

図 4 マンドレル回転数 3400rpm (高回転速度) 条件で作製された ELSP—SPU ファイハーメッシュの筒状構造体の電顕像。

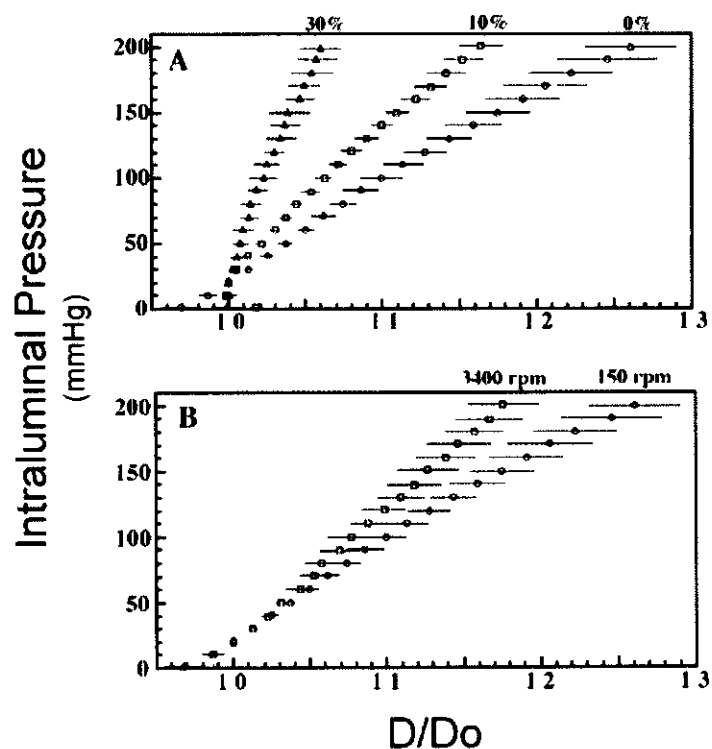


図 5 ELSP-SPU ファイハーメッシュ筒状構造体の内圧—管外径曲線。 a)DMF 濃度 (0, 10, 30%) を変えてファイハー接合度を制御して作製した 3 本のチューブについての結果、 b)マンドレル回転数を変えてファイハー配向性を制御した 2 本のチューブについての結果。 D_0 20 mmHg における管径。

