを抗がん剤に変換する酵素を組み合わせ、投与する enzyme-prodrug therapy (EPT) 研究では、長期間にわたり酵素の変性を防ぐことが可能な投与技術が求められている<sup>[39-44]</sup>。EPT は、抗がん剤のプロドラッグ及びプロドラッグを抗がん剤に変換可能な酵素を同時にがん組織に集積させ、がん組織内でプロドラッグを抗がん剤に変換することで、抗がん作用の増強と全身的な副作用の軽減を目指す技術である。これまでに報告されている多くの EPT システムは、 $\beta$ -gal<sup>[45]</sup>やシトシンデアミナーゼ<sup>[46]</sup>、ニトロレダクターゼ<sup>[47]</sup>などの外因性酵素を使用している。これらの外因性酵素はプロドラッグと生体直交的に反応するため、宿主固有の生物学的反応にはほとんど影響しない。これまでの EPT 研究では、EPT に drug delivery system (DDS) の要素技術を導入することで、比較的高い抗がん効果と副作用軽減が両立できると報告されている<sup>[48-54]</sup>。EPT に DDS を導入した多くの研究例では、プロドラッグと酵素を独立して血管に投与する全身循環型が適用されており、体内で酵素の活性を保持する目的で、DDS で汎用されるリポソームやポリマーソームなどの中空ナノ粒子に酵素を内包する手法が用いられている。この手法では、中空ナノ粒子が示す EPR 効果により、高効率でがん組織に酵素が送達され、がん組織で反応した基質プロドラッグを大量の抗がん剤に変換し、抗がん活性を発現させる有効濃度を一定期間持続可能であると期待されている。このように中空ナノ粒子内に酵素を封入し、働かせるシステムは、ナノ粒子があたかも抗がん剤を産生する工場のように振舞うことから、ナノファクトリーと呼ばれている。

EPT に応用可能なナノファクトリーシステムを用いたナノ粒子が満たすべき条件として、(1)酵素を内包する空間をもつ、(2) 酵素の活性を維持したまま一定期間保持する、(3) がん組織へ集積する、(4) プロドラッグがナノ粒子内に入り込み、酵素との反応により生じた抗がん剤がナノ粒子外に放出される、(5) 役目を果たした後ナノ粒子は分解する（生分解性を持つ）、という 5 項目が挙げられる<sup>[41,53,56]</sup>。これら 5 つの条件をすべて満たすナノ粒子の開発は容易ではないが、Nishimura らは近年、malto-oligosaccharide-*b*-poly(propylene glycol)共重合体の自己組織化により上記(1) ~ (5)を満たすポリマーソームを開発し、血管投与による全身循環型 EPT として、優れた抗がん活性と低い副作用を両立させた<sup>[56]</sup>。一方で、血管投与による全身循環型 EPT では、血液中でナノ粒子内の酵素とプロドラッグが反応すると、血液中で抗がん剤が産生され、血流を介して抗がん剤が全身に拡散する懸念がある。また、



EPR 効果が働くのにも関わらず、全身の組織へ移行するナノ粒子が存在するため、移行した正常組織でプロドラッグと反応すると、抗がん剤が正常組織の細胞に作用し、副作用が生じる。以上のように、EPT をさらに発展させるためには、抗がん剤産生ナノ粒子をより高い精度でがん組織に集積させ、全身には作用しにくい手法を開発することが重要な課題である。

私たちはこの課題の解決を目指し、局所投与技術に着目した。これまでの DDS 研究において、薬剤を担持したキャリアを患部に局所投与することは有用な手法であることが実証されている<sup>[57-61]</sup>。しかし、これまでに局所作用型 EPT 技術の報告例はない。そこで、Injectable Gel Factory システムを用いることで従来のナノファクトリーの課題を解決可能な、局所作用型 EPT 技術を開発できるのではないかと考えた。具体的には、Injectable Gel Factory システムの基盤材料である LP 複合ゲルに構成成分の一つとして酵素を組み込むことで、ゲルに組み込まれた酵素が変性せずに機能発現することでゲル内にてプロドラッグを活性化させ、役目を果たすと分解・消失するような、局所作用型の EPT 技術を創製できるのではないかと発想した。このような発想に基づいて、本章では、抗がん剤プロドラッグを抗がん剤に転換する酵素として  $\beta$ -gal を選択し LP 複合ゲルに組み込むことで、Injectable Gel Factory システムを用いた新規局所投与型 EPT 技術であるタンパク質活性保持ゲルを開発した。

## 3-2 実験方法

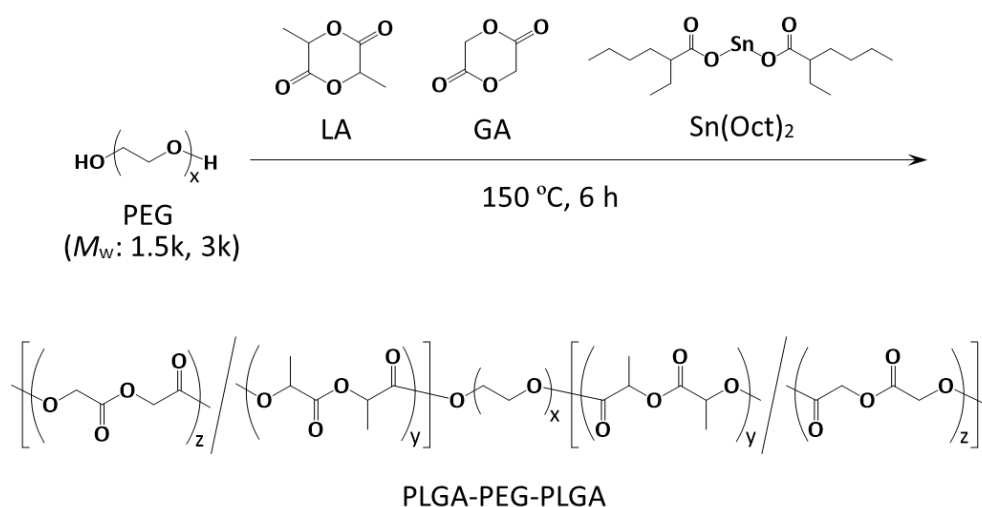
### 3-2-1 試薬

PEG ( $M_w$ : 1.5 および 3.0 kDa)、glycolide (GA)、および tin (II) 2-ethylhexanoate は、Sigma-Aldrich から購入した。L-Lactide (L-LA) および D-lactide (D-LA) は武蔵野化学研究所から購入し、凍結乾燥により精製した。その他、本研究で使用した  $\beta$ -gal 及びすべての溶媒は、富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。また、LAPONITE は Wilbur-Ellis Co., (Japan) Ltd. から提供された。

### 3-2-2 LP 複合ゲルの作製

PLGA-PEG-PLGA は、PEG を開始剤、tin(II) 2-ethylhexanoate を触媒とする DL-LA と GA の開環重合により合成した (Scheme 3-1)。PEG3k ( $M_w$ : 3,000,  $M_w/M_n$ : 1.21, Sigma) (2,250 mg, 0.75 mmol)、L-LA (972 mg, 6.75 mmol)、D-LA (972 mg, 6.75 mmol)、GA (783 mg, 6.75 mmol) を秤量し、乳鉢で均一な粉末状になるまで混ぜ合わせた。その後混ぜ合わせた粉末をナス型フラスコに移し、窒素雰囲気下にて tin(II) 2-ethylhexanoate (12 mg, 30  $\mu$ mol) を加えて一晩減圧乾燥を行なった。その際、はじめの 1 時間は 10 分ごとにナス型フラスコ内の窒素置換を行な

った。翌日、ナス型フラスコ内に窒素を封入し常圧に戻した状態で、150°Cに加熱したオイルバスに浸漬して攪拌しながら 6 時間重合反応を行なった。反応物の精製は再沈殿法により行なった。その際、溶媒はクロロホルムを用い、PLGA-PEG<sub>3000</sub>-PLGA (P<sub>3k</sub>) を得た。また、高分子開始剤として PEG1.5k ( $M_w$ : 1,500,  $M_w/M_n$ : 1.24, Sigma) を用いて、同様の操作を行うことで、PLGA-PEG<sub>1500</sub>-PLGA (P<sub>1.5k</sub>) を合成した。P<sub>3k</sub> と P<sub>1.5k</sub> の数平均分子量 ( $M_n$ ) と多分散度 ( $M_w/M_n$ ) はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により測定した (検出: RI, スタンダード: PEG, 溶離液: 10 mM LiBr 含有 DMSO)。合成した P<sub>3k</sub> と P<sub>1.5k</sub> の PEG、DL-LA、GA の組成は <sup>1</sup>H-NMR 測定 (JEOL, ECA-500, 溶媒: CDCl<sub>3</sub>) により算出した。



Scheme 3-1 PLGA-PEG-PLGA の合成スキーム。

### 3-2-3 β-Gal/LP 複合ゲルの作製及び特性評価

所定の濃度のポリマー水溶液を調製するために P<sub>3k</sub> を量りとり、所定量のアセトンに溶解したのち、各サンプルにアセトンと等量の純水を加えた。その後、アセトンを吸引により完全に蒸発させ所定の濃度の P<sub>3k</sub> 水溶液を調製した。作製した P<sub>3k</sub> 水溶液に等量の LAPONITE 水溶液 (所定濃度) を添加し、攪拌することで LP 複合ゲル前駆溶液を調製した。次いで、特定の濃度の β-gal の水溶液を LP 複合ゲル前駆溶液に添加し、攪拌して所定の複合比で β-gal/LP ゲル前駆溶液を調製した。β-gal/LP 複合ゲル前駆溶液を 4°C で 10 分間インキュベートした後、各 β-gal/LP 複合ゲル前駆溶液の温度応答性ゾル-ゲル転移を調べた。コントロールサンプルとして PLGA-PEG-PLGA 単独ゲルを用いた。なお、以後 PLGA-PEG-PLGA 単独ゲルをポリマー単独ゲルと表記する。PLGA-PEG-PLGA (P<sub>1.5k</sub>) をアセトンに溶解し、所定量の純水を各サンプルに加えた。アセトンを吸引により完全に蒸発させて、P<sub>1.5k</sub> (20%) 水溶液 (ポリマー単独ゲル前駆溶液) を調製した。その後、特定の濃度の β-gal の水溶液をポリマー単独ゲル前駆溶液に添加し、激しく攪拌して β-gal 複合ポリマー単独ゲル前駆溶液を調製し

た。 $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル前駆溶液を 4°C で 10 分間インキュベートした後、温度応答性のゾル-ゲル転移を調査した。また、レオロジー解析を行うために、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆体溶液 (総量: 100  $\mu$ L, P<sub>3k</sub>: 3 mg, LAPONITE: 0.9 mg,  $\beta$ -gal: 0.1 mg) を上記と同様の手法を用い、調製した。なお、この前駆体溶液のレオロジー解析には、レオメーター (Anton Paar, MCR 302) を用いた。各サンプル溶液をギャップ 1.0 mm、直径 25 mm の平行プレートの間にはやくセットし、プレートを 1.0 °C/min の速度で加熱した。応力 (4.0 dyn/cm<sup>2</sup>) および周波数 1.0 rad/s の条件下にて、温度上昇 (10~40°C) に対する貯蔵弾性率 ( $G'$ ) と損失弾性率 ( $G''$ ) の変化を測定した。さらに、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル (総量: 100  $\mu$ L, P<sub>3k</sub>: 3 mg, LAPONITE: 0.9 mg,  $\beta$ -gal: 0.1 mg) を上記のように調製し、そのゲルを用いてゲルの構造解析および元素解析を行なった。調製したゲルを凍結乾燥し、四酸化オスミウムでコートしたのち、ゲル構造を scanning electron microscopy (SEM) (JSM-7001FA, JEOL) で観察した。また、SEM 観察と同時に、ゲルの元素分析 (N, Si, Mg) を energy-dispersive X-ray (EDX) にて行なった。

#### 3-2-4 LP 複合ゲル前駆溶液に複合した $\beta$ -gal の *in vitro* 酵素活性

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル前駆体溶液 (総量: 500  $\mu$ L, P<sub>3k</sub>: 15 mg, LAPONITE: 4.5 mg,  $\beta$ -gal: 18.5 nM) を 3-2-3 と同じ方法で調製し、異なる濃度の 2-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) (500  $\mu$ L) を室温で攪拌しながらゲル前駆体溶液に加えた。各反応混合物の 420 nm での吸光度は、UV-vis 分光光度計 (V-730BIO, JASCO) を使用して測定した。 $\beta$ -gal を複合したポリマー単独ゲル前駆溶液の酵素活性 (総量: 500  $\mu$ L, P<sub>3k</sub>: 15 mg,  $\beta$ -gal: 1.86 nM)、 $\beta$ -gal を複合した LAPONITE 水溶液 (合計容量: 500  $\mu$ L, LAPONITE: 4.5 mg,  $\beta$ -gal: 1.86 nM)、およびコントロールとして  $\beta$ -gal 水溶液 (総量: 500  $\mu$ L,  $\beta$ -gal: 1.86 nM) を同様の手順で調べた。酵素活性を定量的に評価するために、ミカエリス・メンテン速度解析により分析した。なお、酵素活性の値は 3 つの独立した実験の平均  $\pm$  標準偏差を表す。

#### 3-2-5 LP 複合ゲルに複合した $\beta$ -gal の *in vitro* 酵素活性

3-2-3 と同様の手法で  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルと  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲルをキュベット内にて調製した。ONPG 水溶液 (50  $\mu$ L, 0.93 mM) を慎重にキュベット内のゲル上にのせた後、キュベットを 37°C で 60 分間インキュベートし、ゲル内で起こる呈色反応を所定時間毎に観察した。

#### 3-2-6 LP 複合ゲルに複合した $\beta$ -gal の *in vivo* 酵素活性

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル (総量: 100  $\mu$ L, P<sub>3k</sub>: 3 mg, LAPONITE: 0.9 mg,  $\beta$ -gal: 0.1 mg) を 3-2-3 と同様の手法でシリンジ内に調製した。Charles River から購入したマウス (Cr1/ICR, 5 週齢, 雌)

に  $\beta$ -gal/LAPONITE 複合ゲル前駆溶液 100  $\mu$ L を皮下注射した。所定時間後に皮下投与したゲルを取り出し、ゲル内の  $\beta$ -gal を TokyoGreen- $\beta$ -gal (五稜化薬) と反応させ、蛍光顕微鏡 (Keyence, Biorevo BZ-9000) を用いて観察した。コントロールサンプルとして、 $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲルを同様に皮下投与し、同じ手法で実験を行なった。なお、本論文のすべての動物実験及び実験手法は甲南大学によって承認され (承認番号: K-19-05)、米国国立衛生研究所が発行した実験動物の管理と使用に関するガイドラインに準拠している。

### 3-2-7 LP 複合ゲル内に保持された $\beta$ -gal の定量解析

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル (総量: 500  $\mu$ L, P<sub>3k</sub>: 15 mg, LAPONITE: 4.5 mg,  $\beta$ -gal: 0.5 mg) を 3-2-3 と同様の手法で 15 mL プラスチックチューブ内に調製した。次に、1×PBS (5.0 mL, pH 7.4, 140 mM) を各ゲル上に加え、チューブを  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  でインキュベートした。所定時間後各チューブから慎重に上清を除去し、新たに 1×PBS (5 mL) を加えた。放出された  $\beta$ -gal の量を定量するため、BCA アッセイを使用して上清を分析し、反応溶液の UV-vis 吸光度 (562 nm) を所定時間毎に測定した。

### 3-2-8 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルから放出された $\beta$ -gal の *in vivo* 酵素活性

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル (総量: 500  $\mu$ L, P<sub>3k</sub>: 15 mg, LAPONITE: 4.5 mg,  $\beta$ -gal: 0.5 mg) を 3-2-3 と同様の手法で 15 mL プラスチックチューブ内に調製した。次に、ゲル上に 1×PBS (5 mL) を静かに加えた。所定時間後各チューブから慎重に上清を除去し、新たに 1×PBS (5 mL) を加えた。上清に ONPG 溶液 (総量: 1 mL, ONPG: 0.93 mM) を加え、UV-vis 分光光度計 (V-730BIO, JASCO) を用いて  $20^\circ\text{C}$  で 420 nm の吸光度を測定した。コントロールゲルとして  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲルから放出された  $\beta$ -gal の酵素活性を、同じ手法を用いて調査した。なお、放出された  $\beta$ -gal の酵素活性 (%) は、以下の計算式に従って算出した。

放出された  $\beta$ -gal の酵素活性 (%) = (各時点で測定された上清の吸光度) / (対応する時点での上清と同じ濃度の PBS 中の  $\beta$ -gal 溶液の吸光度)  $\times 100$

### 3-2-9 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの分解特性

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル (500  $\mu$ L) 及び  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル (500  $\mu$ L) を 3-2-3 と同様の手法で、あらかじめ秤量しておいたプラスチックチューブ内に調製した。1×PBS (5 mL) を各ゲル上に加え、チューブを  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  でインキュベートした。所定時間後、上清を完全に除去し、ゲルを含むチューブを秤量し、膨潤したゲルの重量を測定した。その後、チューブ内の各ゲルを凍結乾燥し秤量した。各ゲルの重量損失 (%) は、以下の計算式に従って計算された。

ゲルの重量損失 (%) =  $(W_0 - W_t) / W_0 \times 100$

$W_0$  は実験開始前の凍結乾燥したゲルサンプルの重量を示し、 $W_t$  は分解実験後の凍結乾燥したゲルサンプルの重量を示す。

### 3-2-10 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による *in vitro* がん細胞死誘導効果

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による細胞毒性について調査した。具体的には、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル内の  $\beta$ -gal が、外部から浸透したプロドラッグ 5-fluorouridine 5'-O- $\beta$ -d-galactose (5-FU- $\beta$ -gal) を活性化し、抗がん剤 5-FU を産生することによる細胞毒性を評価した。まず、24well プレーートの各ウェルに  $3.0 \times 10^4$  個の MCF-7 細胞を播種し、24 時間培養した。Transwell チャンバー (孔径: 8.0  $\mu$ m) 内に  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル (総量: 100  $\mu$ L,  $\beta$ -gal: 0.1 mg) を調製し、ウェルに各チャンバーをセットした。5-FU- $\beta$ -Gal (0.2 mM) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 2 mL を各ウェルに加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。72 時間後、チャンバーを取り除き、MCF-7 細胞に対する細胞毒性効果を WST-1 アッセイにて評価した。96 ウェルプレートの各ウェルに上清を 200  $\mu$ L ずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定した。また、コントロールとして  $\beta$ -gal および 5-FU- $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲル、 $\beta$ -gal を含まない 5-FU- $\beta$ -gal /LP 複合ゲル及び 5-FU- $\beta$ -gal を含まない  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの *in vitro* 抗がん活性も同様の手法を用いて調査した。

### 3-2-11 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による長期 *in vitro* がん細胞死誘導効果

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による長期的な細胞毒性について評価した。はじめに、24well プレーートの各ウェルに  $3.0 \times 10^4$  個の MCF-7 細胞を播種し、24 時間培養した。Transwell チャンバー (孔径: 8.0  $\mu$ m) 内に  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル (総量: 100  $\mu$ L,  $\beta$ -gal: 0.1 mg) を調製し、ウェルに各チャンバーをセットした。5-FU- $\beta$ -Gal (0.2 mM) を含む DMEM 2 mL を各ウェルに加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。72 時間後、上部チャンバーを取り外し、MCF-7 細胞に対する細胞毒性効果を WST-1 アッセイにて評価した。その後、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルを含むチャンバーを新しい MCF-7 細胞 ( $3.0 \times 10^4$  個) を培養してある 24 ウェルプレートに移し、37°C、5% CO<sub>2</sub> でインキュベートした。さらにその 72 時間後、上部チャンバーを取り外し、MCF-7 細胞に対する細胞毒性効果を WST-1 アッセイにて評価した。3 日ごとにこの操作を繰り返し行なった。

### 3-2-12 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲル存在下でのプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal による *in vivo* 抗腫瘍活性

ヌードマウス (BALB/c-nu/nu, 5 週齢, 雌) は Charles River から購入し、イソフルランを使用してマウスを麻酔した。 $3.0 \times 10^6$  個のヒト前立腺癌細胞 (PC-3) を 50  $\mu$ L マトリゲル (BD Bioscience) に内包し、皮下に注射投与した。腫瘍サイズが 70 mm<sup>3</sup> に達したとき、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル (総量: 100  $\mu$ L,  $\beta$ -gal: 0.1 mg) を腫瘍付近に注入したのち、5-FU- $\beta$ -gal 水溶液 (125  $\mu$ g/50  $\mu$ L) を腫瘍とゲルの間に注入した。4 日間同量の 5-FU- $\beta$ -gal 溶液を連続投与した。処置したマウスの体重を 14 日間毎日測定した。腫瘍体積はノギスを使用して毎日測定し、以下の計算式に従って算出した。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times (\text{長径}) / 2$$

また、コントロールとして  $\beta$ -gal および 5-FU- $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲル、 $\beta$ -gal を含まない 5-FU- $\beta$ -gal/LP 複合ゲル、5-FU- $\beta$ -gal を含まない  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル及び無処置の *in vivo* 抗腫瘍活性も同様の手法を用いて調査した。

## 3-3 結果と考察

### 3-3-1 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの温度応答性、レオロジー及び構造解析

異なる分子量の PEG ( $M_w$ : 1.5 および 3.0 kDa) を含む PLGA-PEG-PLGA を合成した。P<sub>1.5k</sub> および P<sub>3k</sub> の <sup>1</sup>H-NMR 測定及び GPC 測定により得られた分子組成、分子量、および分子量分布を Table 3-1 に示す。これまでに、我々の研究グループでは、PLGA-PEG-PLGA および LAPONITE の組成を変化させることで LP 複合ゲルを作製可能であること、及び組成比を制御することでゾル-ゲル転移温度を調整できることを報告しており<sup>[62]</sup>、幅広い組成比の LP 複合ゲルを局所作用型 EPT 技術の開発に用いることができるが明らかになっている。本章では、ゲル組成比が PLGA-PEG-PLGA 濃度: 3% (w/v) および LAPONITE 濃度: 0.9% (w/v) の LP 複合ゲルを選択した。この組成比の LP 複合ゲルを本論文では以後、LP 複合ゲル (P3L0.9) と表す。さまざまな  $\beta$ -gal 濃度 (0.5 及び 1.0 mg/mL) にて、 $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル前駆溶液および  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆溶液の温度応答性ゲル化反応を調べた結果、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆溶液は、不可逆的な温度応答性のゲル化を示した (Figure 3-1a)。また、

Table3-1 本研究にて合成した PLGA-PEG-PLGA の特性評価。

copolymer	DP of LA <sup>a</sup>	DP of GA <sup>a</sup>	$M_w$ of PEG	$M_w$ of copolymer <sup>b</sup>	$M_w/M_n$ <sup>c</sup>
PLGA-PEG <sub>1.5k</sub> -PLGA (P <sub>1.5k</sub> )	8	4	1,500	4,800	1.18
PLGA-PEG <sub>3k</sub> -PLGA (P <sub>3k</sub> )	8	4	3,000	6,300	1.15

<sup>a</sup> Estimated by <sup>1</sup>H-NMR. <sup>b</sup> Estimated by following equation;  $M_w$  of copolymer =  $M_w$  of PEG segment + 2 × ( $M_w$  of PLGA segment). <sup>c</sup> Estimated by GPC (eluent: DMSO, standard: PEG).

