

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 堀口 智史

### 論文題目

#### Osteogenic response of mesenchymal progenitor cells to natural polysaccharide nanogel and atelocollagen scaffolds: A spectroscopic study

### 論文内容の要旨

近年、組織工学の発達により、間葉系幹細胞と足場材料を用いた骨組織再生治療が期待されてきている。骨は無機物 (HAp:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) と有機物 (骨基質タンパク) から成り、硬さと弾性を併せ持つ。骨組織の強度は、骨密度だけでなく、骨の微細構造やハイドロキシアパタイト (HAp) の結晶構造、骨基質タンパクの架橋状態といった骨質によっても左右される。しかしながら、既存の足場材料による骨再生では骨質まで制御することができなかった。骨質を伴わずに骨量だけが回復した状態の骨組織は脆弱であり、本来の力学的支持機能を発揮できずに損傷するリスクが高い。故に、良質な骨組織を作るためには、骨質を考慮した足場材料が必要とされていた。

骨組織再生に関する研究では、異種動物由来のコラーゲンからなる多孔性 3 次元足場材料が使用されている。しかしながら、動物由来という問題に加えて、こういった足場材料に形成される骨組織は脆弱であり、骨質が十分担保されているとは言い難かった。

我々の研究グループでは、異種タンパクを含まず骨再生を促す多孔性の 3 次元足場材料の開発を試みた。京都大学工学研究科 生体機能高分子研究室の秋吉一成教授らと共同研究を行い、同研究室にて開発された天然多糖由来の高分子 CHP (cholesterol-bearing pullulan) から成るナノゲルを架橋した、多孔性の新規 3D 足場材料、Nanogel-Cross-linked-Porous-Freeze-Dried gel (FD-NanoCliP gel) を開発した (佐藤ら、Sci. Rep. 2018)。CHP ナノゲルはドラッグデリバリーシステムのキャリアとして臨床研究も行われている天然多糖由来であり、アレルギー原性も無く安全性が確立されている。佐藤らは FD-NanoCliP gel が骨芽細胞の 3 次元培養足場材料として使用でき、得られた培養骨組織が骨欠損部への移植に適していることを示した。一方で、既存の足場材料との詳細な比較はまだ行われていない。さらに FD-NanoCliP gel が高効率に骨組織形成をもたらすメカニズムも明らかになっていない。本足場材料の実用化やさらなる開発・改良のためには、既存の足場材料と FD-NanoCliP gel との化学的構造・結合状態の違い、さらにその違いが骨再生に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、FD-NanoCliP gel と、既存の足場材料であるアテロコラーゲン (ウシ真皮由来) に、それぞれ間葉系幹細胞株 KUSA-A1 細胞を播種し骨誘導条件にて 3 次元培養を行

った。

播種後 1 日の細胞接着を細胞増殖試験と F-Actin 染色で比較したところ、アテロコラーゲンの方が有意に強い細胞接着を示した。次に骨質を評価する為、培養 1 週間後にエネルギー分散 X 線解析 (EDX) を用いて培養後の石灰化基質の元素分析と形態観察を行った。元素マッピングでは FD-NanoCliP gel 上に高い Ca・P のピークが普遍的に検出され、骨基質が一定の配向性を持って存在していることが観察された。この傾向はアテロコラーゲン上では見られなかった。次に、免疫蛍光染色にて非コラーゲン性骨基質タンパクである Gla-Osteocalcin を解析したところ、FD-NanoCliP gel 上でアテロコラーゲン上よりも多くの発現を認めた。培養上清中の Soluble-Gla-Osteocalcin 量を比較したところ、逆に FD-NanoCliP gel を用いた培養の方がアテロコラーゲンを有した培養と比較して少なかった。さらに、培養後の各足場材料中の Ca ミネラルをアリザリンレッド染色で測定したところ、FD-NanoCliP gel において有意に多かった。同様の結果は蛍光 X 線 (XRF) でも示された。したがって、初期の細胞接着はアテロコラーゲンの方が多かったにも関わらず、組織中の石灰化基質の量は FD-NanoCliP gel の方が多かった。このことは、Gla-Osteocalcin が親和性の高い HAp と結合・組織化することを介して FD-NanoCliP gel 上にトラップされていることを示唆している。

FD-NanoCliP gel はアテロコラーゲンと比較して高い石灰化効率を有することが示されたので、その詳細なメカニズムをアテロコラーゲンとの化学的構造の違いや、Pullulan 骨格の結合状態から明らかにする目的で、ラマン分光法による解析を行った。ラマン分光法では、化学結合の種類や質、結晶性物質の結晶化の程度などの情報を得ることができる。ラマンスペクトル解析の結果、FD-NanoCliP gel 上では分子レベルで結晶性の高い HAp のピーク ( $960\text{cm}^{-1}$ ) が確認され、カソードルミネッセンス解析でも配向性を有する六方晶系の生体アパタイトの構築を認めた。FD-NanoCliP gel は結晶性の高い HAp を構築することで、アテロコラーゲンと比較して骨基質タンパクを効率よく吸着し、組織化していることが示された。

これらの結果から、FD-NanoCliP gel はその表面の Pullulan 骨格や官能基の化学的性状により、強い力学的支持機能を発揮する c 軸方向へ、HAp 結晶の成長を促していると考えられた。FD-NanoCliP gel はアテロコラーゲンと比較して、結晶配向性の高い再生骨組織を構築することから、骨質の低下した有病者や高齢者に対して良質な骨組織を提供する新たな骨再生医療の基盤技術になり得ると考えられる。また、本研究に用いたラマン分光法による多糖由来高分子の評価手法は、今後派生する多糖由来高分子材料を開発する上で有用であると考えられる。