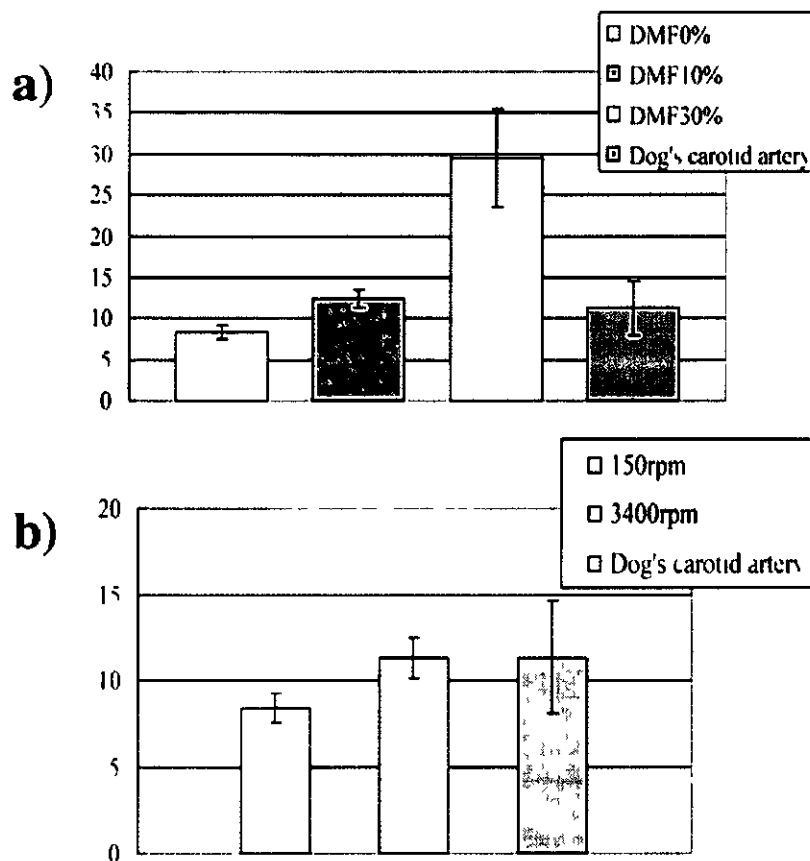


図6 各筒状構造体のスティフネスパラメータ

D 結論

本年度は、ELSP 法を活用して (1) 積層 ELSP 法による二層化筒状構造体の作製、(2) 接合 ELSP 法によるナノ・マイクロファイバースケルトンの機械的特性の制御、および (3) 接合・配向の制御による筒状構造体のコンプライアンス設計、の 3 点の課題を遂行した。これらの成果により、生体血管との高い機械的適合性と細胞接着性を合わせ持つ機能的小口径人工血管の作製技術の開発と、プロトタイプ作製の可能となった。来年度はこれらの成果をさらに発展させ、作製された人工血管の生体内での機能評価・生体適合性評価を行

う。

E 研究発表

1 論文発表

- 1) Kidoaki S, Kwon IK, Matsuda T
Mesoscopic spatial designs of nano- and micron-fiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques, Biomaterials in press, 2004

2 学会発表

- 1) Kidoaki S, Kwon IK, Matsuda T
Electrospinning of functional multilayered nano-fibers as a potential use for tissue engineered matrix, The 29th Annual Meeting of the Society For Biomaterials, Reno, Nevada, May, 2003
- 2) 木戸秋悟、Il Kuen Kwon、井原真紀、松田武久
Electrospinning による組織工学骨格基材の機能的設計とデハイス化 ナノ ミクロンファイバーメッシュの積層・混合・チューブ化 第 6 回日本組織工学会、東京、2003 年 6 月
- 3) 井原真紀、木戸秋悟、高見沢計一、松田武、**Electrospinning** による構造化筒状メッシュの成型加工技術と小口径人工血管のコンプライアンス設計 第 25 回ハイオマテリアル学会、大阪、2003 年 12 月

F 知的財産の出願・登録状況

出願番号 特願 2003-120266
出願日 2003 年 4 月 24 日
出願人 株式会社産学連携機構九州
発明者 松田 武久、木戸秋 悟
発明の名称 医療用高分子ナノ マイクロ
ファイバー

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

新しい設計概念による遺伝子キャリア

分担研究者 新海 征治（九州大学大学院工学研究院応用化学部門教授）

研究要旨 最近、当グループでは β -1,3-グルカンの1つである、“ノゾフィラン”がある種の一本鎖核酸と高分子複合体を形成することを発見した。ノゾフィランは図1に示す様な β -1-3-グルカン主鎖の3残基に一つずつ β -1,6-グルコンド側鎖を有する中性多糖であり、日本では子宮癌に対する放射線療法の併用療法の注射製剤として使用されてきた実績を持つ。このことはノゾフィランが毒性あるいは抗原性の面から見ても極めて生体適合性の高い多糖であることを示している。今回、このノゾフィランが一本鎖から天然構造である3本鎖に還元する過程で核酸を取り込み、新規な多糖-核酸複合体を与えることを利用して、ノゾフィランをアンチセンス核酸のキャリアーとして用い、これまでになかった遺伝子導入システムの確立を行うことにした。