$\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆溶液のゲル化温度は、どちらも  $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲル前駆溶液のゲル化温度 (25°C) とは異なる温度となったことから、ゲル化温度は複合する  $\beta$ -gal 濃度の影響を受けることが示唆された (Figure 3-1b, d)。特に、 $\beta$ -gal (0.5 mg/mL) /LP 複合ゲル前駆溶液のゲル化温度は  $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲル前駆溶液よりも高かったものの、 $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲル前駆溶液は、室温-体温間でゾル-ゲル転移を示したことから、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは体温に応答してゲル化し、注射器により容易に局所投与可能なインジェクタブルゲルの性質を持つことが明らかとなった。一方、LAPONITE を含まない  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル前駆溶液のゲル化温度は  $\beta$ -gal 濃度の変化に依存せず一定であった (Figure 3-1c, d)。これらの結果より、LP 複合ゲルに複合された  $\beta$ -gal は LAPONITE と相互作用することでゲル化温度に影響を及ぼしていると示唆された。以前、我々の研究グループは、PLGA-PEG-PLGA、LAPONITE、および抗がん剤ドキシソルビシン (DOX) で構成されるインジェクタブルゲルとして DOX/LP 複合ゲルを報告している<sup>[63]</sup>。この DOX/LP 複合ゲルのゲル化温度は DOX 濃度の影響を受けており、その変化はゲル内の DOX と LAPONITE の

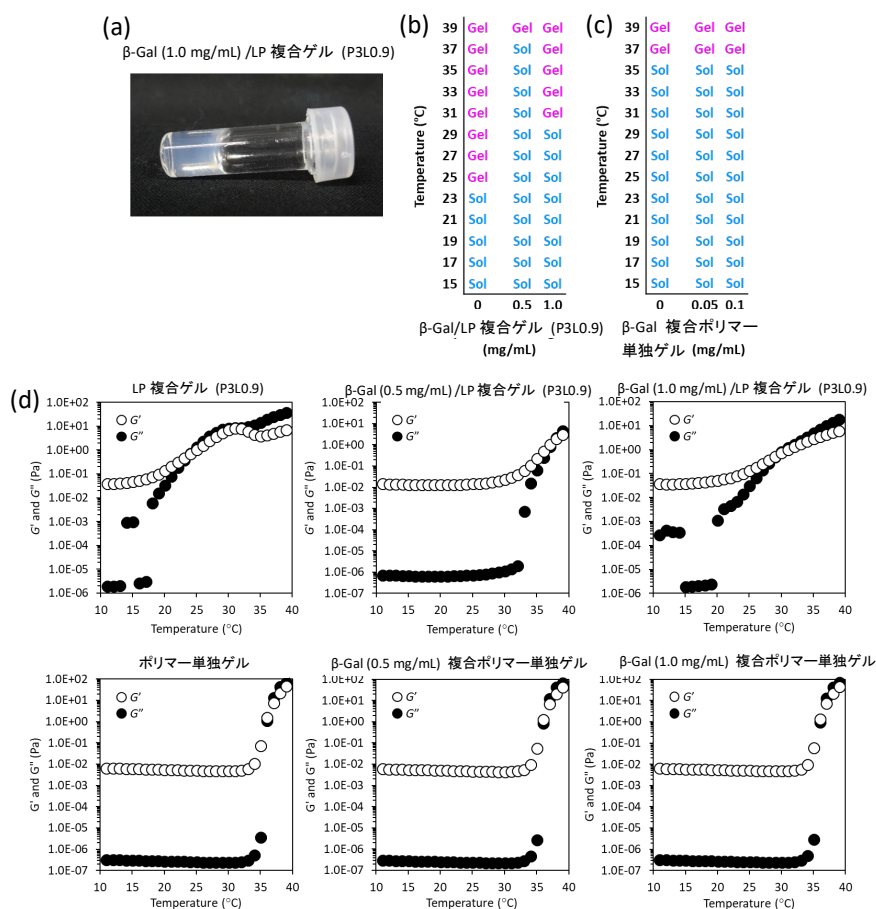


Figure 3-1 (a) 37°C にてゲル化した  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲル (1 mL) 画像. (b)  $\beta$ -Gal 濃度が異なる  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆溶液の相図. (c) 異なる  $\beta$ -gal 濃度の  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル前駆溶液の相図. (d) 温度上昇に対する  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆溶液及び  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル前駆溶液の貯蔵弾性率 ( $G'$ ), 損失弾性率 ( $G''$ ) のプロット.

相互作用に起因していることが明らかになっている。この知見より、本研究においても  $\beta$ -gal の濃度変化に伴いゲル化温度に変化が見られていることから、LAPONITE と  $\beta$ -gal が相互作用することでゲル化温度の変化が生じているのではないかと考えた。そこで、LP 複合ゲル内で LAPONITE と  $\beta$ -gal が相互作用していると仮定し、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの SEM 分析を行なった。さらに、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル中の  $\beta$ -gal の局在を調査するために、 $\beta$ -gal に起因する窒素原子と LAPONITE に起因するケイ素原子およびマグネシウム原子に着目して EDX による元素分析を行なった。その結果、Figure 3-2 のようにゲルネットワーク構造が観察された。さらに、EDX の結果より  $\beta$ -gal 由来の窒素のシグナルは、LAPONITE 由来のケイ素およびマグネシウムのシグナルと同じ位置に局在していることから、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル内にて  $\beta$ -gal が LAPONITE と相互作用することでゲルの構成成分の一部となっていることが示された。つまり、 $\beta$ -gal は LAPONITE との相互作用により、ゲルの構成成分の一つとなりゲルネットワークを構築していると考えられる。

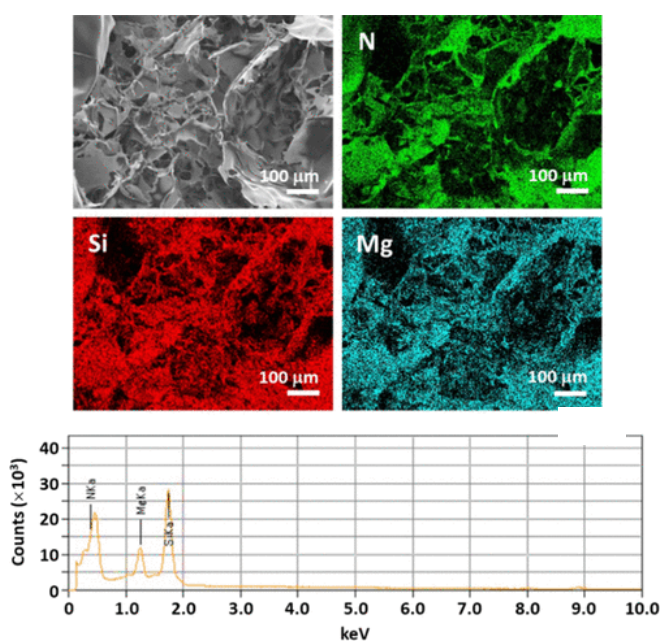


Figure 3-2  $\beta$ -Gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲルの SEM 画像と EDX マッピングおよび元素分析。

### 3-3-2 *In vitro* 及び *in vivo* での $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの酵素活性

Injectable Gel Factory の概念に基づいた EPT に用いるインジェクタブルゲルが設計できているのかを検証するためには、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルが複合した  $\beta$ -gal の酵素活性を維持できるのかを調査する必要がある。そこで、ONPG を基質として用いた *in vitro* 実験にて、LP 複合ゲル前駆溶液及びコントロール溶液 (ポリマー単独ゲル前駆溶液, LAPONITE 単独水溶液, 純水) 中の  $\beta$ -gal の酵素活性を評価し、得られた結果を Table 3-2 にまとめた。結果より、ポリマー単独ゲル前駆溶液中で  $\beta$ -gal の酵素活性は検出されなかった。以前我々の研究グルー



プは、両親媒性 PLGA-PEG-PLGA 共重合体が水溶液中で疎水性ドメインを持つ高分子ミセルを形成し、これらの疎水性ドメインが疎水性相互作用を介してタンパク質を変性させることを報告している<sup>[62]</sup>。従って、本結果においても PLGA-PEG-PLGA ミセルの存在下で  $\beta$ -gal の変性が生じることで酵素活性が検出されなかったと考えられる。一方 LAPONITE 水溶液中の  $\beta$ -gal の  $V_{\max}$  と  $k_{\text{cat}}$  の値は、それぞれ  $1.36 \times 10^{-1} \pm 0.19 \times 10^{-1}$  と  $7.37 \times 10^3 \pm 0.10 \times 10^3$  であった。興味深いことに、これらの値は純水中の  $\beta$ -gal の値よりも有意に高く、LAPONITE の存在下で酵素活性が上昇したことを示している。これまでに、LAPONITE の高分子電解質吸着<sup>[29]</sup>、帯電防止および防塵効果<sup>[64]</sup>、及び複数の異なる物理的・化学的特性<sup>[31]</sup>などの様々な特性が報告されているが、本章にて示した酵素活性の向上効果については本研究が初めての報告である。この酵素活性向上のメカニズムを解明することは、生化学、生体材料科学、および薬学研究にとって非常に重要である。しかし、本研究ではこの現象のメカニズムは調査していないため、今後検討していく。また、LP 複合ゲル前駆溶液中の  $\beta$ -gal の  $V_{\max}$  及び  $k_{\text{cat}}$  値は、それぞれ  $5.20 \times 10^{-2} \pm 0.37 \times 10^{-2}$  および  $2.81 \times 10^3 \pm 0.20 \times 10^3$  であった。この値は、LAPONITE 水溶液と同様に純水中の  $\beta$ -gal の値よりも高いことから、 $\beta$ -gal の固有の酵素活性が LP 複合ゲルの前駆溶液中にて保持されていることが示された。

Table 3-2 各サンプルに複合された  $\beta$ -gal の酵素活性.

Sample	$K_M$ (mM)	$V_{\max}$ (mM $\cdot$ min <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}$ (min <sup>-1</sup> )
$\beta$ -Gal 複合ポリマー単独 ゲル前駆溶液	N.D. <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>
$\beta$ -Gal 複合 LAPONITE 水 溶液	$6.01 \times 10^{-1} \pm 0.93 \times 10^{-1}$	$1.36 \times 10^{-1} \pm 0.19 \times 10^{-1}$	$7.37 \times 10^3 \pm 0.10 \times 10^3$
$\beta$ -Gal/LP 複合ゲル前駆溶 液	$3.72 \times 10^{-1} \pm 0.44 \times 10^{-1}$	$5.20 \times 10^{-2} \pm 0.37 \times 10^{-2}$	$2.81 \times 10^3 \pm 0.20 \times 10^3$
$\beta$ -Gal 水溶液	$3.99 \times 10^{-2} \pm 0.35 \times 10^{-2}$	$2.00 \times 10^{-2} \pm 0.35 \times 10^{-2}$	$1.08 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$

Values represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments. <sup>a</sup>Not detected.

Injectable Gel Factory の概念に基づき設計された、EPT に用いるインジェクタブルゲルに求められるもう一つの条件は、ゲル状態でも複合した  $\beta$ -gal の酵素活性が維持されることである。そこで、*in vitro* 実験にて LP 複合ゲルおよびコントロールゲルであるポリマー単独ゲル中の  $\beta$ -gal の酵素活性を評価した。なお、分光法を用いて半透明なゲルの酵素活性を定量的に分析することは困難であったため、基質として ONPG を使用し、酵素活性を定性的に

調べた。この基質 ONPG と  $\beta$ -gal の反応生成物である ONP は黄色を呈色するため、色の変化を観察することで酵素活性を評価することができる。ポリマー単独ゲル前駆溶液内の  $\beta$ -gal の酵素活性の失活と同様に、 $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル内においても、60 分経過しても黄色の呈色は検出されなかった (Figure 3-3)。つまり、ポリマー単独ゲル内でも  $\beta$ -gal の酵素活性は失活していた。一方、20 分後の時点で  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル内にて ONP 由来の黄色が鮮明に検出され、さらに 60 分後にはゲル全体で色が濃く呈色されたことから、LP 複合ゲル内でも  $\beta$ -gal が活性を維持していることが示された。したがって、LP 複合ゲル内における  $\beta$ -gal 酵素活性の維持は、 $\beta$ -gal と LAPONITE の間の相互作用に起因することが示唆された。

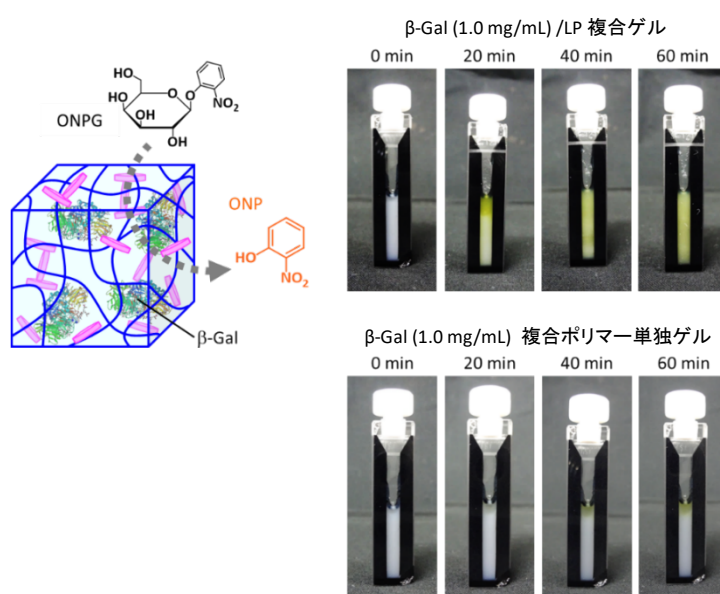


Figure 3-3 ONPG 溶液を添加し、37°C でインキュベート後の  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL)/LP 複合ゲル (上) および  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) 複合ポリマー単独ゲル (下) の写真.

次に、LP 複合ゲル中の  $\beta$ -gal の酵素活性を、基質として TokyoGreen- $\beta$ -gal (TG $\beta$ -gal) を用いた *in vivo* 実験 (マウス皮下) にて調査した。TG $\beta$ -gal は蛍光を示さないが、 $\beta$ -gal との酵素反応により緑色蛍光分子に変換される。つまり、緑色蛍光の強度の増加は、酵素反応の進行を意味する。 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲル前駆溶液をマウスの皮下組織に注射投与すると、瞬時に投与部位にてハイドロゲルを形成した。ゲル注射投与後 1、7、および 14 日目にマウスを安楽死させた後、皮下に形成されたゲルを取り出し、TG $\beta$ -gal と反応させた。投与 1 日後のゲルでは、ゲル全体で緑色の蛍光が検出されたことから (Figure 3-4)、 $\beta$ -gal がゲル内に均一に複合され、さらにその酵素活性が保持されていることが示された。また、7 日後と 14 日後のゲルにおいても、 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルは持続的に強い緑色蛍光強度を示し、*in vivo* で少なくとも 14 日間にわたり  $\beta$ -gal 酵素活性を保持することが明らかとなった。従来 EPT 技術として報告されているバイオマテリアルでは、*in vitro* では少なくとも 7 日間、*in vivo* では 1 日間、

一定レベルの酵素活性を保持することが報告されている<sup>[65,66]</sup>。したがって、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは EPT 技術として従来報告されたバイオマテリアルよりも高い酵素活性維持能力を持つことが示された。 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルにおける長期的な酵素活性維持は、局所作用型 EPT 技術としてタンパク質活性保持ゲルを開発し、臨床応用につなげるために有用かつ重要な特徴である。

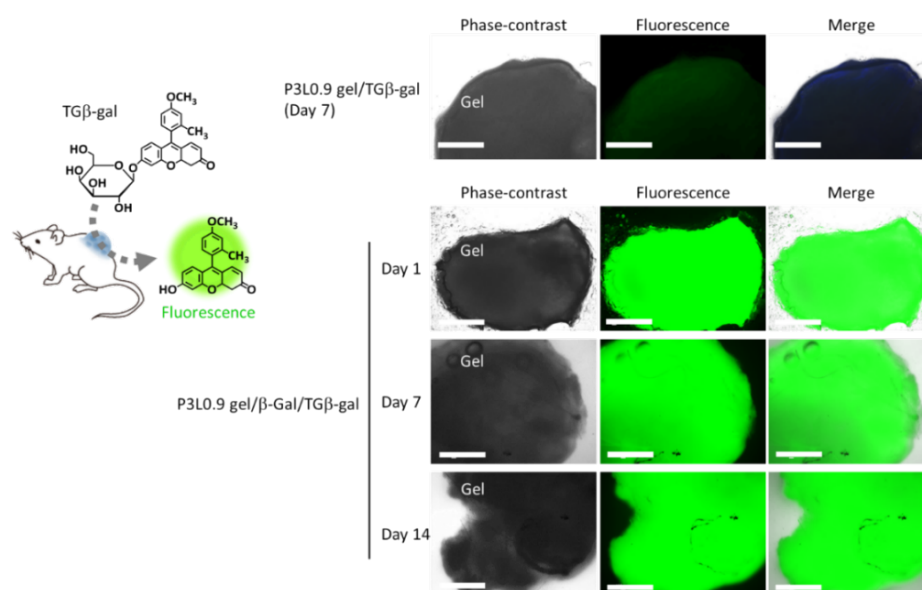


Figure 3-4 皮下に形成された PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE ゲル (上) および皮下にて TG $\beta$ -gal と 1 時間反応させた後に形成された  $\beta$ -gal(1.0 mg/mL)複合 PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE ゲル (下) の蛍光顕微鏡画像. スケールバーは 1 mm を示す.

### 3-3-3 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの $\beta$ -gal 保持特性

LP 複合ゲルは PLGA-PEG-PLGA の加水分解に基づき生分解性を示し、ゲルの分解と共に  $\beta$ -gal が放出されると考えられる。したがって、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの分解性、そして分解に伴う *in vitro* での  $\beta$ -gal の放出を評価した。具体的には、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル及び  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲル上に PBS を加えたのち、37°C でインキュベートした。所定時間後、上清を完全に除去し、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル及び  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲルを凍結乾燥させた。Figure 3-5a は、分解試験中のこれらのゲルの乾燥重量の変化を示している。結果より、両サンプル共に徐々に分解されたが、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲルよりもより大きい分解速度を示した。

次に、各ゲルからの  $\beta$ -gal の放出を調査した。PBS をゲル上加え、37°C で所定時間インキュベートした。その後、ゲルから放出された  $\beta$ -gal の量を定量するために、上清を BCA アッセイにて解析した。コントロールである  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲルでは、 $\beta$ -gal は急速に放出され、19 日後にはわずか 7.5% の  $\beta$ -gal しかゲル内に残っていなかった (Figure 3-5b)。

一方、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは分解速度がポリマー単独ゲルよりも早かったのに対し (Figure 3-5a)、 $\beta$ -gal の放出速度は  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルが大幅に低く、19 日後でも複合した  $\beta$ -gal の 50% 以上がゲル内に残存していた (Figure 3-5b)。これらの結果より、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは  $\beta$ -gal と LAPONITE の間の相互作用によって  $\beta$ -gal の放出速度を遅くすることで、ゲル内に長期間にわたって  $\beta$ -gal を保持可能であることが実証された。

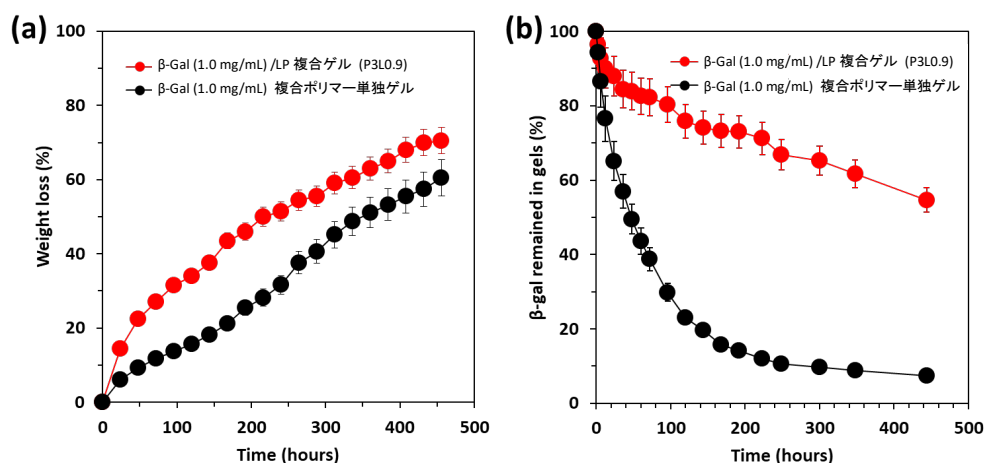


Figure 3-5 (a)  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲルおよび  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) 複合ポリマー単独ゲルの乾燥重量変化 (37°C の PBS 中). 値は 3 つの独立した実験の平均値  $\pm$  標準偏差を表す。(b)  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲルおよび  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) 複合ポリマー単独ゲル中の残存  $\beta$ -gal 量の変化 (37°C の PBS 中). 値は、3 つの独立した実験の平均値  $\pm$  標準偏差を表す。

### 3-3-4 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルから放出された $\beta$ -gal の酵素活性

より高い抗腫瘍活性を持つ局所投与型 EPT 技術を開発するためには、インジェクタブルゲルの分解に伴いゲルから放出された酵素も、投与部位周辺にて活性を維持する必要がある。そのため、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルおよびコントロールである  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲルからゲルの分解に伴い放出された  $\beta$ -gal の酵素活性を *in vitro* 実験にて評価した。その結果、予想通り  $\beta$ -gal 複合ポリマー単独ゲルから放出された  $\beta$ -gal の酵素活性はほぼ完全に失活して

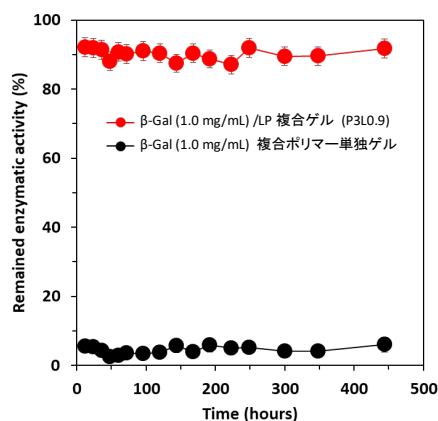


Figure 3-6 ゲル分解過程における  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲルおよび  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) 複合ポリマー単独ゲルから放出された  $\beta$ -gal の酵素活性 (37°C PBS 中). 値は、3 つの独立した実験の平均値  $\pm$  標準偏差を表す。

いた (Figure 3-6)。それに対し、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルから放出された  $\beta$ -gal は、19 日後でも元の酵素活性の 92%を保持した。つまり、たとえゲルに複合した  $\beta$ -gal が  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルから放出されたとしても、腫瘍組織周辺にて抗がん剤プロドラッグを活性型抗がん剤に変換可能であることが示唆された。

### 3-3-5 *In vitro* 及び *in vivo* での $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの抗腫瘍活性

$\beta$ -Gal/LP 複合ゲルの局所作用型 EPT 用インジェクタブルゲルとしての有用性を評価するために、腫瘍モデルの細胞種としてヒトがん細胞株 (MCF-7) を用いて *in vitro* 実験にて細胞死誘導効果を調査した。これらの研究項目では、 $\beta$ -gal との酵素反応によって抗がん剤 5-FU に変換される 5-FU- $\beta$ -gal をプロドラッグとして用いた。Figure 3-7a は、5-FU- $\beta$ -gal の存在下または非存在下で 72 時間、 $\beta$ -gal 複合有りまたは  $\beta$ -gal 無しの LP 複合ゲル存在下にて培養した MCF-7 の生存率を示す。 $\beta$ -Gal/LP 複合ゲルは、5-FU- $\beta$ -gal の存在下で著しく高い細胞毒性を示したのに対し、5-FU- $\beta$ -gal の非存在下で  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは細胞毒性を示さなかった。さらに、 $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲルは、5-FU- $\beta$ -gal の存在下でも細胞毒性を示さなかった。つまりこの結果は、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル内に保持された、または  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル

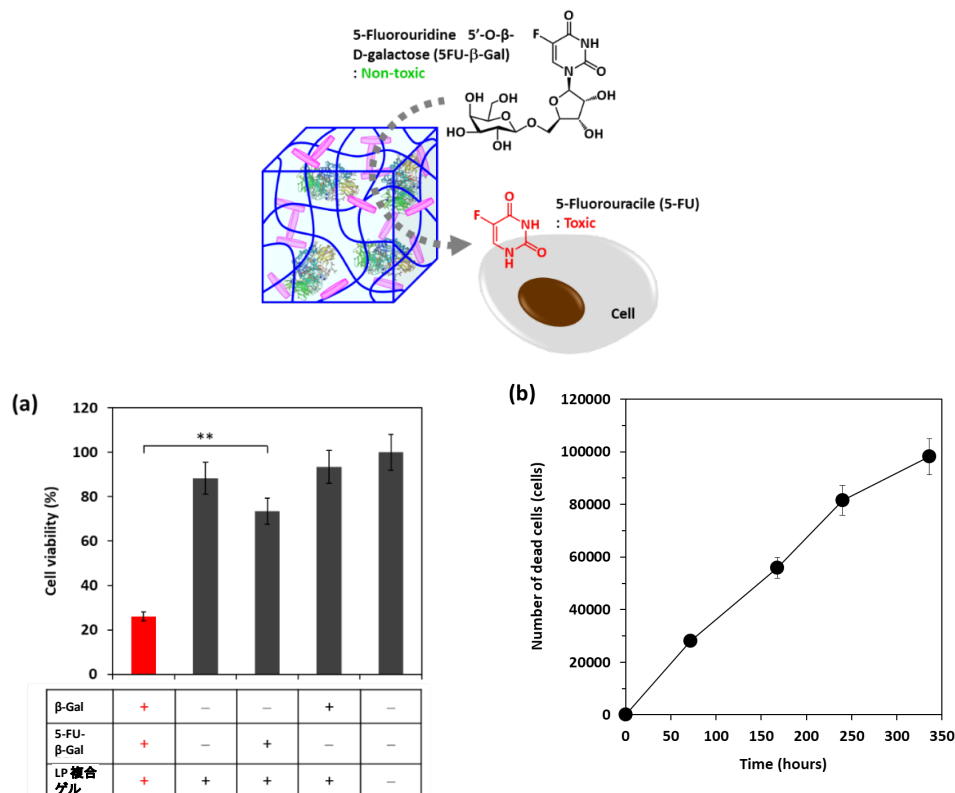


Figure 3-7 (a) プロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal の存在下または非存在下で  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲルおよび LP 複合ゲル処置 72 時間後の MCF-7 生存率。値は、3 つの独立した実験の平均±標準偏差を表す (\*\* $p < 0.01$ )。 (b) 長期間 5-FU- $\beta$ -gal 存在下にて  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲル処置した後の MCF-7 死細胞の累積数。値は、3 つの独立した実験の平均±標準偏差を表す。

から放出された活性  $\beta$ -gal によって変換された 5-FU が細胞毒性を示したことを意味する。また Figure 3-7b は、5-FU- $\beta$ -gal/ $\beta$ -gal/LP 複合ゲル存在下で 14 日間培養後の死細胞の累積数を示しており、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルが少なくとも 14 日間持続的な細胞毒性を示すことが明らかとなった。

最後に、ヒトがん細胞 (PC-3) を移植し成長させた担癌ヌードマウスを用いて、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した。腫瘍サイズが  $70 \text{ mm}^3$  に達した時点で  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆溶液  $100 \mu\text{L}$  を腫瘍付近に 1 回注入した。その後、5-FU- $\beta$ -gal 水溶液を腫瘍と  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの間に局所的に注射投与した。なお、 $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲルをコントロールとして用い、同様の実験を行なった。処置後の腫瘍体積を経時的に測定し、抗腫瘍活性を評価した。その結果である腫瘍体積の成長曲線を Figure 3-8a に示す。5-FU- $\beta$ -gal 存在下にて  $\beta$ -gal を含まない LP 複合ゲルで処置したマウスでは、14 日後に腫瘍体積がほぼ 2 倍に増大していた。一方、5-FU- $\beta$ -gal 存在下にて  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルを処置したマウスでは、腫瘍体積が徐々に減少することが明らかになった。これらの結果より 5-FU- $\beta$ -gal/ $\beta$ -gal/LP 複合ゲル処置群にてみられた抗腫瘍活性は、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル中の活性を維持した  $\beta$ -gal によって変換された 5-FU、またはゲルから放出された 5-FU に起因する可能性がある。この結果において最も重要なことは、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルを 1 度注射投与するだけで、少なくとも 14 日間

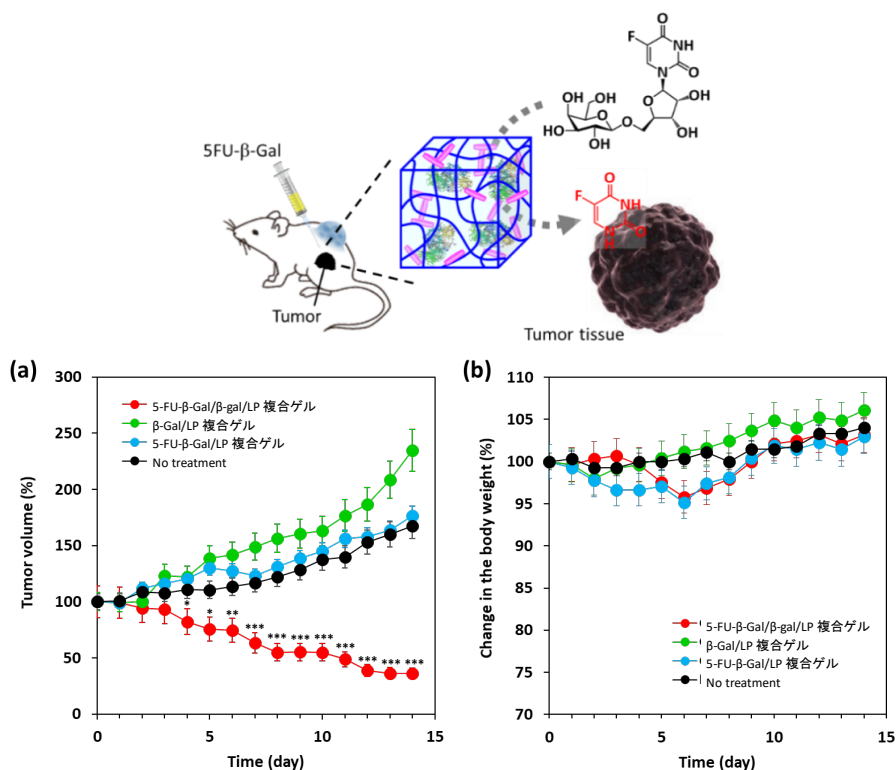


Figure 3-8 (a) プロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal の存在下または非存在下での  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲルおよび LP 複合ゲル注射後の腫瘍体積の変化 (%). 値は、3 つの独立した実験の平均  $\pm$  標準偏差を示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , および \*\*\* $p < 0.005$ ). (b) プロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal の存在下または非存在下での  $\beta$ -gal (1.0 mg/mL) /LP 複合ゲルおよび LP 複合ゲル注射後のマウスの体重変化. 値は、3 つの独立した実験の平均  $\pm$  標準偏差を示す.

に渡り腫瘍体積の減少が持続したことである。また、この実験中どのマウスにおいても有意な体重の変化は観察されなかったことから (Figure 3-8b)、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは大きな副作用を引き起こさないことが示された。これらの結果より、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは新規な局所作用型 EPT 技術開発に有用なインジェクタブルゲルであることが実証された。

### 3-4 結論

本章では、新規 EPT 技術開発のための基盤バイオマテリアルとして、Injectable Gel Factory システムを用いたタンパク質活性保持ゲルを提案する。タンパク質活性保持ゲルは、生体適合性と生分解性を併せ持つ PLGA-PEG-PLGA 共重合体、クレイナノ粒子 LAPONITE、および  $\beta$ -gal をナノレベルで複合し、 $\beta$ -gal をゲルの構成成分の一つとして用いることで構築した。 $\beta$ -gal/LP 複合ゲル前駆溶液は、体温まで温めると急速にゲル化するため、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルは注射器にて簡便に局所投与可能である。また、LP 複合ゲルは LAPONITE と  $\beta$ -gal の相互作用により  $\beta$ -gal 固有の酵素活性を長期的に安定に維持可能であることが明らかになった。さらに、低分子化合物であるプロドラッグ 5-FU- $\beta$ -gal は  $\beta$ -gal/LP 複合ゲルの内部空間にまで浸透し、ゲル内部にてゲルに複合され活性を維持した  $\beta$ -gal によって抗がん剤 5-FU に変換された。さらに、LP 複合ゲルは、ゲル内にて変換された 5-FU をゲルの外部空間に放出可能なバイオマテリアルであることも示された。また、驚くべきことに、 $\beta$ -gal/LP 複合ゲルと 5-FU- $\beta$ -gal を 1 度局所注射投与するだけで、担癌マウスの腫瘍体積が大幅に減少した。これまでに、単回投与のみで腫瘍体積が大幅に減少するような治療技術はほとんど報告されていない。以上の結果より、本章にて設計した  $\beta$ -gal/LP 複合ゲル、つまりタンパク質活性保持ゲルは、生体内でタンパク質の活性を維持した状態でゲルの構成成分として組み込み、さらにゲル内でそのタンパク質を働かせることができる、本研究にて提唱しているコンセプト「Injectable Gel Factory」に基づいたインジェクタブルゲルであることが実証された。またそれだけでなく、タンパク質活性保持ゲルは高い抗腫瘍活性を示したことから、新規局所作用型 EPT 技術の開発にも有用な基盤材料であるということが明らかとなった。

## 第4章 ゲル内にホストと物質・情報の交換が可能な血管網を形成する「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」の開発

### 4-1 序論

本研究の最終目的はInjectable Gel Factory システムの医療応用であり、Injectable Gel Factory とは「様々な性質を持つ生理活性物質がゲルの構成成分の一つとして組み込まれ、それら物質がゲル内部で継続的に働くことで、投与部位にて適切なタイミングで機能発現するシステム」のことである。第3章では、Injectable Gel Factory システムの基盤材料であるLP 複合ゲルに、酵素 (タンパク質) をゲルの構成成分の一つとして組み込み、酵素活性を維持しつつゲル内にて機能発現可能な「タンパク質活性保持ゲル」を開発した。一方で、LP 複合ゲルが医療応用可能なインジェクタブルゲルに求められる機能である、タンパク質以外の生理活性物質をゲルの構成成分の一つとして組み込み、その機能を発現させることが可能であるかは未だ不明である。また、Injectable Gel Factory システムを医療応用につなげるためには、投与部位にて生体が望むタイミングで治療効果を発現可能なインジェクタブルゲルを創製する必要がある。そこで、単にゲル内にて一方的に担持物質が働くのではなく、継続的に、かつ効率的に周辺の生体組織と物質や情報を交換可能とするインジェクタブルゲルを設計する必要があると考えた。生体内にて組織を維持するための主な情報交換網は血管である。したがって第4章では、ホストと物質・情報の交換が可能とする生体血管網と接続した血管網をゲル内に構築可能な「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」の開発に取り組んだ。

組織工学分野において、血管新生は損傷組織の再生、さらには再生した組織の機能回復のために非常に重要であることが知られている。現在、再生医療分野での応用化を目指した組織工学技術研究では、バイオマテリアルに血管新生能を付与する手段として、血管新生成長因子やペプチド<sup>[67-71]</sup>あるいは血管に分化する細胞<sup>[72, 73]</sup>を導入することが代表的な戦略である。しかし、これらの手法には高コスト、発がん性のリスク、安定性及び生着性の低さ、また成長因子においては、生理的環境下での半減期の短さなど複数の問題点が存在する<sup>[74-76]</sup>。そのため、一部分にて血管新生可能なバイオマテリアルは報告されているものの、ホストの血管と繋がった血管網を新生可能な技術はほとんど報告されていない<sup>[77, 78]</sup>。したがって、本章にてホストと物質・情報の交換が可能な血管網をゲル内に構築可能な「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」を開発することは、組織工学分野及び再生医療分野の発展においても非常に重要であると考えられる。

低分子医薬品は、成長因子と比較して生理的環境下での安定性が高く、安価であることから、血管新生を促進する生理活性タンパク質の代替となる可能性がある。低分子薬剤の血管



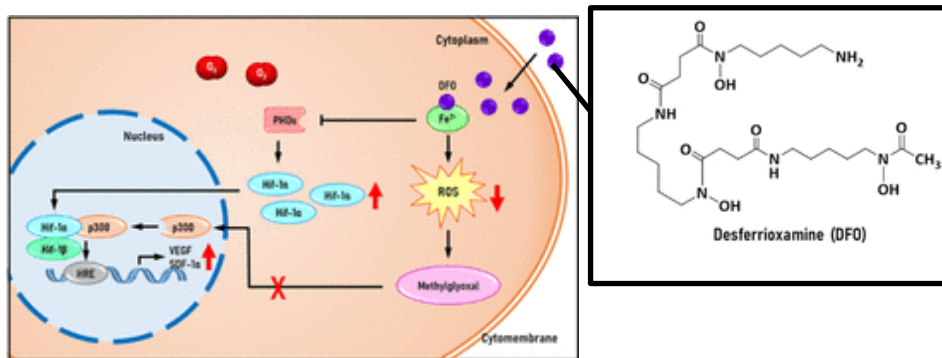


Figure 4-1 DFO の構造及び DFO による HIF-1 $\alpha$  シグナル伝達経路の制御.

新生効果は通常、成長因子に比べて低いですが、血管新生を促進する有望な低分子薬剤が報告されている。デフェロキサミン (DFO) は、細胞内に存在する余剰のフリーの鉄イオンをキレートにより除去することで、hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 及び血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を促進し、血管新生を促進させる働きを持つ低分子薬物である (Figure 4-1)。DFO の水酸基が DFO 分子と遊離鉄イオンを結合可能にすることで、体内にて無毒のキレート化合物が形成される。これまでの研究から DFO は、細胞内の遊離鉄イオンと結合することで HIF-1 $\alpha$  を安定化し増加させ、さらに下流の VEGF 遺伝子の発現を刺激することで、新生血管形成を促進させることが明らかになっている<sup>[79-82]</sup>。このような働きを持つ DFO は、主に血管内皮細胞に作用して血管内皮細胞の組織化を促し、血管新生を促進することが知られている。血管新生には一定の DFO 濃度が必要であるが、DFO の大量投与は細胞毒性があるため、適切な DDS 技術を導入することで DFO の血管新生効果を最大限に引き出すことができるのではないかと考えられてきた。そのため、これまでに DFO を徐放可能とすべく設計されたナノ粒子、ナノファイバー、ハイドロゲルなどの材料を担体として用いた DDS 技術が多数報告されている<sup>[83-92]</sup>。その中でも、局所作用型 DFO デリバリーシステムは多く研究されており、特にハイドロゲルを用いた新規局所投与型 DFO デリバリーシステム研究が活発に行われている<sup>[83, 84, 87, 90-96]</sup>。多くのハイドロゲルは DFO の徐放はわずか数日間であったのに対し<sup>[85, 90-92]</sup>、一部のハイドロゲルは 1 週間以上の DFO 徐放性を達成した。例えば Geng らは、1 週間以上持続的な DFO 放出を示す DFO 担持 gelatin/poly(glycerol-co-sebacic acid-co-L-lactic acid-co-polyethylene glycol)を開発し、このゲルは *in vivo* での血管新生を促進した<sup>[96]</sup>。また Ding らは、1 ヶ月間持続的に DFO を放出する注射投与可能なシルクナノファイバーハイドロゲルを開発し、これらのゲルは皮膚創傷治癒過程において効果的に血管新生を促進した<sup>[83]</sup>。このシルクナノファイバーハイドロゲルが持つ注射投与可能な性質は、低侵襲的な手法であり応用化の観点においても有用である。しかし、DFO は投与部位の周辺に存在する血管内皮細胞に作用して血管新生を促進する。そのため重度な損傷を受けた

組織の場合、その周辺に存在する血管内皮細胞も減少するため、従来のバイオマテリアルに DFO のみを担持する手法では、DFO の血管新生促進効果は減少することが知られている<sup>[94, 97, 98]</sup>。そこで、DFO と血管内皮細胞の併用投与可能な技術を開発すれば、組織工学における新生血管形成促進の有力な代替策になると考えた。しかし、これまでに DFO と血管内皮細胞の併用投与に関する報告はなく、このアプローチの有効性は不明なままである。

これらの先行研究を受け、私は生分解性を示すインジェクタブルゲルに DFO と血管内皮細胞をゲルの構成成分として組み込むことで、「生体内に注射投与すると投与部位にてゲル内部で DFO が血管内皮細胞へと作用することで血管新生を促し、ホストと連結した血管網を形成させ、組織の再建に伴い分解・消失することができるバイオマテリアル」を創製できるのではないかと発想した。本章では、Injectable Gel Factory システムに基づいて設計したインジェクタブルゲルを用いて上記アプローチの有効性を検証するとともに、「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」の開発に取り組んだ。具体的には、Injectable Gel Factory システムの基盤材料である LP 複合ゲルを用いて DFO と血管内皮細胞をゲルの構成成分として組み込んだインジェクタブルゲル、DFO/血管内皮細胞/LP 複合ゲルを作製した。さらに、ゲル内部での血管網新生能およびホストの血管網と新生血管の連結を調査することで、DFO/血管内皮細胞/LP 複合ゲルがホストと連結した血管網をゲル内部に新生することができるのかを評価した。

## 4-2 実験方法

### 4-2-1 DFO/LP 複合ゲルの作製及び特性評価

PLGA-PEG-PLGA は、3-2-2 と同様の手法で合成した。所定の濃度のポリマー水溶液を調製するために合成した P<sub>3k</sub> を量りとり、所定量のアセトンに溶解したのち、各サンプルにアセトンと等量の純水を加え、さらに所定量の DFO 水溶液 (0.1, 0.3, 0.5, 1.0%) を加えた。その後、減圧処理によりアセトンを完全に除去し、DFO 混合ポリマー水溶液を所定濃度で調製した。等量の LAPONITE 水溶液 (特定の濃度) を各 DFO 混合ポリマー水溶液に添加し、攪拌して DFO/LP 複合ゲル前駆溶液を所定の複合比で調製した。この組成の異なるゲル前駆溶液を 4℃で 10 分間インキュベートした後、温度応答性のゾル-ゲル転移を試験管反転法及びレオロジー分析 (MCR302, Anton Paar) により解析した。また、ゲルネットワークを視覚化するために、ゲルを凍結乾燥し、四酸化オスミウムでコートしたのち、ゲル構造を SEM (JSM-7001FA, JEOL) で観察した。ゲルの細孔サイズを SEM 画像を使用して分析し、値を平均値 ± 標準偏差 (N = 15)として示した。

#### 4-2-2 DFO/LP 複合ゲルの DFO 放出特性評価

異なる組成の LP 複合ゲルに異なる濃度の DFO を複合した DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1, P10L1.1) を 4-2-1 と同様に調製した。ゲルサンプル (総量: 500  $\mu$ L) を 15 mL プラスチックチューブに移し、PBS (5.0 mL, pH 7.4, 140 mM) を各ゲル上にゆっくりと加え、チューブを  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  にてインキュベートした。所定時間後、各チューブから上清を除去し、新鮮な PBS (5 mL) を加えた。放出された DFO を定量するため、 $\text{FeCl}_2$ /PBS 溶液 (1%, 200  $\mu$ L) を上清に加え、混合した。10 分後、混合物の吸光度を UV-Vis 分光光度計により測定した (485 nm, 室温)。放出された DFO の量は、DFO 標準曲線に基づいて算出した。

#### 4-2-3 マウス筋芽細胞の生死判定

マウス筋芽細胞 (C2C12) は 10% ウシ胎児血清添加 DMEM 培地で培養した ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%)。DFO/LP 複合ゲルをガラスボトムディッシュ内に調製した。細胞培養容器内で培養した C2C12 をトリプシン処理により回収し、培地で懸濁したのち遠心分離により回収した。細胞ペレット (細胞:  $5.0 \times 10^5$  個) を培地で再懸濁し、DFO/LP 複合ゲル上に播種し、その後、細胞をインキュベーター内で培養した ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%)。一定時間 (1, 3 日) 培養後、ヨウ化プロピジウム (PI) 溶液と Calcein-AM 溶液をゲル上加え、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。次に、ゲルを PBS (500  $\mu$ L) で 3 回洗浄したのち、共焦点レーザー走査顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM700) 観察を行なった。

#### 4-2-4 ヒト臍帯血管内皮細胞の環状構造形成評価

ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) は、内皮細胞増殖培地-2 (EGM-2) BulletKit (Lonza) を使用して培養した ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%)。異なる DFO 濃度 (0, 0.5, 1.0%) の DFO/LP 複合ゲルをガラスボトムディッシュ上に調製した。DFO/LP 複合ゲルの血管新生能を *in vitro* で検証するため、HUVEC ( $2.0 \times 10^5$  個) を DFO/LP 複合ゲル上に播種し、培養した。1 日間培養した後、HUVEC を Calcein-AM で染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡観察を行なった。ImageJ ソフトウェアを使用して得られた画像を分析し、環状構造形成を評価した。コントロールとして、1.0% DFO 含有培地の存在下で HUVEC を培養した。

#### 4-2-5 DFO/LP 複合ゲルの *in vivo* ゲル形成

ヌードマウス (BALB/c-nu/nu, 5 週齢、雌) をイソフルランにより麻酔をかけた。DFO と HUVEC 複合した LP 複合ゲル (P5L1.1) の *in vivo* ゲル形成を確認するため、HUVEC ( $1.0 \times 10^6$  個) を 200  $\mu$ L の DFO (1.0%) /LP 複合ゲル前駆溶液に懸濁し、26G 針付注射を用いて背面の皮下筋層に注射投与した。1 時間後、マウスを安楽死させてゲル形成を評価した。

#### 4-2-6 DFO/LP 複合ゲルの *in vivo* 血管新生能

マウス (Cr1/ICR, 5 週齢, 雌) をイソフルランで麻酔した。異なる DFO 濃度 (0.1, 0.3, 0.5, 1.0%) の DFO/LP 複合ゲル前駆溶液 200  $\mu$ L を、26G の針付注射器を用いて背面の皮下筋層に注射投与した。21 日後、PBS 中のテトラメチルローダミンイソチオシアネート-デキストラン溶液 ( $M_w$ : 150000, 1%) 200  $\mu$ L を尾静脈に注射投与した。1 時間後、マウスを安楽死させてマウス皮下からゲルを取り出し、共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察した。また、DFO による血管新生促進メカニズムを調べるために、*in vivo* 実験後に DFO (1.0%) /LP 複合ゲル (P5L1.1) の免疫蛍光染色を行なった。マウス (Cr1/ICR, 5 週齢, 雌) をイソフルランで麻酔した。DFO/LP 複合ゲル前駆溶液 200  $\mu$ L を、26G 針付注射器を用いて背面の皮下筋層に注射投与した。21 日後にゲルを含む皮膚組織を取り出し、凍結薄切片サンプルを作製した。ゲル中の HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、および CD31 の発現を免疫組織学染色によって解析した。

#### 4-2-7 DFO/HUVEC/LP 複合ゲルの *in vivo* 血管新生能

ヌードマウス (BALB/c-nu/nu, 5 週齢, 雌) をイソフルランで麻酔した。HUVEC ( $5.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $3.0 \times 10^6$  個) を 200  $\mu$ L の DFO (1.0%) 複合 PLGA-PEG-PLGA/LAPONITE ゲル前駆溶液に懸濁し、26G 針付注射器を用いて背面の皮下筋層に注射投与した。21 日後、PBS 中のテトラメチルローダミンイソチオシアネート-デキストラン溶液 ( $M_w$ : 150000, 1%) 200  $\mu$ L を投与した。1 時間後にマウスを安楽死させ、マウス皮下からゲルを取り出し、共焦点レーザー走査顕微鏡観察を行なった。

### 4-3 結果と考察

#### 4-3-1 DFO/LP 複合ゲルの特性評価

所定濃度の P<sub>3k</sub> 溶液と LAPONITE 溶液を混合することによって、異なる組成比率の LP 複合ゲル (P5L1.1 及び P10L1.1) を調製した。これまでに我々の研究グループは、LP 複合ゲルのネットワーク構造が、PLGA-PEG-PLGA ミセルと LAPONITE の階層的な自己組織化を介して構築されることを報告している<sup>[63]</sup>。その結果、<sup>1</sup>H-NMR および FTIR 分析により LAPONITE の水酸基とミセルの PEG セグメントのエーテル酸素分子との水素結合が主な相互作用であることが明らかになった。これより、PLGA-PEG-PLGA ミセルの PEG セグメントは LAPONITE の平面に結合し、その相互作用によりゲルの物理的な架橋点を形成していることが示された。また、ポリマー単独ゲル前駆溶液は可逆的に熱ゲル化するが、LP 複合ゲル前駆溶液は、LAPONITE と PLGA-PEG-PLGA ミセルの相互作用により物理的架橋点を形成し、不可逆的に熱ゲル化することが確認された (ゲル化温度以上に加熱して一度ゲルを

形成したら、ゲル化温度以下に冷却してもゲルを維持する)。DFO は、上記のような LAPONITE と水素結合を形成することができる 3 つの水酸基と 2 つのアミド基を含み、さらに LAPONITE と静電相互作用を形成することができる 1 級アミノ基も含んでいる。このような DFO の特徴や、PLGA-PEG-PLGA ミセルと LAPONITE の相互作用が熱ゲル化挙動に及ぼす影響を考慮すると、DFO/LP 複合ゲルのゲル化挙動は DFO によって影響を受ける可能性があると考えられた。そこで、DFO/LP 複合ゲルの熱応答性ゾル-ゲル転移挙動に及ぼす DFO の影響について検討した。Figure 4-2a は、異なる濃度の PLGA-PEG-PLGA (5.0%, 10.0%) と LAPONITE 1.1% からなる LP 複合ゲルの異なる濃度の DFO (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%) 存在下における相図を示したものである。また Figure 4-2b は、様々な濃度の DFO 存在下における LP 複合ゲル (P5L1.1) の 15°C および 37°C での写真である。結果より、様々な DFO 濃度及びゲル組成において温度応答性のゲル化を示し、37 °C では半透明のゲルが形成されることが示された。この温度上昇によるゲル化は完全に不可逆的であり、得られたハイドロゲルは対応するゲル化温度以下まで温度を下げても溶液状態に変化しなかった。さらに、ゲル化温度は DFO の濃度に強く影響されていることが示された。特に、ゲル化温度は DFO の量の増加とともに著しく低下したことから、DFO がゲルネットワーク形成を促進することが示唆された (Figure 4-2a)。つまり、DFO/LP 複合ゲルのゲルネットワーク形成の促進に LAPONITE と DFO の間の相互作用が関連していると考えられる。