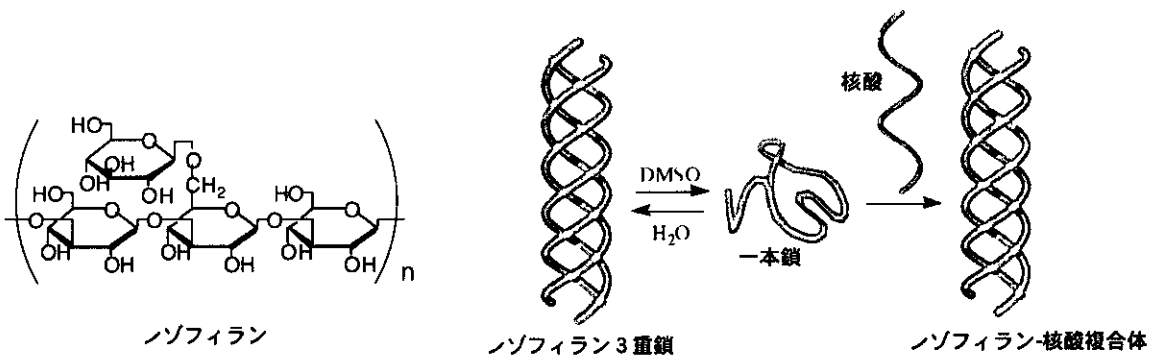


図1 ノゾフィランの構造と核酸との複合体形成過程

A 研究目的

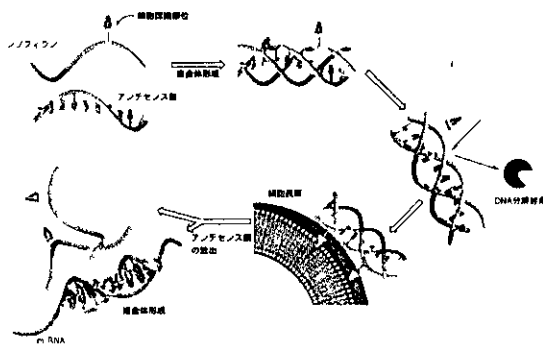
アンチセンス法は標的遺伝子より転写された mRNA に対して相補的に結合するアンチセンス DNA (AS-ODN) を投与して遺伝情報をノックアウトする遺伝子治療法であり、最近ではガンや感染症に対する臨床試験も行われている。しかしながら、血液中に存在するヌクレアーゼによる分解や非特異的なタンパク質の

吸着、細胞内取り込み量が低い等の問題がありアンチセンス鎖だけではほとんど効果を示さないことが分かっている。そこで、アンチセンス鎖と結合・複合化し、これらの問題を回避しながら目的とする細胞内へ効率的に輸送するキャリアーの開発が急務とされている。このような背景の中、我々はノゾフィランと核酸が複合体を形成することに着目し、ノゾ

フィランを新規 AS-ODN キャリアーとして利用することを検討した。特に、シゾフィラン側鎖への細胞認識部位の導入により細胞内取り込みの促進を狙ったアンチセンス効果の高い新しいタイプの遺伝子導入剤の開発を行うことにした。

B 研究方法

通常のアンチセンス配列のみでは核酸の長さが短くノゾフィランと安定な複合体を形成しないと考えられたため、アンチセンス鎖の末端にノゾフィランと親和性の高い40残基の poly(dA) テールを導入した。まず、このアンチセンス鎖とノゾフィランとの複合体形成を確認した。続いて、シゾフィラン/アンチセンス鎖複合体の遺伝子キャリアーとしての性能を無細胞系で評価した後、実際の細胞系へと展開した。さらに細胞認識部位を有機合成化学的手法でシゾフィランに選択的に導入した化学修飾ノゾフィランを合成し、そのキャリアー能を同様の細胞系で評価した。



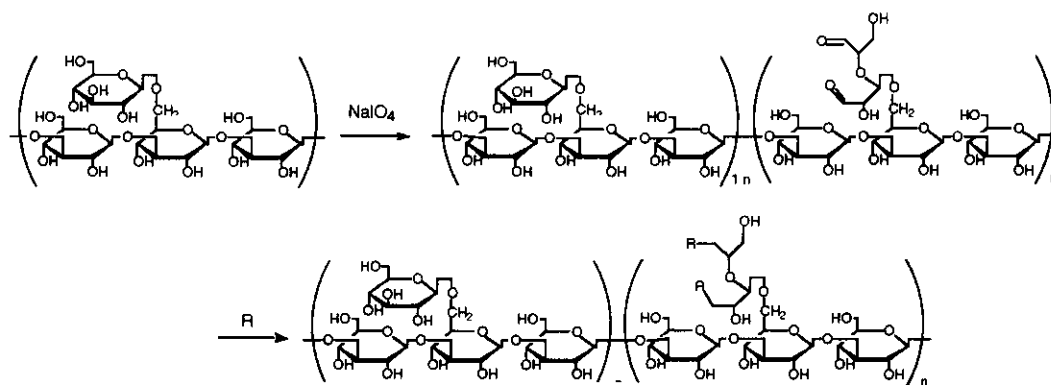
C 研究成果

まず、大腸菌細胞抽出液中で緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコートしたレポーター遺伝子を用いてアンチセンスキャリアーとしての能力を評価した。複合体の形成をゲル電気泳動、CD スペクトルにより評価したところこのア

ンチセンス鎖はノゾフィランと複合体を形成していることが確認された。次に GFP の発現効率を評価したところ、アンチセンス鎖/シゾフィラン複合体ではアンチセンス効果の発現に伴い45%程度にまで GFP の発現が抑制されていることが示された。核酸分解酵素が系内に存在しているとアンチセンスの分解に伴い、アンチセンス鎖のみを加えた場合は GFP の発現効率が70%にまで回復しているのが確認されたか、アンチセンス鎖/ノゾフィラン複合体では依然として45%程度に発現が抑制されたままの結果となった。

これらの無細胞系での実験結果を踏まえて、次に細胞系での評価を実施した。ここでは皮膚癌細胞 (A375) を用い、ガン原遺伝子 (c-myc) に対するアンチセンス鎖 (AS-ODN) をガン細胞の増殖抑制率で評価した。また、AS-ODN に対するコントロールとしてセンス鎖 (S-ODN) についても同時に測定を行った。核酸の投与濃度に対する皮膚ガン細胞の増殖抑制率を調べたところ、S-ODN ではノゾフィランと複合化してもガン細胞の抑制を制御することは無かった。一方で、AS-ODN では c-myc に対するアンチセンス効率の発現に伴って皮膚ガン細胞の増殖が大きく抑制される結果となった。このようなノゾフィラン/アンチセンス核酸複合体のアンチセンス効果は皮膚ガン細胞に限らず他の細胞系でも確認されており従来型の核酸に頼らない全く新しい遺伝子導入システムとして機能すること分かった。

次にノゾフィランに細胞指向性部位を化学的に修飾することによりアンチセンス鎖を特定の細胞に運搬する共に細胞内への取り込みの促進を狙った複合体の形成を試みることにした。ノゾフィランへの細胞認識部位はスキーム1に従い導入した。導入した官能基はエ



スキーム1 化学修飾ゾフィランの合成

表1 種々の化学修飾ゾフィラン

Sample codes and the introduced chemical groups			
Sample code	R	Modification level ^a	N/P ratio ^b
N(17)-SPG		17.1 ± 0.7 mol%	0.51
SP(4.6)-SPG		4.6 ± 0.3 mol%	0.27
SP(12.7)-SPG		12.7 ± 0.9 mol%	0.77
SP(24.7)-SPG		24.7 ± 1.3 mol%	1.50
APFD(4.1)-SPG		4.1 ± 0.3 mol%	0.26
R(3.6)-SPG		3.6 ± 0.1 mol%	0.21
R(9.3)-SPG		9.3 ± 0.2 mol%	0.56
R(13.5)-SPG		13.5 ± 0.1 mol%	0.81
S(6.4)-SPG		6.4 ± 0.3 mol%	-0.20
S(13.2)-SPG		13.2 ± 0.4 mol%	-0.39
RR(0.5)-SPG		0.5 ± 0.1 mol%	~ 0
RGD(1.3)-SPG		1.3 ± 0.3 mol%	~ 0

^a Determined by N elemental analysis

^b Cation(N)/anion(P) ratio

タノールアミン(N)、スペルミン(SP)、アルギニン(R)、オリゴアミノ酸であるアルギニン8量体(R8)とインテグリン認識ペプチド(RGD)である。それぞれの化学構造と導入率を表1にまとめて示す。

化学修飾ゾフィランをアンチセンス鎖のキャリアーとした細胞系での実験を実施した。細胞増殖抑制試験はメラノーマ細胞(A375)を用いて行った。細胞増殖抑制試験の結果を図2に示す。未修飾ゾフィランを用いた場合