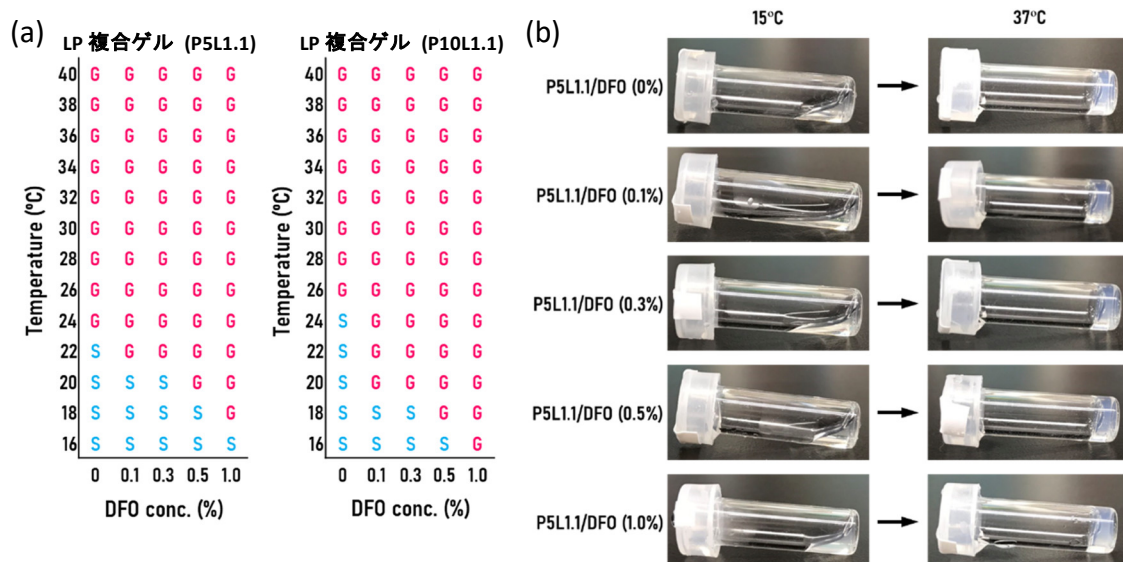


Figure 4-2 (a) 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1 及び P10L1.1) の相図。S と G はそれぞれゾルとゲルを示す。(b) 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) のゾル-ゲル転移の写真。

異なる量の DFO (0.1, 0.3, 0.5%) の存在下で LP 複合ゲル (P5L1.1) のレオロジー特性を調べた結果、P5L1.1 の機械的強度は、DFO 濃度に強く影響された (Figure 4-3)。特に、ゲルの機械的強度は DFO の濃度が上昇するにつれて顕著に増加した。37 °C における DFO (0.1%)

/LP 複合ゲル (P5L1.1)、 DFO (0.3%) /LP 複合ゲル (P5L1.1)、 DFO (0.5%) /LP 複合ゲル (P5L1.1) の貯蔵弾性率はそれぞれ 232、353、587 Pa であった。これらの結果より、DFO と LAPONITE の相互作用部位が物理的な架橋点として働くことで、よりゲルネットワークの形成を容易にしていることが示唆された。

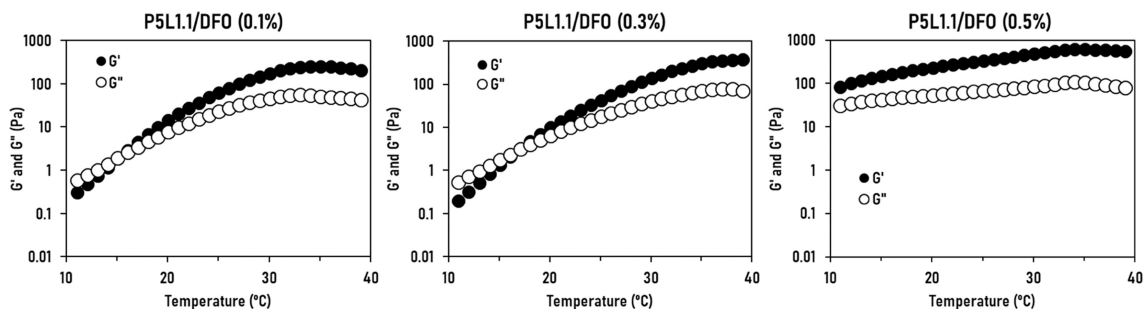


Figure 4-3 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) 前駆溶液における貯蔵弾性率 ( $G'$ ) および損失弾性率 ( $G''$ ) のプロット。

次にゲルネットワーク構造に対する LAPONITE と DFO の相互作用を評価するために、異なる濃度の DFO (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%) を複合した DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) を SEM にて観察した (Figure 4-4a)。Figure 4-4b より、DFO の量が増えるにつれてゲルの平均ポアサイズが著しく減少している。これは、DFO の濃度が高い DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) は、高い架橋密度とそれに伴う小さなポアサイズを持っていることを示す。熱ゲル化挙動とゲルネ

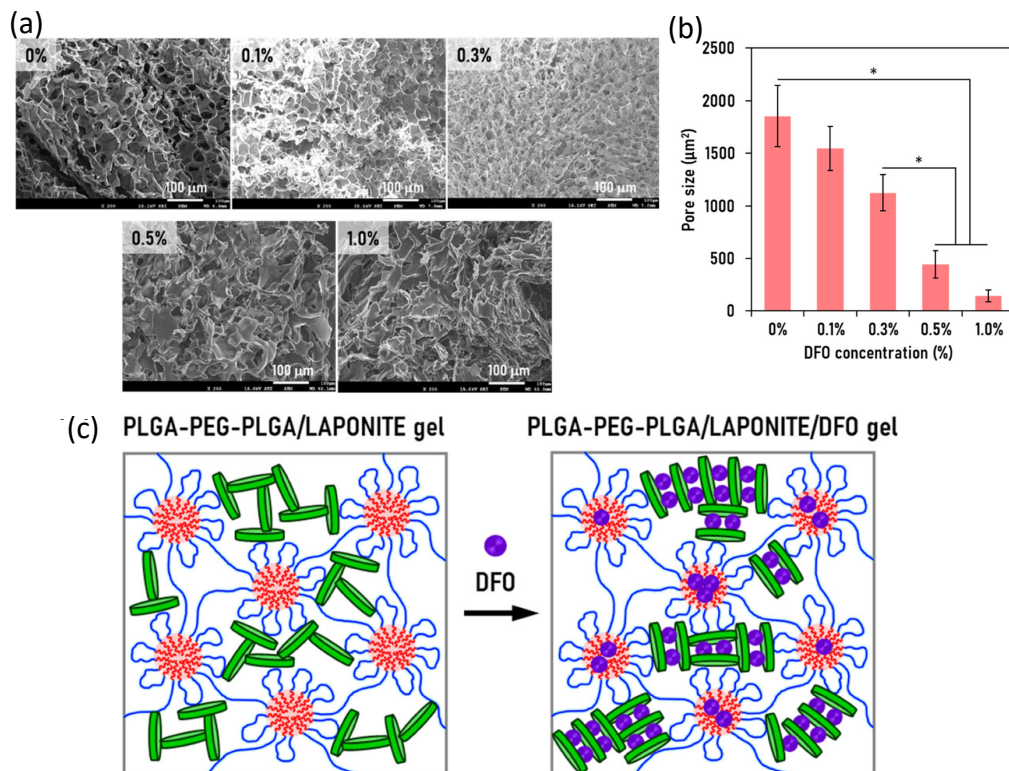


Figure 4-4 (a) 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) の SEM 画像。(b) ゲルの細孔サイズ (面積)。値は、3 つの独立した画像から得られた平均±標準偏差を示す (\* $p < 0.05$ )。 (c) DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) の概念図。

ネットワーク構造解析の結果を総合すると、DFO はゲル中の LAPONITE と相互作用し、その結果として相互作用部位がゲルの物理的架橋点として作用し、Figure 4-4c に示すように PLGA-PEG-PLGA ミセル、LAPONITE、DFO からなるハイブリッドゲルネットワークの形成を促進することが明らかになった。

#### 4-3-2 DFO /LP 複合ゲルの DFO 放出特性

DFO の働きにより生体内にて新生血管形成を促進するためには、DFO/LP 複合ゲルから DFO を持続的に徐放することが不可欠である。そこで、PLGA-PEG-PLGA (5 および 10%)、LAPONITE (1.1, 1.3 および 1.5%) および DFO (0.5 および 1.0%) を用いて、異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲルから放出された DFO 量を *in vitro* 実験にて調べた。その結果、初期バーストによる DFO/LP 複合ゲルからの DFO 放出は、低濃度 (0.5%) の DFO を複合したゲルにて 1 日目時点で観察され、PLGA-PEG-PLGA および LAPONITE の濃度に関係なく、この期間に約 40% の DFO が放出された (Figure 4-5a)。このバースト放出の後 DFO 放出速度は減少し、2 日目から 12 日目までゆっくりとした放出が観察された。一方、1.0% の DFO を複合した DFO/LP 複合ゲルではバースト放出は生じず、12 日間にわたり DFO の持続的な徐放を示した (Figure 4-5b)。このように、DFO (1.0%) /LP 複合ゲルからの DFO 放出は、DFO (0.5%) /LP 複合ゲルよりも著しく遅かった。上記のように、DFO と LAPONITE の結合部位はゲルの物理的な架橋点として機能し、高密度のゲルネットワークの形成を促進する。したがって、DFO (1.0%) /LP 複合ゲルは、DFO (0.5%) /LP 複合ゲルよりも高い架橋密度を有すると考えられる。このように、DFO (1.0%) /LP 複合ゲルで観察されるバースト放出を伴わない遅い DFO 放出は、DFO-LAPONITE 間の相互作用を介してゲルネットワークに DFO が取り込まれたためであると考えられる。つまり、DFO の放出速度は LP 複合ゲルに複合する DFO の濃度を変化させることによって制御することができる。

現在のインジェクタブルゲルを用いた低分子薬物の放出速度制御の典型的なアプローチは、ゲルネットワークを構成する高分子の量を増やすことでゲルの細孔径を小さくする方法である。しかし、ポリマーの量を多くして調製したゲルであっても、通常ゲルの細孔径は低分子薬物よりも大きくなるため、根本的な問題解決には至らない。これに対して、本 LP 複合ゲルは「self-controlled release system」というアプローチに基づいている。これまでに、self-controlled release system に関するいくつかの研究が報告されており<sup>[99-103]</sup>、それらは全てグルコースやマトリックスメタロプロテアーゼなどの特定の刺激分子の高濃度存在下で、材料からの薬物放出が誘導されるという特徴を持つ技術である。一方、本研究にて設計した DFO/LP 複合ゲルによる DFO 放出動態は、従来法のような外部刺激分子を用いる方法ではなく複合された DFO 自身によって制御されている。したがってこの自己制御型 DFO 放出

システムは、従来法とは異なるメカニズムにより制御されたユニークなものであり、まさに薬物である DFO が LP 複合ゲルの構成成分として、ゲルそのものの特性を制御していることが実証された。

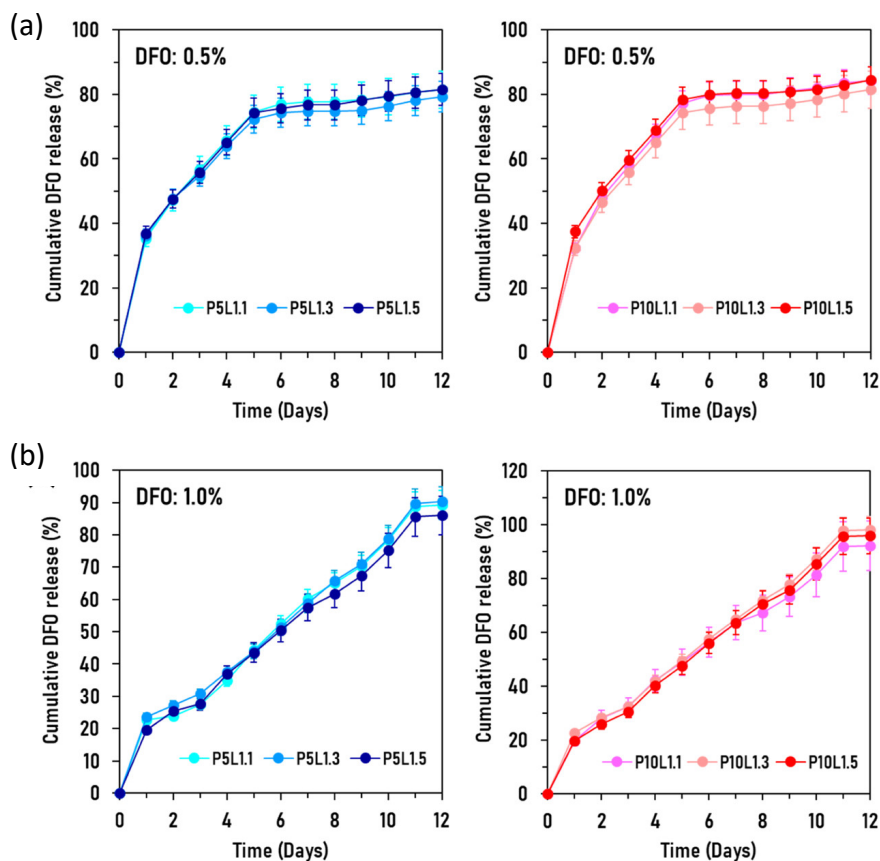


Figure 4-5 (a, b) DFO (0.5%) /LP 複合ゲル (a) 及び DFO (1.0%) /LP 複合ゲル (b) による *in vitro* DFO 放出試験.

#### 4-3-3 DFO/LP 複合ゲルの細胞適合性

非常に高い濃度の DFO が細胞毒性を示すことはよく知られている。そこで、異なる濃度の DFO (0, 0.5, 1.0%) 存在下での DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) の細胞適合性を調査するために、マウス筋芽細胞 (C2C12) を用いた *in vitro* 生死判定を行なった。なお、本実験以降は、LP 複合ゲルの組成比を P5L1.1 に固定して実験を行なった。実験の結果、DFO の量に依存せず、どの DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲルにおいても死細胞は検出されなかった (Figure 4-6a)。これらの DFO/LP 複合ゲル上で培養した C2C12 は、複合した DFO の量に関係なく培養開始 1 日目の時点で接着した形態を示した (Figure 4-6b)。この良好な細胞接着は、実験期間中 (3 日間) 維持された。さらに、DFO/LP 複合ゲル上で培養した C2C12 は、DFO を担持しない LP 複合ゲル上で培養した細胞と同様の増殖率を示した (Figure 4-6c)。前述のように、異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) からは、初めの 3 日間で約 30~55%の DFO



が放出されることが確認されている。これらの結果より、DFO (0.5%, 1.0%) /LP 複合ゲルから放出された DFO の量は、周囲組織に存在する細胞に対して細胞毒性を示さないことが明らかになった。

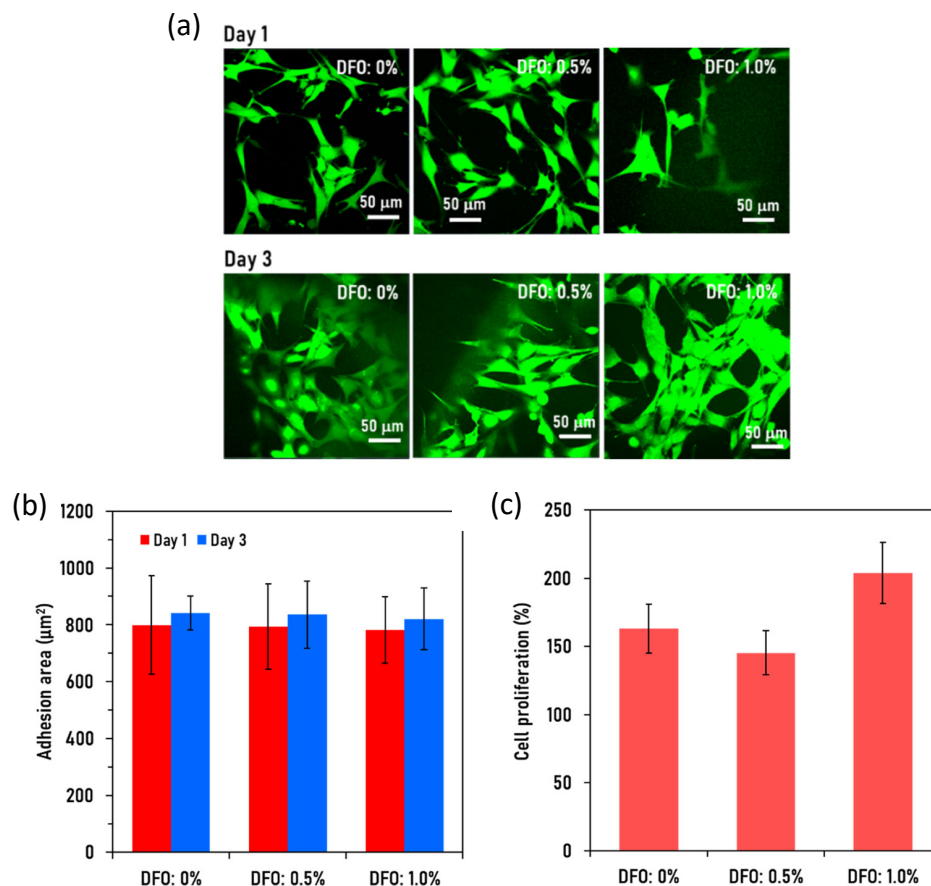


Figure 4-6 (a) 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) で 1 日間および 3 日間培養した C2C12 の代表的な CLSM 画像。細胞増殖は、生死細胞判定法にて評価した (緑: Calcein-AM、赤: PI)。(b) 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) で 1 日間および 3 日間培養した C2C12 の接着面積。(c) 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) で 2 日間培養した C2C12 の増殖率。(b, c) の値は全て、3 つの独立した実験の平均±標準偏差を表す。

Schmidt らは、異なる濃度の LAPONITE を含む LAPONITE/PEG ゲル上で培養したマウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) の接着と増殖を報告している<sup>[104]</sup>。彼らの報告結果より、40%LAPONITE を含むゲルで培養した MC3T3-E1 は接着率と増殖率が低かったが、70%LAPONITE を含むゲルで培養した細胞は良好な接着率と増殖率を示した。同様に、LAPONITE 濃度が低いゲルにてヒト間葉系幹細胞は接着または増殖を示さなかったが、LAPONITE 濃度が高いゲルでは良好な接着および増殖を示した。これらの報告から Schmidt らは、ゲルのポリマー成分である PEG は生体不活性で細胞に接着部位を提供しないため、もう一つの構成成分である LAPONITE が細胞に接着部位を提供すると結論付けた。本研究結果においても同様に、DFO/LP 複合ゲルのポリマー成分である PLGA と PEG はどちらも細胞接着性を持たないため、DFO/LP 複合ゲルに複合された LAPONITE が細胞接着性を示

したと考えられる。興味深いことに、本研究にて設計した DFO/LP 複合ゲルの LAPONITE 濃度はわずか 1.1%であったが、細胞の足場として機能し、細胞の接着と増殖を可能にした。本研究にて設計した DFO/LP 複合ゲルと Schmidt らのゲルの主な違いは、ゲルの生分解性の有無である。DFO/LP 複合ゲルは PLGA セグメントの加水分解により生分解性を示すが、Schmidt らの LAPONITE/PEG ゲルは生分解性を持たない。このことから、本研究にて設計した DFO/LP 複合ゲルでは、時間経過と共に加水分解が生じることで細胞に空間を与えることができ、その結果、細胞にとって適度な 3 次元の足場を提供できたことで低い LAPONITE 濃度のゲルであっても細胞足場として機能できたと考えられる。つまり、LAPONITE と複合する高分子の生分解性は、LAPONITE の生物学的機能をより高い効果で引き出すためにも不可欠であると考えられる。

#### 4-3-4 DFO/LP 複合ゲル上のヒト臍帯血管内皮細胞による環状構造形成

DFO は *in vitro* にて HUVEC の環状構造形成 (自己組織化) を促進することが知られている。そこで、DFO/LP 複合ゲル上で培養した HUVEC による *in vitro* での血管形成について評価した。DFO 濃度を 0、0.5、1.0%と変化させ、HUVEC の環状構造形成能に及ぼす DFO の影響を評価した。また、市販の細胞培養シャーレ (TCPS) 上で培養した HUVEC による環

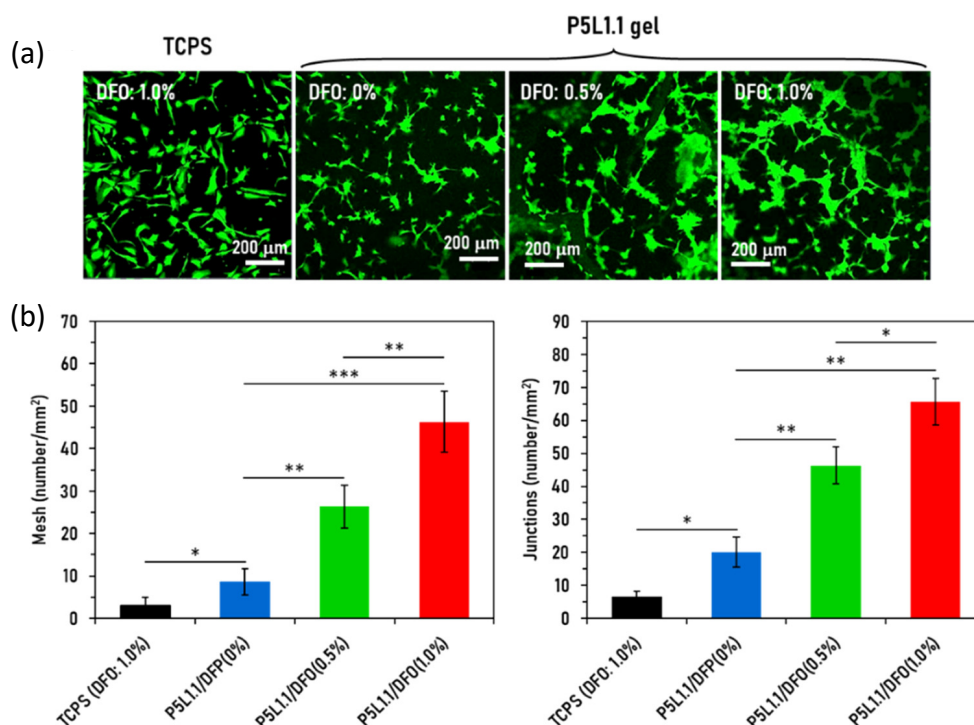


Figure 4-7 (a) DFO (1.0%) の存在下で 1 日間、異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) 及び通常の細胞培養皿 (TCPS) 上で培養された HUVEC の管形成の代表的な CLSM 画像。なお、HUVEC は Calcein-AM で染色した。(b) 蛍光画像に基づく管形成の定量分析 (網目数と分岐数)。値は 3 つの独立した実験の平均 ± 標準偏差を表す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ ).

状構造形成を培地に DFO (1.0%) が存在する条件下で調べた。その結果、0.5 および 1.0% の DFO を複合した LP 複合ゲル上で培養した HUVEC は、DFO を含まない LP 複合ゲル上で培養した細胞よりも高い環状構造形成能を示した (Figure 4-7a)。さらに、HUVEC の環状構造形成は、DFO 濃度が上昇するにつれて有意に増加した。また、DFO (1.0%) /LP 複合ゲルは、DFO (0.5%) /LP 複合ゲルと比較して、有意に高い網目数及び分岐数を示した (Figure 4-7b)。これらの結果は、DFO/LP 複合ゲルから放出された DFO が、ゲル表面に存在する HUVEC に作用していることを示している。なお、TCPS では 1.0% の DFO を含むにもかかわらず環状構造形成は見られなかったことから、DFO/LP 複合ゲルが DFO の担体及び HUVEC の足場として機能することで、*in vitro* 環状構造形成を促進させている可能性が示唆された。

#### 4-3-5 DFO/LP 複合ゲルによる *in vivo* 血管新生

組織工学用途に使用されるインジェクタブルゲルは、DFO および HUVEC の存在下でゲル前駆溶液を注射投与するとその場でゲルを形成し、投与部位にとどまる必要がある。したがって、*in vivo* での DFO/LP 複合ゲルのゲル形成能を調べた。その結果、DFO/LP 複合ゲル前駆溶液は 26G の針付注射器によりマウスの皮下組織に容易に注入でき、*in situ* で 5 分以内にゲルを形成した。

そこで次に、LP 複合ゲルの血管新生技術への応用の可能性や既知の生体適合性、および注射投与による低分子薬剤や細胞の送達能力などの複数の長所を踏まえ、LP 複合ゲルを用いた *in vivo* 血管新生試験を行なった。はじめに、さまざまな濃度の DFO (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%) を使用して、DFO/LP 複合ゲルの血管新生を評価した。DFO/LP 複合ゲルをマウスの皮下組織に投与したのち、21 日後にテトラメチルローダミンイソチオシアネート-デキストラン溶液を尾静脈から注射投与することで、ゲル内に新しく形成された血管かつホストの血管網と繋がった血管を視覚化した。その結果、テトラメチルローダミンイソチオシアネート-デキストランの赤色蛍光は、DFO を含まない LP 複合ゲルでは検出されず (Figure 4-8a)、ゲル内にてホストと接続した血管が新生されなかったことが示された。対照的に、DFO/LP 複合ゲルでは強い赤色蛍光が検出されたことから、ゲル内にて血管新生が生じ、さらにその新生血管がホスト由来の血管と接続されていることが示された。また DFO/LP 複合ゲルでは、DFO 濃度の上昇に伴って分岐点の数と新生血管の直径が大幅に増加したことから (Figure 4-8b, c)、血管新生が DFO の生物学的活性によるものであると考えられた。重要なことに、本実験では DFO のみが投与されたため、ゲル内に形成された血管はホスト由来の静脈内皮細胞で構成されており、ゲルから放出された DFO がホストの皮下組織周辺の静脈内皮細胞に作用したことを示している。特に、DFO (1.0%) /LP 複合ゲルでは多数の血管がゲル内に新

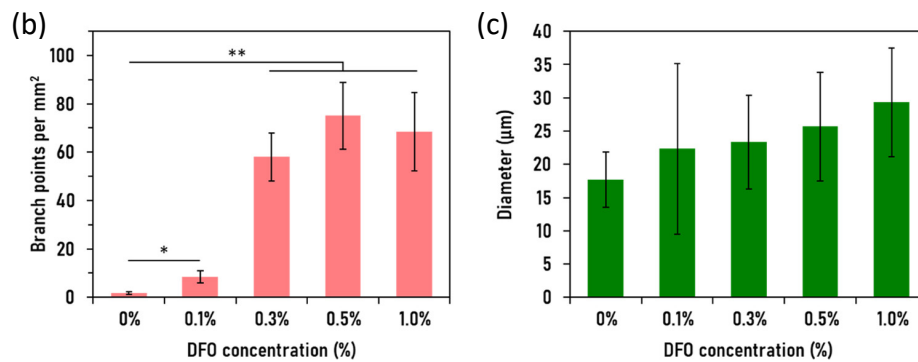
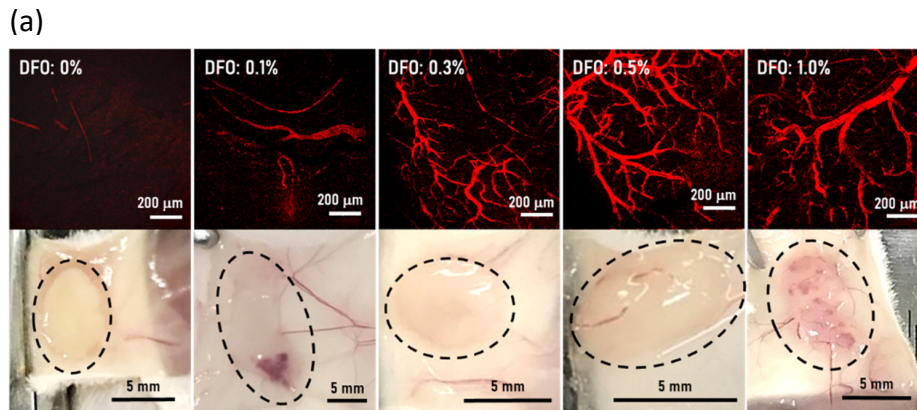


Figure 4-8 (a) 異なる DFO 濃度の DFO/LP 複合ゲル (P5L1.1) 及び通常の細胞培養皿 (TCPS) 上で 1 日間培養された HUVEC による環状構造形成の代表的な CLSM 画像。なお、HUVEC は Calcein-AM で染色した。(b) 蛍光画像に基づく環状構造形成の定量分析 (分岐数と血管直径)。値は 3 つの独立した実験の平均±標準偏差を表す (\* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.01$ 、\*\*\* $p<0.005$ )。

生されたため、ゲルは淡い赤色を示した (Figure 4-8a)。前述のように、DFO (1.0%) /LP 複合ゲルは、独自の自己制御薬物放出システムにより DFO の持続的な徐放可能である。従って、DFO (1.0%) /LP 複合ゲルの高い血管新生効果は、self-controlled DFO release システムに起因する可能性がある。そこで、DFO の作用に関連するタンパク質の発現を評価するために、皮下組織に 21 日間移植した DFO (1.0%) /LP 複合ゲルにおける HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、および CD31 の免疫蛍光染色を実施した (Figure 4-9)。その結果、HIF-1 $\alpha$  と VEGF の発現はゲルの全領域で検出され、ゲルで観察された血管新生は DFO の生物学的特性によるものである可能性が

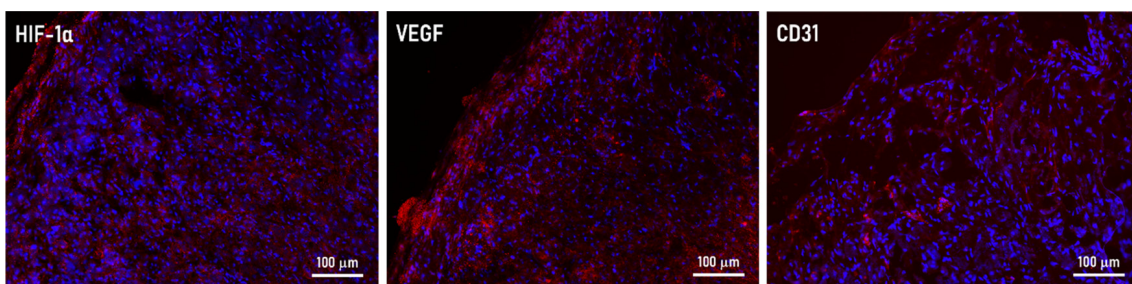


Figure 4-9 マウスの皮下に形成された DFO (1.0%) 複合 P5L1.1 ゲルを抗 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、および CD31 抗体を用いて免疫組織染色を行なった蛍光顕微鏡画像。青: DAPI、赤: HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、CD31 (Alexa Fluor 567)。

示唆された。さらに、ゲル内の管腔構造の周囲に CD31 発現細胞が検出されたことから、ゲル内での血管新生が実証された。これらの結果をまとめると、DFO /LP 複合ゲルは DFO の担体及び HUVEC の足場として機能することで、*in vivo* 血管新生を促進させている可能性が示唆された。

#### 4-3-6 DFO/HUVEC/LP 複合ゲルによる *in vivo* 血管新生

次に、血管新生効果に対する DFO と HUVEC の併用投与の効果を評価するために、LP 複合ゲルを用いた DFO と静脈内皮細胞の併用投与による *in vivo* 血管新生を評価した。本実験では、ゲル中の DFO 濃度を 0.1%に固定し、HUVEC の数を変化させた ( $5.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $3.0 \times 10^6$  個)。結果より、HUVEC を含まない DFO/LP 複合ゲルでは限られた血管新生しか観察されなかったが (Figure 4-8a)、DFO/HUVEC/LP 複合ゲルでは全てのサンプルにおいて成熟した血管網が検出された (Figure 4-10a)。この結果より、同じ LP 複合ゲルを用いた DFO 単独投与よりも、LP 複合ゲルを用いて DFO と HUVEC を併用投与した方がより効果的に血管新生を促すことが実証された。また、ゲルに複合する HUVEC 数の増大に伴い、血管網の分岐点数は減少し血管直径は太くなったことから (Figure 4-10b, c)、複合する HUVEC の数によりゲル内部に構築する血管のタイプ (毛細血管, 成熟血管) を制御できる可能性が示さ

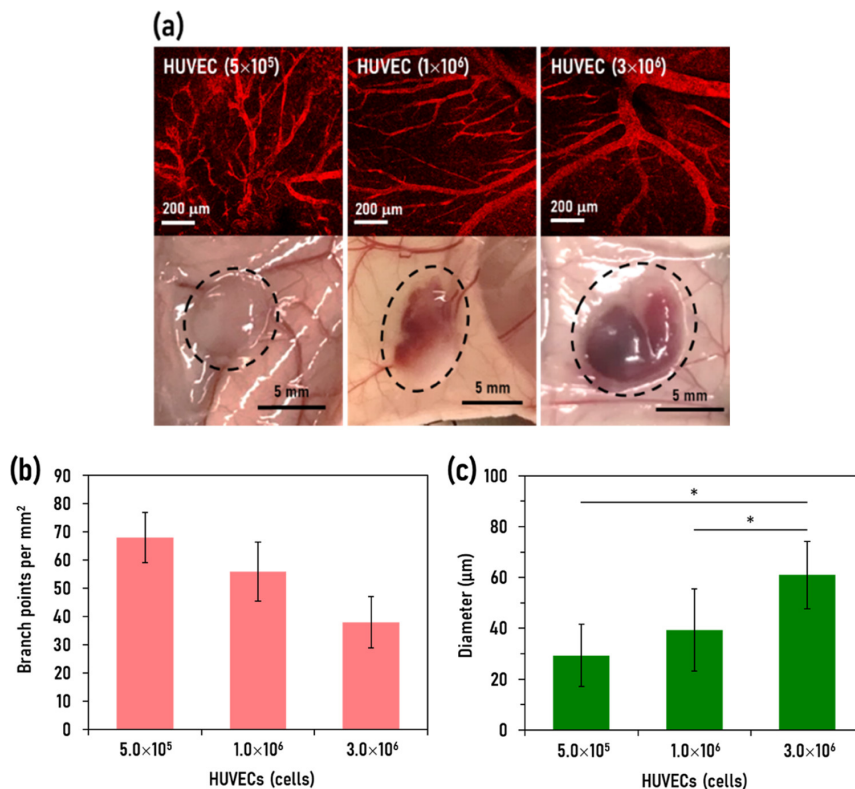


Figure 4-10 (a) マウスの皮下に形成された DFO (0.1%)/HUVEC ( $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ) 複合 P5L1.1 ゲルの代表的な CLSM 画像. 赤: 新生血管 (テトラメチルローダミンイソチオシアネート-デキストラン). (b, c) ゲル中の新生血管の分岐数 (b) 及び直径 (c). 値は全て 3 つの独立した実験の平均  $\pm$  標準偏差を表す (\* $p < 0.05$ ).

れた。なお、DFO (0.1%) と多数の HUVEC ( $1.0 \times 10^6$  または  $3.0 \times 10^6$  個) の両方を複合した DFO/LP 複合ゲルはより濃い赤色を呈しており、これらのゲル中に大きな血管が形成されていると考えられる。これまでに報告された DFO 担持ゲルの多くは、DFO の生物学的機能に基づき、安定した DFO の担持と血管形成の促進を達成しているが<sup>[83, 85, 87, 90-96]</sup>、これらのハイドロゲルによる細胞輸送能力については報告されていない。従って、本研究にて設計した DFO/HUVEC/LP 複合ゲルは低分子薬剤と細胞の両者を安定的にゲル内に担持し、さらにそれらを体内の所望の部位に局所投与可能であるため、従来組織工学分野にて DFO の担体として報告されているインジェクタブルゲルと比較して、より治療効果が高かつ簡便な技術であると考えられる。

#### 4-4 結論

本章では、LP 複合ゲルを用いた DFO と HUVEC の併用投与により血管新生を促進可能とする新しい組織工学技術を提案する。この DFO/HUVEC/LP 複合ゲルは、生体適合性と生分解性を有する PLGA-PEG-PLGA ミセルとクレイナノ粒子 LAPONITE の自己組織化により構築されており、LP 複合ゲル前駆溶液は、特定量の DFO と HUVEC を容易に担持し、体内で温度応答性のゲル化を起こすことが確認された。また DFO/LP 複合ゲルは、LAPONITE と DFO の相互作用により、DFO を長期間にわたって持続的に徐放し、独自の self-controlled release system を構築することを見出した。さらに、LP 複合ゲルに DFO と HUVEC を併せて複合させた DFO/HUVEC/LP 複合ゲルでは、前述の DFO の self-controlled release system に基づく徐放性により、*in vitro* および *in vivo* にて高い血管新生効果がみられた。また、HUVEC を複合させた DFO/HUVEC/LP 複合ゲルでは、同濃度の DFO を複合した DFO /LP 複合ゲルよりもより高い血管新生能を示した。さらに、ゲルに複合する HUVEC の細胞数の増大に伴って血管網の分岐点数は減少し、血管直径は太くなった。これらの結果より、DFO/HUVEC/LP 複合ゲルはゲルの構成成分の一つとして組み込まれた HUVEC がゲル内に同じく組み込まれた DFO により活性化されることで、ホストと接続され、かつ開放端を持たない血管をゲル内に形成したと考えられる。つまり、DFO と HUVEC を併用投与可能な DFO/HUVEC/LP 複合ゲルは、従来の DFO 単独投与による血管新生技術と比較して劇的な血管新生を促進可能な組織工学技術であることが実証された。

これより、本章にて創製した DFO/HUVEC/LP 複合ゲルは、ゲルの構成成分の一つとして組み込まれた DFO 及び HUVEC に起因する血管新生によって、投与したゲル内部の環境が素早くホストの体内環境と連結可能であることが実証された。つまり、本章の目的である Injectable Gel Factory システムに基づいて設計したインジェクタブルゲルを用いて

DFO/HUVEC を併用投与するアプローチの有効性が得られたとともに、ホストと物質・情報の交換が可能とする血管網をゲル内に構築可能な「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」の創製に成功した。さらに、組織再生には栄養分や酸素、ホルモン、サイトカイン、細胞などの情報を伝える物質を生体移植後のバイオマテリアルに供給することが必須である。従って、ホストと接続した血管網をゲル内に構築可能な生体-ゲル間接続血管新生ゲルは、再生医療分野における組織工学技術としても、有用なインジェクタブルゲルであると考えられる。

## 第5章 ホストの組織を再建可能な「自己補給ゲル」の開発

### 5-1 序論

第3章では、Injectable Gel Factoryの基盤材料であるLP複合ゲルに、タンパク質をゲルの構成成分の一つとして組み込み、活性を維持しつつゲル内にて機能発現させることに成功し、「タンパク質活性保持ゲル」を開発した。さらに、第4章では低分子薬剤及び細胞をゲルの構成成分の一つとして組み込み、これらの活性を維持しつつゲル内にて機能発現させることで、ホストと物質・情報の交換が可能な血管網をゲル内に構築可能な「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」を開発に成功した。一方で、本研究の最終目的はInjectable Gel Factoryシステムの医療応用であり、この最終目的を達成するには、投与部位にて望むタイミングで効果を発現可能なシステムを構築する必要がある。そしてそのためには、血管網を通じた全身的な情報だけではなく、細胞外微小環境を通じて近隣同士で交換される情報も重要であることが知られている。従って、投与部位にて適切なタイミングで機能発現を示すInjectable Gel Factoryシステムに基づいた革新的なインジェクタブルゲルを創製するためには、「投与部位にて周辺の生体組織と同じような細胞外環境をゲル内部に構築し、複合した生理活性物質に提示可能であり、治療が終わると分解・消失するインジェクタブルゲル」を開発する必要があると考えた。そこで本章では、周辺に存在する細胞外マトリクス (Extracellular Matrix: ECM) や増殖因子をゲル内部に自己補給することで、投与部位にて周辺の生体組織と同等な細胞外環境を複合した生理活性物質に提示可能な「自己補給ゲル」の開発に取り組んだ。

インジェクタブルゲルは、損傷部位へと低侵襲的に投与可能な材料であることから *in vivo* 組織再生技術の開発にも有用なバイオマテリアルである。*In vivo* 組織再生を目指しインジェクタブルゲルを用いて細胞移植を行う場合、ゲルの前駆溶液で細胞を懸濁したのち患部に移植すると、生体内でゲル化して細胞がゲル内に担持されるため、患部に細胞を高効率で留める事が可能になると考えられている。このようなインジェクタブルゲルを用いた *in vivo* 組織工学の実現は、ゲルに内包された細胞の生体内での生存、増殖、形状、分化、機能に強く影響する細胞外微小環境を提示することができる適切な足場を細胞に提供する必要がある<sup>[106-108]</sup>。そのためにインジェクタブルゲルに求められる最も重要な特性の一つは、細胞外マトリックスや増殖因子、栄養分などの必要な生理活性物質をゲルに時空間的に吸収し保持することである。今日まで、インジェクタブルゲルの内部を生体本来の生物学的環境に近付け、ゲルを足場として機能させることを目指した研究が行われている。これまでに、PEG、PNIPAAm、PEG-脂肪族ポリエステル共重合体、PEG-poly(amino acids)共重合体、ゼラチン、



ヒアルロン酸、アルギン酸などの合成高分子や生体高分子を用いた様々な種類のインジェクタブルゲルが開発されてきた<sup>[109-114]</sup>。しかし、これらのインジェクタブルゲルの高い含水率とゲルネットワーク構造は、生理活性物質のゲル内部への拡散を促進する一方で、同時に生理活性物質のゲルからの急速な放出も引き起こす<sup>[115-117]</sup>。そこで近年、生体環境を模倣したインジェクタブルゲル開発を目指し、複数種の細胞外マトリクス成分を用いたインジェクタブルゲル研究が行われている<sup>[118,119]</sup>。2021年に Antich らは軟骨再生技術を開発すべく、軟骨分化培地にて培養した間葉系幹細胞から得られる脱細胞化細胞外マトリックス (dECM) を用いて作製したインジェクタブルゲルによる間葉系幹細胞 (MSC) 移植技術を報告している<sup>[118]</sup>。この dECM ゲルは正常な軟骨組織に存在する細胞外マトリクスであるグリコサミノグリカン (GAG) やⅡ型コラーゲン、アグリカンなどを含むことからより正常な軟骨組織に近い細胞外環境を移植細胞に提示できると考えられる。しかし、マウス皮下に dECM を用いて MSC を移植し、4 週間後に移植した MSC が産生した軟骨組織に関連する細胞外マトリクスを染色した結果、コントロールである MSC ペレット移植と同程度の GAG 及びⅡ型コラーゲンしか見られなかった。また、2021 年に Lee らは骨格筋再生を目指し、poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide)/poly(ethylene oxide) をベースとし、筋再生に有用であることが知られているメラノーマ細胞接着分子 CD146 及びインスリン様成長因子-1 (IGF-1)、そして正常な骨格筋に見られる主な ECM であるⅠ型及びⅢ型コラーゲンを構成成分とする CIC ゲルを報告している<sup>[119]</sup>。しかし、この CIC ゲルをマウスの骨格筋損傷部位に投与するとコントロール群よりは再建された筋線維が見られたものの、完全な骨格筋再生には至っていない。このように、これまでに様々な *in vivo* 組織再生技術の開発を目指したインジェクタブルゲルの研究が進められているにもかかわらず、移植細胞によるインジェクタブルゲル内部での効果的な組織再建は未だ達成できていない。この研究結果から、正常な組織に存在する多種類の細胞外マトリクスや増殖因子などの中のいくつかのみを用いてゲルを作製するのではなく、忠実に生体内の細胞外微小環境を模倣したようなゲルを設計する必要があると考えられる。しかし、生体で見られるような非常に複雑で階層的な細胞外微小環境を、人工的に構築することは、現在の科学技術では容易ではない。このような現状から、生体を模倣するような細胞外環境を外部で人工的に構築するのではなく、周辺に存在する細胞外マトリクスや増殖因子をゲル内部に自己補給することで、投与部位にて周辺の生体組織と同等な細胞外環境を複合した生理活性物質に提示可能な「自己補給ゲル」の創製は、Injectable Gel Factory の proof of concept が得られるだけでなく、革新的な *in vivo* 組織再生材料として応用可能な基盤材料を提案できるのではないかと考えた。

上記のような特性を持つ「自己補給ゲル」を創製するためには、移植細胞がゲル内にて生存、増殖、組織化、および機能するための細胞外微小環境をインジェクタブルゲル内部に構

築する必要がある。Injectable Gel Factory システムの基盤材料である LP 複合ゲルの構成成分 LAPONITE は、第 2 章で述べたとおり性質やサイズの異なる分子を非特異的に吸着可能な性質を持つ。この LAPONITE の特徴から、LP 複合ゲルが上記のような投与した周辺部位と類似した細胞外微小環境をゲル内に構築する上で不可欠な「細胞外マトリクスや増殖因子などを生体内で LAPONITE の働きによってゲル内に吸着・保持することにより、ゲルの構成成分が生分解性ポリマーの分解消失に伴い、ホスト由来の細胞外マトリクスや増殖因子に置換する」という機能を発現できるのではないかと発想した。そこで本章では、LP 複合ゲルを用いて、生体内投与後のゲル内にて移植細胞が生存、増殖、組織化、および機能するための細胞外微小環境を構築可能とする「自己補給ゲル」の開発に取り組んだ。

## 5-2 実験方法

### 5-2-1 LP 複合ゲルの作製及び特性評価

PLGA-PEG-PLGA は、3-2-2 と同様の手法で合成した。所定量の PLGA-PEG-PLGA をアセトンに溶解したのち、所定量の純水を各サンプルに加えた。減圧によりアセトンを完全に除去し、PLGA-PEG-PLGA 水溶液を所定の濃度で調製した。等量の所定濃度の LAPONITE 水溶液を各 PLGA-PEG-PLGA 水溶液に添加し、攪拌することで、求める複合比の LP 複合ゲル前駆溶液を調製した。このゲル前駆溶液を 4°C で 10 分間インキュベートした後、温度応答性のゾル-ゲル転移を試験管傾斜法により調べた。さらに、LP 複合ゲル (P3L0.9) 前駆溶液の温度応答性のゾル-ゲル転移をレオロジー分析により解析した。

### 5-2-2 LP 複合ゲルの分解・吸着特性

異なる組成比の LP 複合ゲル前駆水溶液 (300  $\mu$ L) をガラスバイアルに入れ、37°C のウォーターバスに浸漬し、ゲルを形成させた。得られた LP 複合ゲルを 5 mL の水または 10% のウシ胎児血清を添加した DMEM 培地に浸漬し、37 °C でインキュベートした。所定時間後、各サンプルの上澄み液を除去し、ゲルを凍結乾燥して乾燥重量を測定した。乾燥 LP 複合ゲルサンプルは、スパッタコーターを使用して金でコーティングし、SEM を用いて構造を観察した。また、LP 複合ゲル中の P<sub>3k</sub> ポリマーの加水分解を調べるために、分解試験中に分子量を測定した。乾燥 LP 複合ゲルに一定量の DMSO を添加することで、分解された LP 複合ゲルから P<sub>3k</sub> ポリマーのみが抽出された。分解された P<sub>3k</sub> ポリマーの分子量は、GPC にて解析した。なお、分子量減少 (初期分子量%) および乾燥ゲル重量減少 (初期乾燥ゲル重量%) の値は 3 回の実験の平均であり、平均  $\pm$  標準偏差として表した。

ECM 取り込み試験 (FITC 標識 I 型コラーゲンおよび FITC-ヘパリン ( $M_w$ :19000)) は、5-

(アミノアセトアミド) フルオレセイン (Thermo Fisher Scientific) とコラーゲンおよびヘパリンのカルボキシ基のカップリング反応によって合成した。未反応の FITC を完全に除去するために、反応溶液を透析し (Spectra/Por; MWCO 3500)、脱塩スピンカラムを用いて洗浄した。PBS (pH 7.4) 中の FITC-コラーゲン (1 mg/mL) または FITC-ヘパリン (1 mg/mL) をガラスバイアルで調製した LP 複合ゲル (300  $\mu$ L) に添加し、37°C でインキュベートした。上清 (100  $\mu$ L) を 0、2、4、6、12、24、および 48 時間後に採取し、FITC-コラーゲンまたは FITC-ヘパリン由来の蛍光を蛍光分光光度計 (Spectro fluorometer FP-6200, Jasco;  $\lambda_{\text{ex}}$  490 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  525 nm) にて測定した。コントロールとしてポリマー単独ゲルへの ECM 吸着も上記と同様の手法を用いて調査した。これらの値は全て 3 回の実験の平均であり、平均  $\pm$  標準偏差として表した。さらに LP 複合ゲルからの ECM 成分の放出を評価するために、吸着した FITC-コラーゲンまたは FITC-ヘパリンを含む LP 複合ゲル (300  $\mu$ L) に 3 mL の PBS (pH 7.4) を加え、37°C でインキュベートした。上清 (100  $\mu$ L) を 0、2、4、6、12、24、および 48 時間後に採取し、上記と同様に蛍光分光光度計にて測定した。さらに、吸着実験後の各サンプルのゲルを用いてゲルの構造解析および元素解析を行なった。ゲルを凍結乾燥し、四酸化オスミウムでコートしたのち、ゲル構造を SEM で観察した。また、ゲルの元素分析 (N) は、EDX を使用して同時に行なった。

### 5-2-3 LP 複合ゲルにおける細胞接着と増殖

ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) は、10%ウシ胎児血清を添加した DMEM を用いて培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。細胞培養皿上で培養した HDF をトリプシン処理によって回収したのち DMEM 培地で懸濁し、遠心分離によって細胞ペレットを得た。ペレットを DMEM 培地で再懸濁したのち Cyto Tell Green (AAT Vioquest, Inc.) 溶液を懸濁液に添加し、30 分間インキュベートした。蛍光標識した HDF (3.0  $\times$  10<sup>4</sup> 個) をガラスボトムディッシュ内に作製した LP 複合ゲル上に播種し、37°C で 1 時間インキュベートした。次に、2 mL の DMEM 培地をゲル上に添加し、インキュベーター内で培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。所定時間後、LP 複合ゲル上の HDF を CLSM (Carl Zeiss, LSM700) にて観察した。細胞増殖を調べるために、HDF (5.0  $\times$  10<sup>3</sup> 個) を 96 ウェルプレートに作製した LP 複合ゲル上に播種し、インキュベーター内で培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。所定時間後、LP 複合ゲル上で増殖した細胞を、WST-1 アッセイ (Dojindo) を用いて評価した。ゲル上で増殖した HDF の数は、3 回の実験の平均であり、平均  $\pm$  標準偏差として表した。マウス筋芽細胞 (C2C12) は、10%ウシ胎児血清を添加した DMEM を用いて培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は、EGM-2 BulletKit (Lonza) を使用して培養した (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。脂肪由来ヒト間葉系幹細胞 (ADSC) は、ADSC ヒト脂肪由来幹細胞増殖 BulletKit™ 培地 (Lonza) を使用して培養した (37°C,