では c-myb 単独投与と比較して A375 細胞の増殖率にはあまり差は認められなかった。一方、化学修飾ゾフィランとの複合体では A375 細胞の増殖率が大幅に減少することが分かった。特に、アルギニン8量体(R8)とインテグリン認識ペプチド(RGD)の場合はその効果が顕著であった(xiv, xv)。図2より細胞増殖は R8 では最大で 24%, RGD では 17%まで低下しているのが分かる。

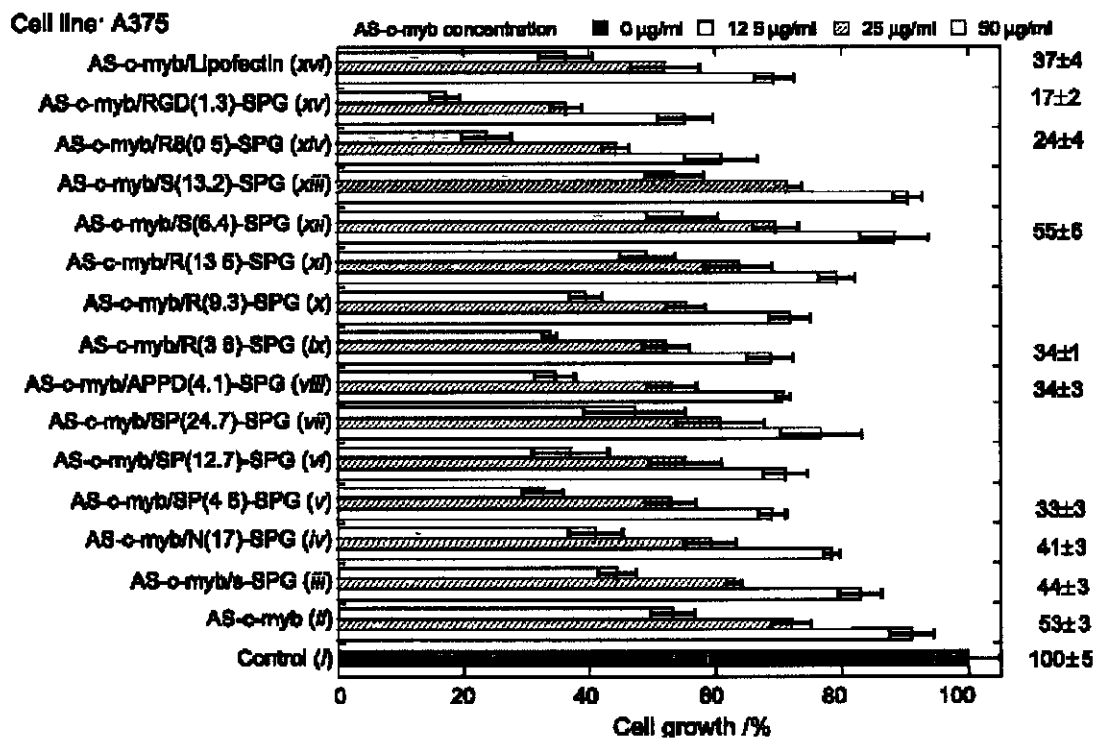


図2 化学修飾ノゾフィランをアンチセンスキャリアーとして用いた細胞増殖抑制試験

ステムへと展開できる可能性を秘めている。

D 考察

参照実験として、ノゾフィランのみあるいはアンチセンス鎖のみを投与しても顕著な細胞増殖の抑制は観察されていない。このことは、今回認められた細胞増殖抑制の結果はノゾフィランあるいは核酸の毒性に依るものではなく、投与したアンチセンス鎖のアンチセンス効果であると結論できる。特に、RDG ペプチドを修飾したノゾフィランのキャリアー性能は極めて高く、細胞表層でのレセプターを介した取り込みによるものであると考えられる。

以上のようにノゾフィランに導入した細胞認識部位は複合体の形成を妨げることなく、細胞表層レセプターによって認識され、ノゾフィランに細胞指向性を付与できることか分かった。今後、多糖をヘースとしさらに多様な細胞系をターゲットにした新規遺伝子導入ノ