CO<sub>2</sub> 5%)。細胞培養皿上で培養された HDF、C2C12、ADSC、および HUVEC をトリプシン処理によって回収し、それぞれの細胞培養培地で懸濁したのち、遠心分離によって細胞ペレットを得た。得られた各ペレットをそれぞれの細胞培養培地で再懸濁し、次いで Cyto Tell Green 溶液を懸濁液に添加し、30 分間インキュベートした。蛍光ラベル化した各細胞 (5.0 × 10<sup>5</sup> 個) を再度ペレット化し、所定濃度の P<sub>3k</sub> 水溶液 (150 μL)、続いて LAPONITE 水溶液 (150 μL) で再懸濁し、得られた細胞/LP 複合ゲル前駆溶液をガラスボトムディッシュに播種した。37°C で 1 時間インキュベートし、細胞/LP 複合ゲルを作製した。次に、それぞれの細胞培養培地 (500 μL) をゲル上に添加し、インキュベートした (37°C, CO<sub>2</sub> 5%)。所定時間後、PI 溶液を各ウェルに添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。次に、各細胞/LP 複合ゲルを 300 μL の PBS で 3 回洗浄したのち蛍光顕微鏡 (BioRevo BZ-9000, Keyence) にて観察し、細胞/LP 複合ゲル内の細胞の生存率を評価した。細胞生存率の値は、3 回の実験の平均であり、平均 ± 標準偏差として表す。細胞/LP 複合ゲル内での細胞増殖を調べるために、10 mL の DMEM を各細胞/LP 複合ゲルに加え、ピペッティングしてゲルを破碎した。次いで、得られた細胞懸濁液を遠心分離し (1000 rpm, 3 分)、細胞ペレットを 100 μL の PBS で再懸濁し、トリパンブルーアッセイにて細胞を計数した。コントロールとしてポリマー単独ゲル、LAPONITE 単独ゲル、およびマトリゲル (Corning) を用い、上記と同様の実験を行なった。ゲル内で増殖した細胞数の値は、3 回の実験の平均であり、平均 ± 標準偏差として表した。

#### 5-2-4 レトロウイルスベクターとレトロウイルス感染

F-アクチン構造の可視化のために Lifeact-GFP をコードするレトロウイルスを生成するため、C 末端 GFP タグを含む pBabe blast ベクターに、Lifeact ペプチドをコードするヌクレオチド配列 5'-ATGGGTGTCGCGAGATTTGATCAAGAAATTCGAAAGCATCTCAAAGGAAGAA-3' をサブクローニングした。レトロウイルス感染は、HilyMax トランスフェクション試薬 (Dojindo) を使用して、pBabe Lifeact-GFP を psi-2 ヘルパープラスミドとともにヒト腎臓 293 T 細胞 (ATCC) に同時導入した。導入 48 時間後に上清を回収し、8 μg/mL ポリブレン (Sigma) 存在下で C2C12 を感染させた。感染した C2C12 は、3 μg/mL ブラストサイジン (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 3 日間使用してセレクションを行なった。

#### 5-2-5 GFP 発現マウス筋芽細胞/LP 複合ゲルによる *in vivo* 組織形成

ヌードマウス (BALB/c-nu/nu, 5 週齢, 雌) をイソフルランで麻酔した。GFP 発現 C2C12 (GFP-C2C12, 3.0 × 10<sup>6</sup> 個) を 200 μL の LP 複合ゲル前駆溶液に懸濁し、26G の針付注射器を用いてマウスの背面の皮下筋層に注射投与した。所定時間後、マウスを安楽死させて GFP-

C2C12/LP 複合ゲルを取り出し、ゲル中の GFP-C2C12 を蛍光顕微鏡で分析した。ポリマー単独ゲル、LAPONITE 単独ゲル、およびマトリゲルをコントロールとして用い、同様の実験を行なった。

#### 5-2-6 骨格筋損傷モデルマウスへの LP 複合ゲル移植

マウス (CrI/ICR, 5 週齢, 雌) をイソフルランにより麻酔した。後肢の皮膚を内側から開き、大腿筋を露出させた。マウス大腿筋の骨格筋線維と周囲の血管、リンパ管、および神経組織を除去することで大腿筋欠損 (長さ 7 mm, 幅 4 mm, 深さ 5 mm) モデルマウスを作製した。次に、皮膚を閉じ、切開部を縫合した (5/0 シルク糸)。損傷翌日、100  $\mu$ L の LP 複合ゲル前駆溶液を 26G 針付注射器を用いて損傷部位に注射した。その後、小動物用握力計 (MELQUEST, GMP-100B) を用いて、損傷した後肢の筋力を毎日定量的に測定した。なお、筋力回復は 3 回の実験の平均であり、値は平均  $\pm$  標準偏差として表した。ゲル注射の 7 日後および 14 日後に損傷部位を開き、再建された組織を確認した。ポリマー単独ゲル、マトリゲル及び PBS をコントロールとして用い、同様の実験を行なった。

#### 5-2-7 骨格筋損傷モデルマウスへの C2C12/ LP 複合ゲル移植

ヌードマウス (BALB/c-nu/nu, 5 週齢, 雌) をイソフルランにより麻酔した。後肢の皮膚を開き、大腿筋を露出させた。マウス大腿筋の骨格筋線維と周囲の血管、リンパ管、および神経組織を除去することで大腿筋欠損 (長さ 7 mm, 幅 4 mm, 深さ 5 mm) モデルマウスを作製した。次に皮膚を閉じ、切開部を縫合した (5/0 シルク糸)。損傷翌日、100  $\mu$ L の C2C12 ( $5.0 \times 10^6$  個)/LP 複合ゲル前駆溶液を 26G 針付注射器を用いて損傷部位に注射した。その後、握力計を用いて、損傷した後肢の筋力を毎日定量的に測定した。なお、筋力回復は 3 回の実験の平均であり、値は平均  $\pm$  標準偏差として表した。ゲル注射の 7 日後および 14 日後に損傷部位を開き、再建された組織を確認した。ポリマー単独ゲル、マトリゲル及び C2C12/PBS 溶液をコントロールとして用い、同様の実験を行なった。

### 5-3 結果と考察

#### 5-3-1 LP 複合ゲルの特性評価

LP 複合ゲル前駆溶液の温度応答性ゾル-ゲル転移を  $P_{3k}$  濃度 (3, 5, 10%) および LAPONITE 濃度 (0.7, 0.9, 1.1, 1.4%) を変化させて検討した。その結果、幅広い組成比にて、LP 複合ゲル前駆溶液は室温から体温の間で温度に応答したゲル化を示した (Figure 5-1a, b)。次に、LP 複合ゲル (P3L0.9) 前駆溶液のレオロジー解析を行なった。結果より (Figure 5-1c)、LP 複合

ゲル前駆溶液では温度上昇に伴い  $G'$  値が直前のプラトーな値から急激に低下した後、再度急上昇して、 $G''$  の値よりも高くなってゲル化した。これより、熱応答性ゾルゲル転移の間に新しいナノコンポジット構造が再構築されることでゲルネットワークを形成したと示唆された。また、レオロジー解析にて得られた LP 複合ゲル前駆溶液 (P3L0.9) のゲル化温度は、試験管傾斜法の結果と概ね一致した。

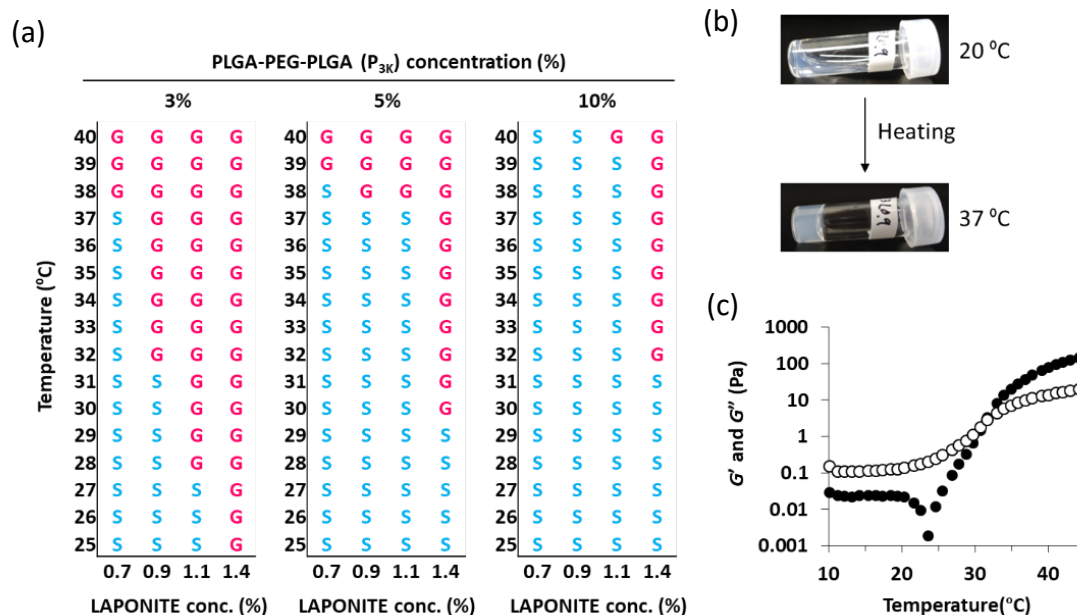


Figure 5-1 (a) 異なる組成の LP 複合ゲルの相図. S と G はそれぞれゾルとゲルを示す. (b) LP 複合ゲル (P3L0.9) のゾル-ゲル転移の写真. (c) LP 複合ゲル (P3L0.9) 前駆溶液の温度変化に対する貯蔵弾性率 ( $G'$ ) および損失弾性率 ( $G''$ ) のプロット.

### 5-3-2 LP 複合ゲルの分解特性

PLGA-PEG-PLGA の分解と同調して、LP 複合ゲルが周辺からゲル内に生理活性物質を自己補給することができるかどうかを検証するため、純水と 10% 牛胎児血清 (FBS) 含有 DMEM にて分解過程を調査した。Figure 5-2a は、LP 複合ゲル (P3L0.9) およびコントロールゲルであるポリマー単独ゲルの、純水および DMEM/FBS 中における分解時の分子量の変化を示したグラフである。グラフより、分子量は PLGA セグメントの加水分解により徐々に減少し、30 日後には PEG セグメントの分子量に到達した。注目すべきは、LP 複合ゲル中の PLGA-PEG-PLGA は、純水よりも DMEM/FBS 中で著しく速く分解された点である。Figure 5-2b は、水中および DMEM/FBS 中での分解時の凍結乾燥させた LP 複合ゲルおよびポリマー単独ゲルの重量変化を示したグラフである。水中では、LP 複合ゲルの乾燥重量は、はじめの 3 日間で急速に減少した。一方、DMEM/FBS 中では、対応する分子量の減少速度が水に比べて大きいにもかかわらず、同期間における LP 複合ゲルの乾燥重量の減少は著し

く緩やかであった。さらに、DMEM/FBS 中では、LP 複合ゲルの乾燥重量が 14~30 日かけて増加していたのに対し、水中では LP 複合ゲルの乾燥重量は同じ期間で減少した。これらの結果より、LP 複合ゲルでは DMEM/FBS に含まれる生理活性物質が分解過程でゲル内に吸着・保持されていることを示唆している。一方、コントロールとして用いた LAPONITE を含まないポリマー単独ゲルの水中での分解過程は DMEM/FBS とほとんど差はなく、乾燥重量も水中、DMEM/FBS 共に継続的に減少していた。これらの結果より、LAPONITE が LP 複合ゲルに生理活性物質を吸着させていることが実証された。また、Figure 5-2c は、0~14 日の分解過程における凍結乾燥 LP 複合ゲルの代表的な走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像である。各サンプルの平均孔径は、Image J ソフトウェアを使用して定量化した。Figure 5-2c より、水中では時間経過とともに LP 複合ゲルの孔径が徐々に大きくなっている。一方、DMEM/FBS では時間の経過とともに孔径が減少した。つまり、分解過程で生理活性物質をゲル内に吸着することで、ゲルネットワークの密度が増加していた。これは、LP 複合ゲルが周辺の生理活性物質をゲル内に吸着し構成成分の一つとして利用することでゲルネットワークが再編成されることを示している。

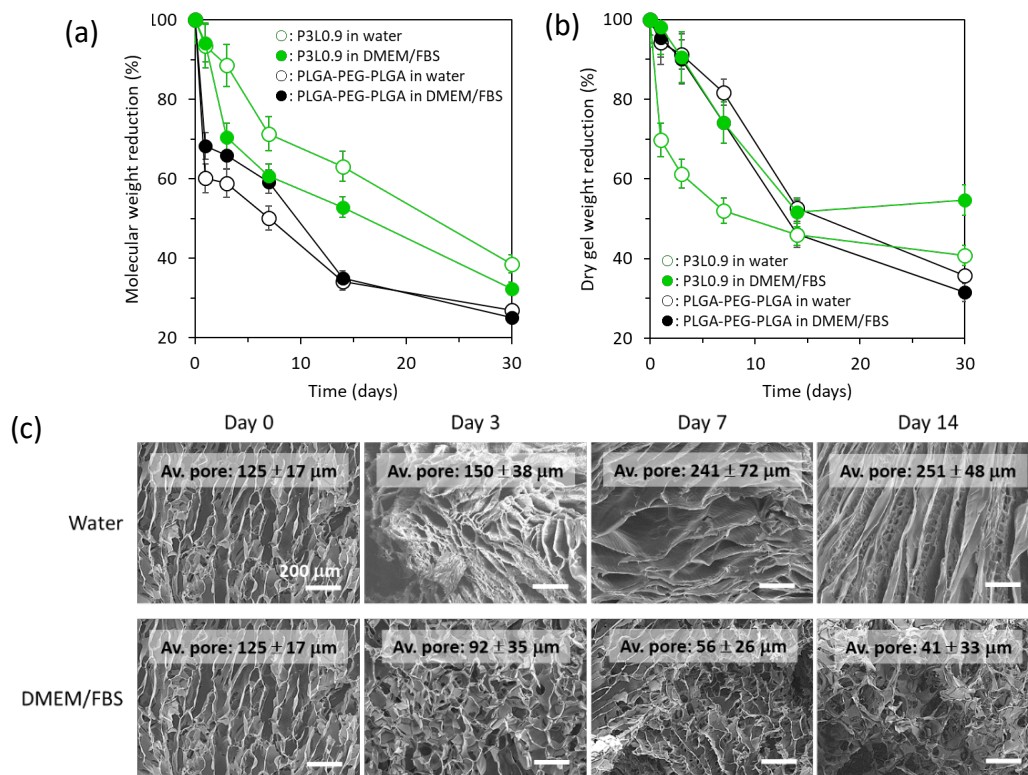


Figure 5-2 (a) 水および DMEM/FBS 中にて分解された LP 複合ゲル (P3L0.9) およびポリマー単独ゲルの PLGA-PEG-PLGA の分子量の変化. (b) 水および DMEM/FBS 中にて分解された LP 複合ゲルおよびポリマー単独ゲルの乾燥重量変化. (c) 水 (上) および DMEM/FBS (下) 内で分解中に 0, 3, 7, 14 日目に得られた乾燥 LP 複合ゲル (P3L0.9) の SEM 画像. 乾燥ゲルの平均孔径は、対応する SEM 画像に示す。

### 5-3-3 LP 複合ゲルの ECM 吸着特性

次に、LP 複合ゲルの ECM 成分のゲルネットワークへの取り込みについて、2 つの ECM 成分（正電荷の I 型コラーゲンと負電荷のヘパリン）を用いて検証した。バイアルに調製した LP 複合ゲル (P3L0.9) に FITC-コラーゲンまたは FITC-ヘパリンの溶液を加え、上清の蛍光強度を測定し、取り込まれたコラーゲン (Figure 5-3a) またはヘパリン (Figure 5-3c) の量を定量した。その結果上清中の両 ECM 成分の濃度は、コントロールであるポリマー単独ゲル及び LAPONITE 単独ゲルではわずかに減少していた。一方、LP 複合ゲルではより大きな濃度減少が検出されたことから、異なる性質を持つタンパク質に対して高い ECM 吸収能をもつことが示された。また Figure 5-3a に示すように、LP 複合ゲルでは FITC-コラーゲン由来の緑色蛍光がゲル全体に広がっていることから、吸着した FITC-コラーゲンは LP 複合ゲルの内部に拡散していることがわかる。一方、LAPONITE 単独ゲルでは、FITC-コラーゲンはゲル内に拡散せず、ゲル表面に強く吸着していることが確認された。つまり、LP 複合ゲルはポリマーと LAPONITE により形成されるゲルネットワークの空間を持つことで、LAPONITE との相互作用により周囲から吸着したタンパク質をその空間に保持できると考えられる。次に、LP 複合ゲルへのコラーゲンおよびヘパリンの吸着が一過性のものかどうか

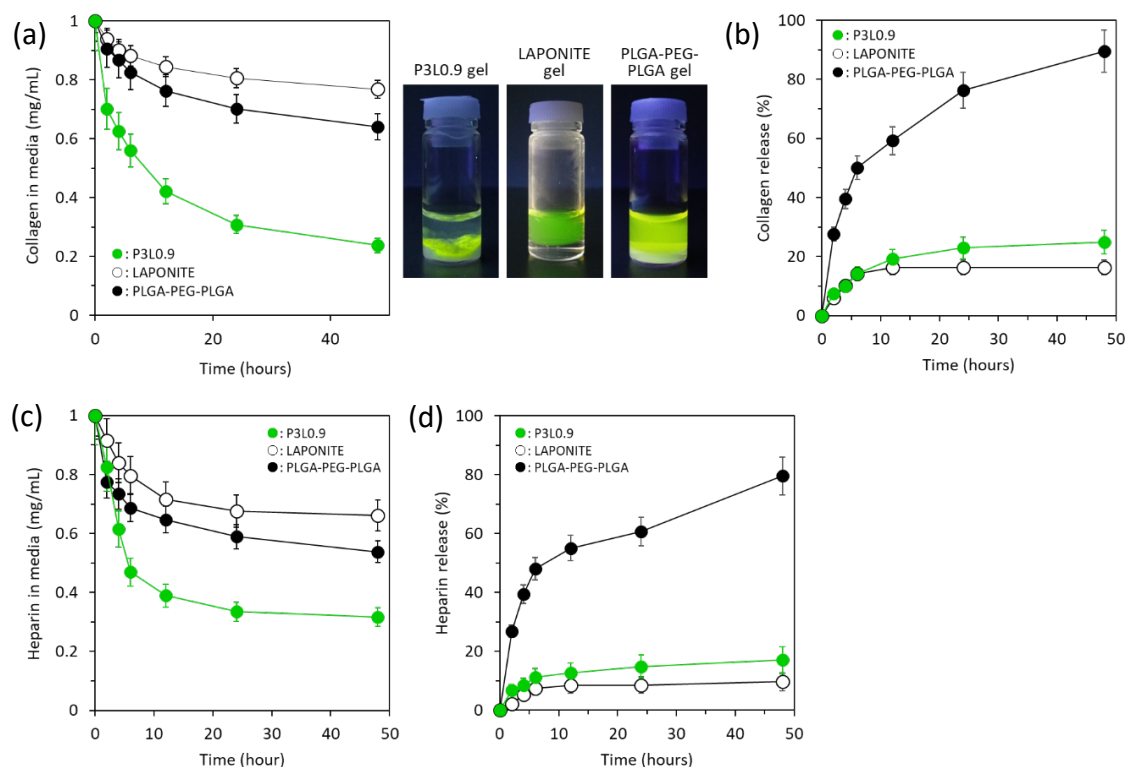


Figure 5-3 (a)LP 複合ゲル (P3L0.9)、LAPONITE 単独ゲル、および ポリマー単独ゲルへの FITC-コラーゲンの吸着特性. 各サンプルの FITC コラーゲン溶液添加 48 時間後の写真. (b) LP 複合ゲル (P3L0.9)、LAPONITE 単独ゲル、およびポリマー単独ゲルからの FITC-コラーゲンの放出特性. (c) LP 複合ゲル (P3L0.9)、LAPONITE 単独ゲル、および ポリマー単独ゲルへの FITC-ヘパリンの吸着特性. (d) LP 複合ゲル (P3L0.9)、LAPONITE 単独ゲル、およびポリマー単独ゲルからの FITC-ヘパリンの放出特性.



かを検証するために、コラーゲンおよびヘパリンの放出挙動を短期的に検討した。その後、上清を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) をゲルに加え、上清の蛍光強度を測定し、ゲルから放出された FITC-コラーゲン (Figure 5-3b) または FITC-ヘパリン (Figure 5-3d) 量を定量した。その結果、上清中の各 ECM 成分の濃度は、コントロールのポリマー単独ゲルでは急激に増加したことから、ポリマー単独ゲルにおけるコラーゲンおよびヘパリンの吸着は一過性で、これらの ECM 成分は可逆的にゲル内に存在していることが示された。一方、LP 複合ゲルでは短期間で放出がプラトーに達したことから、コラーゲンやヘパリンはゲルネットワークに時空間的に安定に吸着されていることが示唆された。そこで次に、XPS を用いて LP 複合ゲル内におけるコラーゲンの長期的かつ連続的な取り込みと保持を検証した。なお、LP 複合ゲル内のコラーゲンを検出するマーカーとして窒素を用いた。結果より、凍結乾燥 LP 複合ゲルの窒素ピークの強度は経時的に増加したが (Figure 5-4a)、コントロールであるポリマー単独ゲルでは窒素のピークの増加は見られなかった (Figure 5-4b)。さらに LP 複合ゲル内のコラーゲン量の変化を分解プロファイルに重ね合わせると (Figure 5-4c)、PLGA-PEG-PLGA の分解物との放出と同調して、1 日目の段階でコラーゲン量が著しく増加し、その後、ゲルの重量減少が 3~7 日でプラトーになると、吸着していたコラーゲンが一気に放出されるということが明らかになった。その後、ゲル内のコラーゲン量は重量減少の増加に応じて着実に増加したことから、LP 複合ゲルは、周辺から吸着した生理活性物質においても構成成分の一つとしてゲル内に組み込むことで、新しいゲルネットワークを再構築する能力を持つということが実証された。

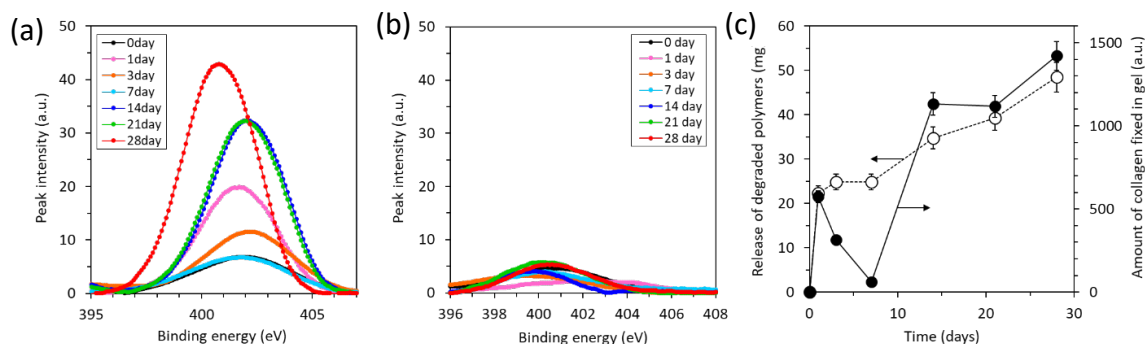


Figure 5-4 (a, b) コラーゲン吸着および取り込み試験中の窒素領域における LP 複合ゲル (P3L0.9) (a) 及びポリマー単独ゲル (b) のナロースキャン XPS スペクトル。(c) LP 複合ゲル (P3L0.9) の分解 (点線) とコラーゲン吸着 (実線) の相関。

### 5-3-4 LP 複合ゲルの *in vitro* 細胞適合性

LP 複合ゲルの組織工学技術への応用の可能性を評価するために、LP 複合ゲルの細胞適合性を調べた。Figure 5-5a に示すように、LP 複合ゲル、LAPONITE 単独ゲルおよびマトリゲ

ル上に播種した HDF は、培養 1 日目の段階でゲル表面に接着してよく広がった形態を示し、その広がった形態を 7 日間継続した。さらに、実験期間中 HDF は増殖を続けていた (Figure 5-5b)。特に、LP 複合ゲル上で培養した HDF は 7 日目には正常な形態を示し、高い増殖能を有していた。一方、コントロールであるポリマー単独ゲル上には HDF が接着せずに丸い形状を呈し、さらに細胞増殖は見られなかった。この結果より、ポリマー鎖の PEG や PLGA は生理活性タンパク質の吸着・保持、及び細胞の接着・増殖に関与しないため、LAPONITE の存在がゲル表面での細胞接着・増殖の促進に関与している可能性がある。そこで次に、4 種類の異なる種類の細胞 (HDF, HUVEC, C2C12, ADSC) を用いて LP 複合ゲル内での *in vitro* 三次元細胞増殖について調査した。コントロールゲルには、ポリマー単独ゲル、LAPONITE 単独ゲル、マトリゲルを用いた。その結果、LP 複合ゲルは温度に応答したゲル化により大量の細胞をゲルに容易に複合することができた。また、LP 複合ゲルに複合された細胞の大半 (95%以上) は、培養開始から 14 日後でもゲル内にて生存していた (Figure 5-5c)。一方、ポリマー単独ゲルと LAPONITE 単独ゲルに内包された細胞の生存率は著しく低く、さらに、

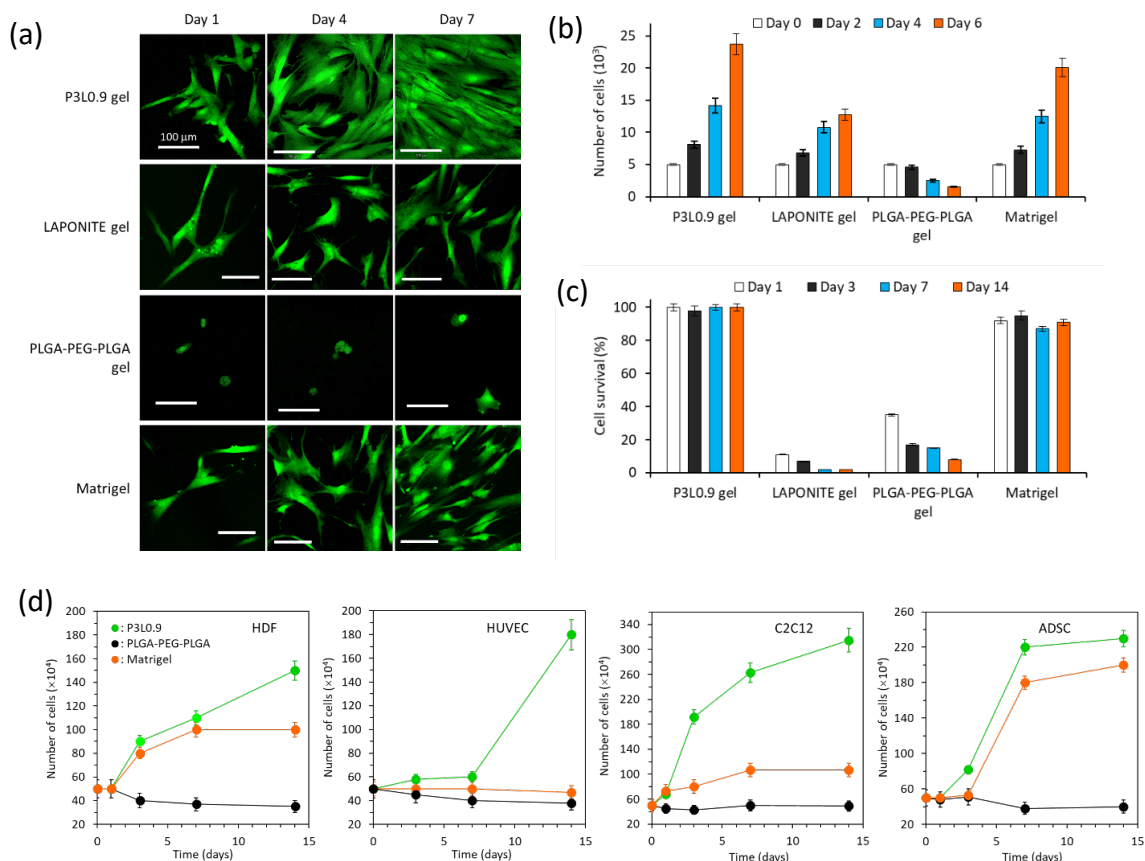


Figure 5-5 (a) LP 複合ゲル、LAPONITE 単独ゲル、ポリマー単独ゲル、およびマトリゲル上で培養した HDF の 1、4、7 日目の蛍光観察画像. (b) 0、2、4、および 6 日目の LP 複合ゲル、LAPONITE 単独ゲル、ポリマー単独ゲル、およびマトリゲル上での HDF 増殖の WST-1 アッセイによる定量分析. (c) LP 複合ゲル、LAPONITE 単独ゲル、ポリマー単独ゲル、およびマトリゲルに内包した C2C12 の生死判定 (1、3、7、14 日後). (d) LP 複合ゲル、LAPONITE 単独ゲル、ポリマー単独ゲル、およびマトリゲル内での HDF、HUVEC、C2C12、および ADSC の細胞増殖.

どの種類の細胞においても細胞増殖は見られなかった。一方、LP 複合ゲル内に内包された細胞は、14 日間にわたり継続的な増殖を示した (Figure 5-5d)。重要な点として、LP 複合ゲルは、ポジティブコントロールであるマトリゲルと比較してすべての細胞種が有意に高い細胞増殖を示した点、及び LP 複合ゲル内で細胞が生育可能である適切な細胞外微小環境が構築されていたことが明らかになった点が挙げられる。従来のゲル内にて三次元的に細胞増殖を促進する技術研究では、PEG のような合成高分子をベースとするゲルを用いる場合 RGD ペプチドのような細胞認識モチーフの組み込みや、ゲル内での成長因子の内包が必須とされていた<sup>[120, 121]</sup>。一方本研究にて設計した LP 複合ゲルは、LAPONITE の非特異的な物質吸着能によって周囲から細胞増殖に必要となる生理活性物質をゲル内に吸着・保持し内包細胞に提供可能である。そのため、LP 複合ゲルは LAPONITE の存在により、人工的に細胞増殖可能な環境を外部で構築せずとも、PEG ベースのインジェクタブルゲルに細胞増殖能力を付与できることが明らかになった。

### 5-3-5 LP 複合ゲルを用いた *in vivo* 大腿筋組織再建と機能回復

LP 複合ゲルの性質が、ゲルに組み込んだ細胞の三次元組織化にどのように影響するかを評価するため、Lifeact-GFP 発現 C2C12 を LP 複合ゲルに複合したのちにヌードマウスの皮下組織へと移植した。所定期間後、マウスからゲルを取り出し F-アクチン由来の蛍光画像を取得した。結果より、コントロールであるポリマー単独ゲル、LAPONITE 単独ゲル、及びマトリゲルでは移植細胞により構築された組織は見られなかった (Figure 5-6a)。一方、Lifeact-GFP 発現 C2C12/LP 複合ゲル内では、筋組織様の組織化した構造が見られた。特に、処置から 28 日後に形成された組織は、平行な筋線維を含む成熟した形態を示したことから、Lifeact-GFP 発現 C2C12/LP 複合ゲルが移植した細胞により筋再建を可能とすることが示唆された。

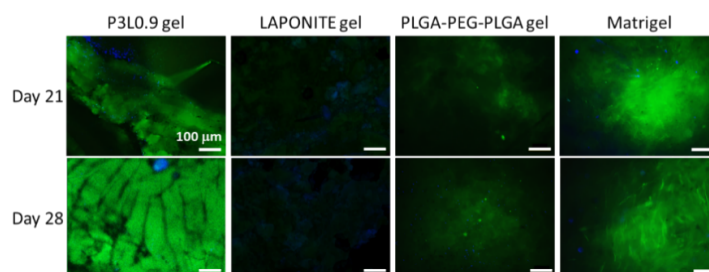


Figure 5-6 LP 複合ゲル、LAPONITE 単独ゲル、ポリマー単独ゲル、およびマトリゲルに内包された Lifeact-GFP-C2C12 細胞の皮下移植の 21 日後および 28 日後蛍光画像 (緑: Lifeact-GFP、青: Hoechst)。

次に、LP 複合ゲル投与による組織再生と機能回復を調べるために、マウス骨格筋欠損モデルを用いた。本実験項では、後肢から骨格筋組織の広い範囲を切除し、損傷した後肢筋の

機能回復を評価するために、筋力を解析した。その後、大腿筋欠損部位に LP 複合ゲルを注射投与したのち、所定日数経過毎に筋力を測定した。なお、コントロールとしてポリマー単独ゲル、マトリゲル、及び PBS を用いた。その結果、コントロール群であるポリマー単独ゲル、マトリゲル、及び PBS を用いて処置したマウスでは筋力の回復はみられなかった (Figure 5-7a)。さらに、損傷部位の写真から、ポリマー単独ゲル投与群及び PBS 投与群では損傷から 14 日経過しても、欠損部位にて見た目上の変化が見られなかった (Figure 5-7a)。一方で、LP 複合ゲル投与群では、14 日間継続的な筋力の回復が示された。大腿筋組織には、I 型及び II 型コラーゲンや GAG であるデコリン、ビグリカン、フィブロモジュリン、およびルミカンなど多種類の ECM や<sup>[122]</sup>、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、および肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様成長因子 (IGF) など多種類の成長因子<sup>[123]</sup>が存在する。つまり、大腿筋損傷部位に LP 複合ゲルを投与すると、宿主由来の多種類の ECM や成長因子といった生理活性物質を LAPONITE がゲル内部に吸着・保持し、さらにゲル周辺に存在する筋芽細胞を含む宿主由来の細胞にそれらを提供することで、宿主由来の細胞の移動及び組織化を促進することが示唆された。

次に、大腿筋を構成する細胞である C2C12 を LP 複合ゲルに複合することで、より高い治療効果が得られるのではないかと考え、大腿筋欠損モデルマウスの欠損部位に C2C12/LP 複合ゲルを移植した。また、コントロールとして C2C12 を混合したポリマー単独ゲル、マトリゲル、及び PBS を用いた。その結果、PBS とポリマー単独ゲルを投与したマウスでは、

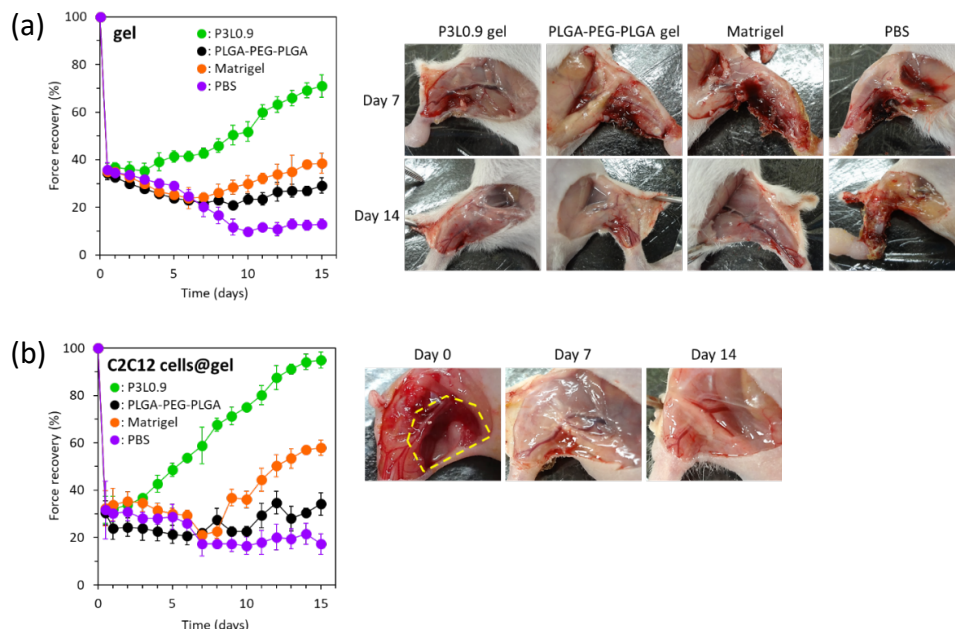


Figure 5-7 (a) LP 複合ゲル、LAPONITE 単独ゲル、ポリマー単独ゲル、マトリゲル移植後に再建した大腿筋の筋力回復率、及び 7、14 日後に撮影した欠損部位写真. (b) C2C12/LP 複合ゲル、C2C12 内包ポリマー単独ゲル、C2C12 内包マトリゲル、及び C2C12/PBS 懸濁液 (n = 3) 移植後に再建した大腿筋の筋力回復率、及び C2C12/LP 複合ゲル移植の 7、14 日後に撮影した欠損部位写真.(a) 及び (b) の全ての値は、3 つの独立した実験の平均 ± 標準偏差を示す。

筋力の回復は見られなかった (Figure 5-7b)。つまり、PBS 及びポリマー単独ゲル群では細胞移植による治療効果は認められなかった。一方、C2C12/LP 複合ゲル群は、細胞を複合していない LP 複合ゲルと比較して劇的な筋力回復を示した。この結果より、C2C12/LP 複合ゲルはまず投与部位周辺からゲル内部に生理活性物質を吸着、その後吸着した生理活性物質をゲル内に複合した C2C12 に提供し、さらにその C2C12 がゲル内で大腿筋組織の再生を促すことで、劇的に筋力を回復させたと考えられる。実際、移植後 14 日目時点で、C2C12/LP 複合ゲル投与部位は再生された筋組織によって完全に満たされていた (Figure 5-7b)。つまり C2C12/LP 複合ゲルは、生体内にてポリマーの分解・消失に伴い、組織再生を誘導する細胞外微小環境をゲル内部に再構築し、ゲル内に複合された移植細胞に対して組織再生に適切な細胞外環境を提供することで、最終的に大腿筋再生を誘導したと考えられる (Figure 5-8)。

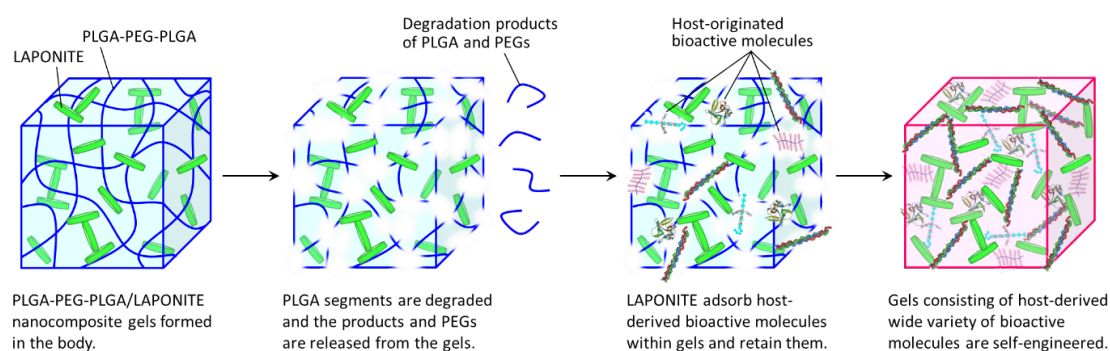


Figure 5-8 C2C12/LP 複合ゲルによる *in situ* 自己組織化再生微小環境形成メカニズムの仮説。

#### 5-4 結論

本章では、LP 複合ゲルが投与部位にてゲル内に周辺の正常な組織と同等な細胞外微小環境を自己補給する機能を持つことを実証した。さらに、LP 複合ゲルは C2C12 細胞を複合させると、その機能に基づいてゲル内に複合した C2C12 へと生存、増殖、組織化、および機能するための細胞外微小環境を提供できるインジェクタブルゲルであることが実証された。つまり、生体内投与後のゲル内にて、ゲルの分解・消失とともに移植細胞が生存、増殖、組織化、および機能するための細胞外微小環境を構築可能とする「自己補給ゲル」の創製に成功した。

また、本研究にて創製した自己補給ゲルは、重度の筋損傷を受けた大腿筋欠損モデルマウスにて劇的な機能回復及び大腿筋再建を示した。これまでの骨格筋再生を目指した組織工学技術は多く報告されているものの<sup>[124, 125]</sup>、本研究結果のような重度の骨格筋損傷モデルにて大腿筋を再建し、筋力を回復可能な技術は未だ報告されていない。従って、自己補給ゲル

は骨格筋再生材料の開発における基盤材料としても有用であると考えられる。さらに、自己補給ゲルは、投与部位にて周辺に存在する生理活性物質を利用して生体内に類似した細胞外微小環境を構築するため、骨格筋だけでなく様々な組織や臓器の再生できる可能性がある。そのため、革新的な再生医療材料を創製するための基盤材料としても有用であると期待される。

## 第6章 結言

### 6-1 総括

従来のインジェクタブルゲル研究では、生理活性物質を体内の標的部位に注射投与で送達し、周辺組織に放出させる担体として利用する手法が用いられていたが、本研究では生理活性物質を構成成分の一つとして組み込み、ゲル自体が機能性物質の機能場とする「Injectable Gel Factory」という新しい概念を提唱した。そして、この Injectable Gel Factory システムに基づいて用途に応じたインジェクタブルゲルをそれぞれ設計し、機能を調査することで、Injectable Gel Factory の概念実証を行なった。酵素  $\beta$ -gal、低分子化合物 DFO、そして HUVEC や C2C12 などの細胞を構成成分としてそれぞれ LP 複合ゲルに組み込んだインジェクタブルゲルを作製し、生体内にてその機能を検証した結果、組み込んだ生理活性物質をゲル内部で機能させることに成功した。つまり、本研究にて新しく提唱した「Injectable Gel Factory」の proof of concept が得られた。また、それらインジェクタブルゲルの機能発現により、ゲルを投与したホストの生体応答を制御することにも成功した。さらに、本研究にて創製した三つのインジェクタブルゲルは、従来の薬物送達技術や組織工学技術、再生医療技術と比較して治療効果が高いことから、医療材料としての臨床応用の可能性が示された。つまり、生理活性物質/LP 複合ゲルは、薬物送達システムや再生医療、組織工学といった複数分野の発展に貢献可能な画期的なバイオマテリアルとなることが期待される (Figure 6-1)。また、基盤材料である LP 複合ゲルの構成成分である PLGA-PEG-PLGA 及び LAPONITE は、どちらも高い安全性を示すことが知られているため、Injectable Gel Factory は医療応用可能なシステムとなり得る。

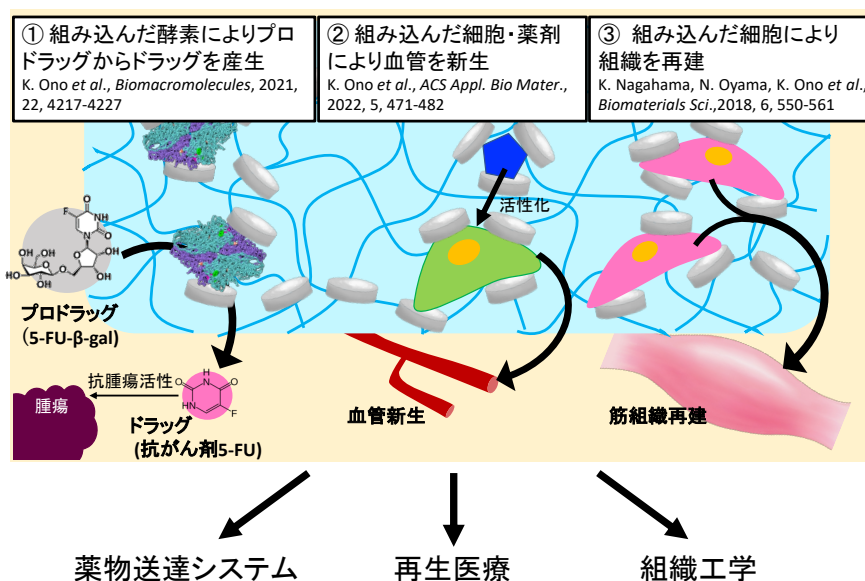


Figure 6-1 本研究にて創製した3つのInjectable Gel Factoryとその波及効果。

## 6-2 本研究の意義

本研究にて提唱した「Injectable Gel Factory」は、従来法とは異なり、担持物質を構成成分の一つとして組み込むと同時に、担持物質を積極的にゲル内に保持することで、担持物質の機能をインジェクタブルゲル全体の機能として発現させるという革新的なアイデアである。これまでに、「インジェクタブルゲルの特性を維持しつつ、担持物質をゲルの構成成分およびゲルの機能発現の要素として組み込むことで、ゲル自体に担持物質の生物学的機能を持たせ、生体応答を制御する」というアイデアで設計されたインジェクタブルゲルは存在しないため、従来のインジェクタブルゲルの機能を大きく凌駕するゲルとなり得る。さらに、本研究にて **Injectable Gel Factory** システムに基づき創製したインジェクタブルゲル (①複合した  $\beta$ -gal により継続的にプロドラッグを変換可能な EPT 用「タンパク質活性保持ゲル」、②デフェロキサミン (DFO) と血管内皮細胞を組み込みゲル内にて機能させることで、ゲル内に生体血管網と接続された血管を形成可能な「生体-ゲル間接続血管新生ゲル」、③生理活性物質を周辺からゲル内へと補給可能な組織再生用「自己補給ゲル」) は、従来の薬物送達システムや組織工学、再生医療技術研究の結果と比較して、より高い治療効果が得られた。従って、本研究にて創製した三つのインジェクタブルゲルは、薬物送達システムや再生医療、組織工学といった医療分野へ応用可能なバイオマテリアルとしても有用な革新的技術となり得る。実際にこれらインジェクタブルゲルを臨床応用へつなげるためには、インジェクタブルゲルの供給方法や材料の形状も重要となる。当研究室では、基盤材料である LP 複合ゲルは、LP 複合ゲル前駆溶液を調整した直後に凍結させ、使用時に再度融解し、温めることでゲル化するという知見を実験により得ている。このような特性を持つ LP 複合ゲルは、冷凍保存しておき必要な時に解凍だけで利用できるインジェクタブルゲルとなりうる。そして、この特性は、LP 複合ゲルを高度な医療設備がない現場でも簡便に利用できる最新の医療材料とするため、これまで救うことのできなかつた多くの命を救うことができる技術となると期待できる。今後は、凍結させた LP 複合ゲル前駆溶液が第 3～5 章にて得られた治療効果と同等な効果を示すことができるのか検証することで、インジェクタブルゲルの臨床応用に向けた形状や供給方法に関する知見を収集する。

さらに、私は **Injectable Gel Factory** の概念に基づいた新規再生医療技術のアイデアをすでに構想している。それは、大きく組織を損傷することで、本来の組織とは異なるコラーゲンや線維芽細胞を過剰に含む組織である“線維化組織”の形成が生じるような臓器を再生可能とする新規再生医療技術である。組織の線維化メカニズムでは<sup>[126-129]</sup>、まず損傷部位にて過剰な炎症反応が生じることで炎症性サイトカインのトランスフォーミング増殖因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) が過剰に産生・拡散され、拡散した TGF- $\beta$ 1 が周辺組織に存在する線維芽細胞を活性化する。その後、活性化された線維芽細胞が損傷部位に積極的に遊走すると共に、筋線



維芽細胞へと分化する。さらに、筋線維芽細胞が創傷部位にて線維芽細胞の増殖やI型コラーゲン産生を亢進し、損傷部位に過剰沈着させることで、線維化組織が形成される。この組織の線維化の二大要因は TGF- $\beta$ 1 と線維芽細胞である。私は、線維化治療技術の開発に **Injectable Gel Factory** を適応させることで、局所的に TGF- $\beta$ 1 と線維芽細胞の時空間的配置を制御することにより両者が出会わない環境を構築し、その結果として、組織再生を誘導できるのではないかと考えている。具体的には、大きく損傷した組織の欠損部位に基盤材料である LP 複合ゲルを投与すると、カチオン性の TGF- $\beta$ 1 をアニオン性の LAPONITE が吸着してゲル内に濃縮し周辺組織への拡散を防ぐと共に、線維芽細胞にとって足場にならない PLGA-PEG-PLGA ゲルネットワークが物理的なバリアとなって線維芽細胞のゲル内侵入を防ぐことで、線維芽細胞と TGF- $\beta$ 1 が出会わない環境を整える。その結果、線維芽細胞の活性化が抑制され、線維症の発症を防ぐことができるのではないかと考えている。さらに、このゲルは分解性であり、線維化を防いだ後は分解・消失するため、正常な組織再建には干渉しない。このように、今後も **Injectable Gel Factory** に基づいた様々なインジェクタブルゲル研究を発想し、成果を出すことで **Injectable Gel Factory** システムの有用性を示す。そして、開発したインジェクタブルゲルを用いる手法にて従来の治療法よりも高い治療効果を得ることができれば、インジェクタブルゲル研究だけでなく、薬物送達技術や組織工学、再生医療といった研究分野の発展にも有用な知見を得ることができると考えている。