E 結論

天然多糖であるノゾフィランは一本鎖核酸と特異的な高分子複合体を形成することで、取り込んだ一本鎖核酸をヌクレアーゼによる加水分解から保護することか明らかとなった。このような効果は無細胞系におけるアンチセンス効果、さらにはガン細胞へのアンチセンス添加による増殖抑制試験からも証明された。従来型のカチオン性の非ウイルスベクターは毒性の低下や体内滞留性が問題となっているか、天然多糖を用いた全く無毒の本ノステムはこれまでにない遺伝子キャリアーとして今後の遺伝子治療に大きく貢献できると期待される。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Koumoto K, Sakurai K, Shinkai S Polysaccharide-polynucleotide complexes (15) thermal stability of schizophyllan (SPG) / poly(C) triple strands is controllable by α -amino acid modification *Bioorg Chem* 31 163-171, 2003
 - 2) Sakurai K, Iguchi R, Mizu M, Koumoto K, Shinkai S Polysaccharide-polynucleotide complexes Part 7 Hydrogen-ion and salt concentration dependence of complexation between schizophyllan and single-stranded homo RNAs *Bioorg Chem* 31 216-226, 2003
 - 3) Hasegawa T, Umeda M, Matsumoto T, Numata M, Mizu M, Koumoto K, Sakurai K, Shinkai S Lactose-appended schizophyllan is a potential candidate as a hepatocyte-targeted antisense carrier *Chem Commun* 382-383, 2004
 - 4) Mizu M, Koumoto K, Kimura T, Sakurai K, Shinkai S *Biomaterials* in press, 2004
 - 5) Numata M, Asai M, Kaneko K, Hasegawa T, Fujita N, Kitada Y, Sakurai K, Shinkai S Curdlan and schizophyllan (b-1,3-glucans) and entrap single-wall carbon nanotubes in their helical superstructure *Chem Lett* 232-233, 2004
 - 6) Matsumoto T, Numata M, Anada T, Mizu M, Koumoto K, Sakurai K, Nagasaki T, Shinkai S Chemically modified polysaccharide schizophyllan for antisense oligonucleotides delivery to enhance the cellular uptake efficiency *Biochem Biophys Acta*, 1670 91-104, 2004
 - 7) Bae AH, Lee SW, Ikeda M, Sano M, Shinkai S, Sakurai K Rod-like architecture and helicity of the poly(C) / schizophyllan complex observed by AFM and SEM *Carbohydr Res* 339 251-258, 2004
 - 8) Koumoto K, Umeda M, Numata M, Matsumoto T, Sakurai K, Kunitake T, Shinkai S Low Mw sulfated curdlan with improved water solubility forms macromolecular complexes with polycytidylic acid *Carbohydrate Res* 339 161-167, 2004
 - 9) Mizu M, Koumoto K, Kimura T, Sakurai K, Shinkai S Polysaccharide-polynucleotide complexes part17 Solvent effects on conformational-transition of polydeoxyadenylic acid in the complexes with schizophyllan *Polym J* 35 714-720, 2003
 - 10) 木村太郎、櫻井和朗、新海征治、高分子加工、52 201-206, 2003
 - 11) 甲元一也、水雅美、櫻井和朗、新海征治、BIOINDUSTRY、20 30-37, 2003
- ## 2 学会発表
- 1) 水雅美, 甲元一也, 松本貴博, 櫻井和朗, 新海征治 ノゾフィランを利用したアンチセンス DNA の新規な遺伝子キャリアーの開発 遺伝子・デリバリー研究会 第3回シンポジウム, 2003年5月
 - 2) 甲元一也, 水雅美, 木村太郎, 櫻井和