## 参考文献

- [1] B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, S. W. Kim, *Nature*, 1997, 388, 860-862
- [2] B. Jeong, Y. H. Bae, S. W. Kim, *Macromolecules*, 1999, 32, 7064-7069
- [3] A. Chenite, C. Chaput, D. Wang *et al.*, *Biomaterials*, 2000, 21, 2155-2161
- [4] J. C. Garbern, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Biomacromolecules*, 2010, 11, 1833-1839
- [5] H. J. Moon, D. Y. Ko, M. H. Park, M. K. Joo, B. Jeong, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 4860-4883
- [6] A. Mellati, J. Akhtari, *Research in Molecular Medicine (RMM)*, 2019, 6, 1-14
- [7] Y. Ohya, *Polym. J.*, 2019, 51, 997-1005
- [8] Y. Arun, R. Ghosh, A. J. Domb, *Adv. Funct. Mater.*, 2021, 31, 2010284
- [9] G. Zhu, S. Mallery, S. Schwendeman, *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18, 52-57
- [10] L. Cai, R. E. Dewi, S. C. Heilshorn, *Adv. Funct. Mater.*, 2015, 25, 1344-1351
- [11] V. Phan, T. Thambi, H. Duong *et al.*, *Sci Rep.*, 2016, 6, 29978
- [12] Y. Yoshida, H. Takai, K. Kawahara, S. Mitsumune *et al.*, *Biomater. Sci.*, 2017, 5, 1304-1314
- [13] Y. Yoshizaki, M. Ii *et al.*, *Sci. Tech. Adv. Mater.*, 2021, 22, 627-642
- [14] S. X. Liu, N. Jiang, Y. Q. Chi, Q. Peng *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2022, 8, 3754-3764
- [15] S. Ishikawa, Y. Yoshikawa *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2022, 14, 35444-35453
- [16] G. T. Liu, Y. Zhou, X. L. Zhang, S. Y. Guo, *J. Mater. Chem. B*, 2022, 10, 5520-5536
- [17] J. Kopeček, J. Yang, *Polym. Int.*, 2007, 56, 1078-1098
- [18] M. R. Dethe, A. Prabakaran, H. Ahmed *et al.*, *J. Control. Release*, 2022, 343, 217-236
- [19] Y. Chen, Y. Li, W. Shen *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 31593
- [20] A. P. Rago, A. P. Napolitano *et al.*, *Cytotechnology*, 2008, 56, 81-90
- [21] X. Song, Z. Zhang, J. Zhu, Y. Wen, F. Zhao *et al.*, *Biomacromolecules*, 2020, 21, 1516-1527
- [22] M. Liu, X. Song, Y. Wen *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9, 35673-35682
- [23] J. Qu, X. Zhao, P. X. Ma, B. Guo, *Acta Biomaterialia*, 72, 2018, 55-69
- [24] K. Takata, H. Takai, Y. Yoshizaki, T. Nagata, K. Kawahara *et al.*, *Gels*, 2017, 3, 38
- [25] L. Pruet, R. Ellis, M. McDermott, C. Roosa, D. Griffin, *J. Mater. Chem. B*, 2021, 9, 7132-7139
- [26] X. Jin, Y. Shang, Y. Zou *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12, 56681-56691
- [27] J. X. Guo, Z. J. Feng, X. Liu, C. R. Wang, P. S. Huang *et al.*, *Soft Matter*, 2020, 16, 5750-5758
- [28] Z. Zhao, Z. Wang, G. Li, Z. Cai, J. Wu, L. Wang *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, 2021, 31, 2103339
- [29] J. I. Dawson, R. O. C. Oreffo, *Adv. Mater.*, 2013, 25, 4069-4086
- [30] M. Mousa, N. D. Evans, R. O. C. Oreffo, J. I. Dawson, *Biomaterials*, 2018, 159, 204-214
- [31] A. K. Gaharwar, L. M. Cross, C. W. Peak, K. Gold *et al.*, *Adv. Mater.*, 2019, 31, 1900332

- [32] J. I. Dawson, J. M. Kanczler, X. B. Yang *et al.*, *Adv. Mater.*, 2011, 23, 3304-3308
- [33] F. Ordikhani, M. Dehghani, A. Simchi, *J Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2015, 26, 269
- [34] S. Basu, S. Pacelli, Y. Feng, Q. Lu, J. Wang, A. Paul, *ACS Nano*, 2018, 12, 9866-9880
- [35] K. G. Akhilesh, J. S. Patrick, P. K. Benjamin, S. Gudrun, *Acta Biomaterialia*, 2011, 7, 568-577
- [36] K. Ono *et al.*, *Biomacromolecules*, 2021, 22, 4217-4227
- [37] K. Ono *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, 2022, 5, 471-482
- [38] K. Nagahama, N. Oyama, K. Ono *et al.*, *Biomaterials Sci.*, 2018, 6, 550-561
- [39] M. T. J. Olesen, R. Walther, P. P. Poier *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 59, 7390
- [40] A. N. Zelikin, *Nat. Chem.*, 2020, 12, 11-12
- [41] T. Nishiyama, Y. Kawamura, K. Kawamoto *et al.*, *Cancer Res.*, 1985, 45, 1753-61
- [42] R. Walther, J. Rautio, A.N. Zelikin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, 118, 65-77
- [43] P. R. LeDuc, M. S. Wong, P. M. Ferreira, R. E. Groff *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, 2, 3-7
- [44] S. W. Chung, J. U. Choi, Y. S. Cho, H. R. Kim *et al.*, *Adv. Sci.*, 2018, 5, 1800368
- [45] D. Farquhar, B. Pan, M. Sakurai *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2002, 50, 65-70
- [46] A. S. A. El-Sayed, N. Z. Mohamed, M. A. Yassin *et al.*, *Heliyon*, 2022, 8, e10660
- [47] M. A. Plunk, A. Alaniz, O. P. Olademehin *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2020, 11, 141-146
- [48] G. Huysmans, A. Ranquin, W. Lode *et al.*, *J. Control. Release*, 2005, 102, 171-179
- [49] A. Ranquin, W. Versees, W. Meier, J. Steyaert *et al.*, *Nano Lett.* 2005, 5, 2220-2224
- [50] F. Axthelm, O. Casse, W. H. Koppenol *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 8211-8217
- [51] I. Ortac, D. Simberg *et al.*, *Nano Lett.*, 2014, 14, 3023-3032
- [52] R. Zhang, X. Song *et al.*, *Biomaterials*, 2017, 138, 13-21
- [53] M. A. Miller, B. Askevold *et al.*, *Nat. Commun.*, 2017, 8, 15906
- [54] Q. X. Yao, F. Lin *et al.*, *Nat. Commun.*, 2018, 9, 15032
- [55] Y. Zhang, W. C. Ruder, P. R. LeDuc, *Trends Biotechnol.*, 2008, 26, 14-20
- [56] T. Nishimura, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Adv. Mater.*, 2017, 29, 1702406
- [57] M. Berrada, A. Serreqi, F. Dabbarh, A. Owusu *et al.*, *Biomaterials*, 2005, 26, 2115-2120
- [58] E. Ruel-Gariepy, M. Shive *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 53-63
- [59] K. J. Ornell, J. Taylor *et al.*, *Cancer Med.*, 2020, 9, 2891-2903
- [60] H. P. Qiu, H. Guo, D. Li *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2020, 38, 579-583
- [61] Y. B. Zhang, J. Zhang *et al.*, *Acta Biomater.*, 2018, 77, 63-73
- [62] N. Oyama, H. Minami *et al.*, *Biomater. Sci.*, 2014, 2, 1057-1062
- [63] K. Nagahama, D. Kawano *et al.*, *Biomacromolecules*, 2015, 16, 880-889
- [64] M. Fenero, J. Palenzuela *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9, 39078-39085

- [65] S. Ø. Andreasen, B. Fejerskov *et al.*, *Nanoscale*, 2014, 6, 4131-4140
- [66] D. Sueyoshi, Y. Anraku *et al.*, *Biomacromolecules*, 2017, 18, 1189-1196
- [67] S. Young, M. Wong *et al.*, *J. Control. Release*, 2005, 109, 256-274
- [68] A. H. Zisch, M. P. Lutolf *et al.*, *FASEB J.*, 2003, 17, 2260
- [69] E. A. Silva, D. J. Mooney, *J. Thromb. Haemostasis*, 2007, 5, 590-598
- [70] A. H. Van Hove, K. Burke, E. Antonienko *et al.*, *J. Control. Release*, 2015, 21, 191-201
- [71] A. Pal, C. I. Smith *et al.*, *Acta Biomater.*, 2020, 107, 138-151
- [72] S. Kusuma, Y. I. Shen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, 110, 12601-12606
- [73] Z. Wei, S. Gerecht, *Biomaterials*, 2018, 185, 86-96
- [74] G. Gainza, S. Villullas *et al.*, *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.*, 2015, 11, 1551-1573
- [75] M. Bienert, M. Hoss *et al.*, *Biomed. Mater.*, 2017, 12, 045023
- [76] X. M. Tong, S. Lee *et al.*, *Macromol. Biosci.*, 2005, 12, 1679-1686
- [77] K. T. Campbell, R. S. Stilhano *et al.*, *Biomaterials*, 2018, 179, 109-121
- [78] Y. Zhang, Y. Xie *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021 13, 18472-18487
- [79] G.L. Wang, G. L. Semenza, *Blood*, 1993, 82, 3610-3615
- [80] G. Melillo, G. L. S. Taylor, A. Brooks *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 12236-12243
- [81] M. Yamakawa, L. X. Liu, T. Date *et al.*, *Circ. Res.*, 2003, 93, 664-673
- [82] L. V. Beerepoot, D. T. Shima, M. Kuroki *et al.*, *Cancer Res.*, 2013, 56, 3747-3751
- [83] Z. Ding, M. Zhou *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2019, 5, 4077-4088
- [84] S. S. Guo, G. Liu *et al.*, *Nano Lett.*, 2018, 18, 5782-5790
- [85] S. Vignesh, A. Sivashanmugam *et al.*, *Colloids Surf., B*, 2018, 161, 129-138,
- [86] J. Lim, E. E. Simanek, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, 64, 826-835
- [87] G. Rassu, A. Salis, *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, 2016, 136, 1338-1347
- [88] J. L. Hamilton, M. I. Ul-Haq *et al.*, *Biomaterials*, 2016, 102, 58-71
- [89] Z. Liu, Y. Wang *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 20923
- [90] T. Saito, T. Tabata, *Acta Biomater.*, 2014, 10, 3641-3649
- [91] H. Chen, L. Guo *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, 2016, 4, 3770-3781
- [92] Q. Yao, Y. Liu *et al.*, *J. Control. Release*, 2018, 279, 69-78
- [93] Z. Ding, Y. Zhang *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2021, 7, 1147-1158
- [94] A. Tang, Y. Li *et al.*, *Biomater. Sci.*, 2021, 9, 4169-4177
- [95] J. Qi, Y. Yan *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, 10, 6180-6189
- [96] M. Geng, Q. Zhang *et al.*, *Biomater. Sci.*, 2021, 9, 2631-2646
- [97] H. Chen, P. Jia, H. Kang *et al.*, *Adv. Healthcare Mater.*, 2016, 5, 907-918

- [98] Y. Ikeda, S. Tajima, S. Yoshida *et al.*, *Atherosclerosis*, 2011, 215, 339-347
- [99] W. Tai, R. Mo, *Biomacromolecules*, 2014, 15, 3495-3502
- [100] Z. Gu, A. A. Aimetti *et al.*, *ACS Nano*, 2013, 7, 4194-4201
- [101] W. Wu, S. Zhou *et al.*, *Macromol. Biosci.*, 2013, 13, 1464-1477
- [102] Y. Zhao, B. Trewyn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 8398-8400
- [103] B. P. Purcell, D. Lobb, D. *et al.*, *Nat. Mater.*, 2014, 13, 653-661
- [104] A. K. Gaharwar, P. J. Schexnaider *et al.*, *Acta Biomater.*, 2011, 7, 568-577
- [105] A. K. Gaharwar, V. Kishore *et al.*, *Macromol. Biosci.*, 2012, 12, 779-793
- [106] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 47-55
- [107] B. M. Baker, C. S. Chen, *J. Cell Sci.*, 2012, 125, 3015-3024
- [108] M. Théry, V. Racine, M. Piel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, 103, 19771-19776
- [109] D. R. Griffin, W. M. Weaver, P. O. Scumpia *et al.*, *Nat. Mater.*, 2015, 14, 737-744
- [110] Y. L. Li, J. Roderigues, H. Tomas, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2193-2221
- [111] K. M. Galler, L. Aulisa, K. R. Regan *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 3217-3223
- [112] S. A. Bencherifa, R. W. Sandsa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2012, 109, 19590-19595.
- [113] S. Pek, A. Wan, A. Shekaran, L. Zhuo, J. A. Ying, *Nat. Nanotech.*, 2008, 3, 671-675
- [114] K. Ban, H. Park, S. Kim, A. Andukuri *et al.*, *ACS Nano*, 2014, 8, 10815-10825
- [115] J. K. Tessmar, A. M. Gopferich, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, 59, 274-291
- [116] K. Lee, E. A. Silva, D. J. Mooney, *J. R. Soc. Interface.*, 2011, 8, 153-170
- [117] E. S. Place, N. D. Evans, M. M. Stevens, *Nat. Mater.*, 2009, 8, 457-470
- [118] C. Antich *et al.*, *Adv. Healthcare Mater.*, 2021, 10, 2001847
- [119] W. Lee, J. Y. Lee, H. S. Lee, Y. Yoo, H. Shin, *ACS Appl. Bio Mater.*, 2021, 4, 7070-7080
- [120] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials*, 2003, 24, 4385-4415
- [121] J. A. Hubbell, *Nat. Biotech.*, 1995, 13, 565-576
- [122] A. R. Gillies, R. L. Lieber, *Muscle Nerve*, 2011, 44, 318-31
- [123] B. C. Syverud, K. W. VanDusen, L. M. Larkin, *Cells Tissues Organs*, 2016, 202, 169-179
- [124] Y. Jin, D. Shahriari, E. J. Jeon, S. Park *et al.*, *Adv. Mater.*, 2021, 33, 2007946
- [125] H. Lee, S. H. Kim, J. S. Lee, Y. J. Lee *et al.*, *Adv. Healthcare Mater.*, 2022, 2202664
- [126] K. A. Bielefeld, *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013, 70, 2059-2081
- [127] G. C. Gurtner *et al.*, *Nature*, 2018, 453, 314-321
- [128] E. Sabine, M. Paul *et al.*, *Science Translational Medicine*, 2014, 6, 265sr6
- [129] E.H. Budi, J.R. Schaub *et al.*, *J. Pathol.*, 2021, 254, 358-373

## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、指導教官として長い間ご指導及びご助言を頂きました甲南大学フロンティアサイエンス学部 長濱 宏治 教授に御礼申し上げます。

本論文をご校閲頂き、ご助言を下さいました甲南大学フロンティアサイエンス学部 西方 敬人 教授および藤井 敏司 教授、井上病院 谷口 泰造 先生に深く感謝を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり丁寧なご助言を頂き、時には心の支えとなって頂きました甲南大学フロンティアサイエンス学部 川内 敬子 准教授に深く感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり丁寧なご助言を頂くとともに、次世代研究者挑戦的研究プログラムを通じて様々な経験をする機会を与えて下さった甲南大学フロンティアサイエンス学部 村嶋 貴之 教授、松井 淳 教授に深く感謝申し上げます。

親身にご指導して頂きました甲南大学院フロンティアサイエンス研究科の先輩の皆様、心の支えとなりいつも研究室を明るく盛り上げてくれた生命高分子科学研究室 澤田 知哉 氏、濱田 優汰 氏、澤田 志穂 氏、湯浅 文也 氏、瀬島 奈々 氏、加藤 かれん 氏、南利 竜次 氏、岡崎 隼人 氏、川島 颯真 氏に感謝致します。また、心の支えとなるだけでなく生命高分子科学研究室の同じ研究チームの仲間として常に議論に加わり有用なご助言を下さいました Sobuj Shahidul Islam 氏、韓 佳慧 氏、吉信 尚洋 氏、土出 龍弥 氏、西田 ひなの 氏、及び同チーム卒業生 中島 和哉 氏に深く感謝致します。そして、いつも生命高分子科学研究室における同じ博士後期課程の学生として心の支えとなり、刺激的な議論をしてくれた片山 論陵 氏ならびに上田 菜摘美 氏に心から感謝致します。生命高分子科学研究室皆様の益々のご活躍を祈っております。また、卒業後も心の支えとなりいつも励ましてくれた甲南大学フロンティアサイエンス学部6期生の皆様及び生命高分子科学研究室の卒業生 増田 真鈴 氏、真田 ゆか 氏、飛石 佳穂 氏、木村 友香 氏に深く感謝いたします。

大学および大学院における9年間、心の支えとなった良き友人たちならびにお世話になった皆様に感謝いたします。

本研究は次世代研究者挑戦的研究プログラム研究費及びJSPS 特別研究員奨励費 22J11019 の助成を受け遂行しました。深く感謝いたします。

最後になりましたが、このような研究生生活を可能にしてくれて様々なサポートをしてくれた父、母、弟、叔母、祖父母に深く感謝します。

2023年2月

小野 公佳

## 業績リスト

### 公表論文 (副論文)リスト

1. K. Nagahama, N. Oyama, K. Ono, A. Hotta, K. Kawauchi, T. Nishikata, Nanocomposite injectable gels capable of self-replenishing regenerative extracellular microenvironments for in vivo tissue engineering, *Biomaterials Sci.*, 6 (3), 550–561 (2018).
2. K. Ono, H. Hashimoto, T. Katayama, N. Ueda, K. Nagahama, Injectable biocatalytic nanocomposite hydrogel factories for focal enzyme-prodrug cancer therapy, *Biomacromolecules*, 22 (10), 4217-4227 (2021).
3. K. Ono, M. Sumiya, N. Yoshinobu, T. Dode, T. Katayama, N. Ueda, K. Nagahama, Angiogenesis promotion by combined administration of DFO and vein endothelial cells using injectable, biodegradable, nanocomposite hydrogel scaffolds, *ACS Appl. Bio Mater.*, 5 (2), 471–482 (2022).

### 参考論文リスト

1. K. Nagahama, Y. Sano, M. Inui, S. Aoyama, T. Katayama, K. Ono, Bioinspired cell nuclear nanotransporters generated by self-assembly of amphiphilic polysaccharide-amino acid derivatives conjugates, *Adv. Biosyst.*, 4 (1), 1900189 (2020).
2. K. Ono, Y. Sanada, Y. Kimura, S. Aoyama, N. Ueda, T. Katayama, K. Nagahama, A thin hydrogel barrier linked onto cell surface sialic acids through covalent bonds induces cancer cell death in vivo, *Biomaterials Sci.*, 8 (2), 577–585 (2020).
3. Y. Kimura, S. Aoyama, N. Ueda, T. Katayama, K. Ono, K. Nagahama, Covalent cell-loading injectable hydrogel scaffold significantly promotes tissue regeneration in vivo compared with a conventional physical cell-loading hydrogel scaffold, *Adv. Biology*, 5 (2), 2000106 (2021).
4. K. Nagahama, S. Aoyama, N. Ueda, Y. Kimura, T. Katayama, K. Ono, Biological tissue-inspired living self-healing hydrogels based on cadherin-mediated specific cell–cell adhesion, *ACS Macro Lett.*, 10 (8), 1073–1079 (2021).



5. M. Inui, Y. Hamada, N. Sejima, N. Ueda, T. Katayama, K. Ono, K. Nagahama, Exportin-inspired artificial cell nuclear-exporting nanosystems, *Nanoscale Adv.*, 4 (12), 2637-2641 (2022).

### 総説リスト

1. 長濱 宏治, 小野 公佳, 木村 友香, 青山 星海, 細胞移植用スマートゲルの開発, ケミカル・エンジニアリング, 株式会社 化学工業社, 63 (1), 17-26 (2019).

### 学会発表リスト

#### 国際会議における発表

(ポスター・査読有り)

1. ○K. Ono, K. Nagahama, Regeneration of whole skin tissues by cell delivery using injectable self-replenishing gels, 30<sup>th</sup> Annual Conference of the European Society for Biomaterials, Dresden (2019年9月).

(ポスター・査読無し)

1. ○K. Ono, K. Nagahama, Regeneration of whole skin tissues by cell delivery using injectable self-replenishing gels, Konan Research Summit, Kobe (2018年12月).
2. ○K. Ono, K. Nagahama, Regeneration of whole skin tissues by cell delivery using injectable self-replenishing gels, 13<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine, Kobe (2019年12月).

#### 国内学会・シンポジウム等における発表

(口頭・査読有り)

1. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 細胞移植なしで scarless な皮膚再生を誘導する新奇ゲル材料の開発, 第50回日本創傷治癒学会, オンライン (2020年11月).

(口頭・査読無し)

1. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 自己補給ゲルを用いた細胞デリバリーによる皮膚組織の完全再生, 第64回高分子研究発表会 (神戸), 神戸 (2018年7月).
2. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 自己補給ゲルを用いた皮膚組織の完全再生技術の開発, 第67回高分子討論会, 札幌 (2018年9月).

3. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 皮膚の完全再生を目指したゲル状組織再生材の開発, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 神戸 (2018 年 11 月).
4. ○小野 公佳, 長濱 宏治, “生体内でその場に応じた再生環境を構築する”ゲルを用いた皮膚組織の完全再生技術の開発, 第 68 回高分子討論会, 福井 (2019 年 9 月).
5. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 皮膚再生を誘導するゲル材料の設計指針の確立, 第 69 回高分子討論会, オンライン (2020 年 9 月).
6. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 細胞移植なしで scarless な皮膚再生を誘導する新規ゲル材料の開発, メディケミカル拠点シンポジウム, 神戸 (2021 年 11 月).
7. ○小野 公佳, 細胞移植なしで皮膚再生を誘導する新規ゲル材料の開発, リサーチフェスタ 2021, オンライン (2021 年 12 月).
8. ○小野 公佳, scarless な皮膚再生を誘導する新規ゲル材料の開発, 第 5 回融合ランチョンセミナー, オンライン (2022 年 1 月).
9. ○小野 公佳, 皮膚組織の完全再生を目指したゲル状組織再生材の開発, 第 14 回 サイエンスフェア in 兵庫, オンライン (2022 年 1 月).
10. 小野 公佳, 線維化を防ぎ、再生を誘導する新規ゲル材料の開発, 第 21 回日本再生医療学会総会, オンライン (2022 年 3 月).
11. 小野 公佳, 土出 龍弥, 吉信 尚洋, 西田 ひなの, 片山 論陵, 上田 菜摘美, 長濱 宏治, 線維化を防ぎ、再生を誘導する新奇ゲル材料の開発, 第 44 回日本バイオマテリアル学会大会, 東京 (2022 年 11 月).

(ポスター・査読無し)

1. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 生分解性インジェクタブルゲルを用いた細胞デリバリーによる皮膚組織の再生技術の開発, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 京都 (2017 年 7 月).

2. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 生体高分子により成分置換されるインジェクタブルゲルを用いた皮膚再生技術の開発, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会, 東京 (2017 年 11 月).
3. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 生分解性インジェクタブルゲルを用いた細胞デリバリーによる皮膚組織の完全再生技術の開発, 第 17 回日本再生医療学会総会, 横浜 (2018 年 3 月).
4. ○小野 公佳, 皮膚組織の完全再生を目指したゲル状組織再生材の開発, リサーチフェスタ 2019, 神戸 (2019 年 12 月).
5. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 皮膚組織の完全再生を目指したゲル状組織再生材の開発, 第 49 回日本創傷治癒学会, さいたま (2019 年 12 月).
6. ○小野 公佳, 長濱 宏治, 細胞移植なしで scarless な皮膚再生を誘導する新規ゲル材料の開発, 第 20 回日本再生医療学会総会, オンライン (2021 年 3 月).
7. ○小野 公佳, 長濱 宏治, scarless な皮膚再生を誘導する新規ゲル材料の開発, 第 50 回医用高分子シンポジウム, オンライン (2021 年 7 月).
8. ○小野 公佳, 長濱 宏治, scarless な皮膚再生を誘導する新規ゲル材料の開発, 2021 年度大学院自然科学研究科研究成果発表会, 神戸 (2021 年 11 月).
9. ○吉信 尚洋, 小野 公佳, 長濱 宏治, 生分解性インジェクタブルゲルを用いた末梢神経の組織工学技術, 第 71 回高分子学会年次大会, オンライン (2022 年 5 月).
10. ○土出 龍弥, 小野 公佳, 長濱 宏治, リンパ管再生のための組織工学材料の開発, 第 71 回高分子学会年次大会, オンライン (2022 年 5 月).

## 受賞歴

1. 小野 公佳, 甲南大学ナノバイオ卒業研究, 優秀賞 受賞 (2018 年 2 月).

2. 小野 公佳, リサーチフェスタ 2019, アトラクティブプレゼンテーション賞 (2019年12月).
3. 小野 公佳, 13<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine, 優秀ポスター賞 (2019年12月).
4. 小野 公佳, 2021 年度大学院自然科学研究科研究成果発表会, 全発表における優秀発表賞 (2021年11月).
5. 小野 公佳, 2021 年度大学院自然科学研究科研究成果発表会, 各専攻の発表における優秀発表賞 (2021年11月).
6. 小野 公佳, 第21回日本再生医療学会総会, 優秀発表賞 (2022年3月).
7. 小野 公佳, 第44回日本バイオマテリアル学会大会, ハイライト講演 (2022年11月).

#### その他

1. 小野 公佳, 甲南大学フロンティアサイエンス研究科教育振興募金特待生 (2020年度、2021年度).
2. 小野 公佳, 次世代研究者挑戦的研究プログラム 選抜学生, TGF- $\beta$ 1 と線維芽細胞の配置を時空間的に制御する線維症先制治療材料の開発 (2021年10月～2022年3月).
3. 小野 公佳, 日本学術振興会 特別研究員 (DC2), TGF- $\beta$ 1 と線維芽細胞の配置を時空間的に制御する線維症先制治療材料の開発 (2022年4月～2023年3月).