- 朗, 国武豊喜, 新海征治, 多糖・核酸複合体 (1) - ノゾフィラン側鎖グルコースの複合体安定性に及ぼす影響 - 第 52 回高分子学会年次大会, 2003 年 5 月
- 3) 水雅美, 甲元一也, 松本貴博, 木村太郎, 櫻井和朗, 新海征治, 多糖・核酸複合体 (2) - ノゾフィラン (SPG) を利用したアンチセンス DNA の新規キャリアーの開発 - 第 52 回高分子学会年次大会, 2003 年 5 月
- 4) 三好賢太郎, 上江洲一也, 櫻井和朗, 新海征治 コンピュータケミストリーを用いたカートランに関する考察 第 52 回高分子学会年次大会, 2003 年 5 月
- 5) Sakurai K, Shinka1 S, A novel triple helix consisting of one polynucleotide and two polysaccharide chains, International Symposium on Polysaccharide Engineering 2003, June, 2003
- 6) Uezu K, Miyoshi K, Sakurai K, Shinka1 S, A novel left-handed helical hydrogen bonding formed in the curdlan triple helix, International Symposium on Polysaccharide Engineering, June, 2003
- 7) 水雅美, 甲元一也, 松本貴博, 櫻井和朗, 新海征治 ノゾフィラン (SPG) を利用したアンチセンス DNA の新規な遺伝子テリハリーシステムの開発 第 19 回日本 DDS 学会, 2003 年 6 月
- 8) 甲元一也, 水 雅美, 穴田貴久, 櫻井和朗, 国武豊喜, 新海征治 特定 DDS オリゴヌクレオチドキャリアーへの天然多糖ノゾフィランの利用 (1) 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月
- 9) 穴田貴久, 水雅美, 甲元一也, 松本貴博, 狩長亮二, 櫻井和朗, 新海征治 特定 DDS オリゴヌクレオチドキャリアーへの天然多糖シゾフィランの利用 (2) 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月
- 10) 三好賢太郎, 上江洲一也, 櫻井和朗, 新海征治 計算化学を用いたカートランの水素結合に関する考察 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月
- 11) 松本貴博, 沼田宗典, 長谷川輝明, 梅田真理子, 木村太郎, 櫻井和朗, 新海征治 熱応答性 β -(1,3)-グルカンを用いた核酸分離剤の開発 第 1 回生体機能関連化学・ハイオテクノロジー一部会合同シンポジウム, 2003 年 10 月
- 12) 長谷川輝明, 梅田真理子, 松本貴博, 沼田宗典, 櫻井和朗, 新海征治 イオン性液体中における核酸-多糖相互作用 第 1 回生体機能関連化学・バイオテクノロジー一部会合同シンポジウム, 2003 年 10 月
- F 知的財産の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

生分解性セグメント化ポリウレタンおよびセグメント化ポリウレタンウレア
の特性解析とマイクロファイバーの調製

分担研究者 高原 淳（九州大学有機化学基礎研究センター教授）

研究要旨 アミノ酸由来のノイソシアネートと生分解性ポリエステルおよび生体由来のシアミンあるいはジオールよりセグメント化ポリウレタンおよびセグメント化ポリウレタンウレアを調製し、その特性解析を行った。さらにエレクトロスプレーデポジション（ESD）法によりマイクロファイバーの調製を試みた。

A 研究目的

現代の医療技術の進展に伴い、再生医学に用いる分解性足場用材料が、大きな注目を集めている。分解性足場用材料は細胞に酸素と栄養を供給するため多孔体であり、生分解性ポリマーの不織布などへの加工が必要とされている。本研究では、アミノ酸由来の環境適合型イソシアネート(LDI, Fig. 1)を用いて、生分解性ポリウレタンの合成を行い、エレクトロスプレーデポジション（ESD）法によりマイクロファイバーの調製を試みた。

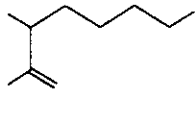


Fig. 1 Chemical structure of LDI

B 研究方法

セグメント化ポリウレタン（SPU）およびセグメント化ポリウレタンウレア（SPUU）は、プレポリマー法により合成した。Fig. 2はSPUとSPUUの化学構造である。ポリオールには、ポリカプロラクトンオール（PCL）、鎖延剤

としてSPUは1,3-プロパンジオール（PDO）、SPUUは1,4-ブタンジオール（BDA）を用いて、LDIとPCLおよび鎖延剤の比率を変化させてSPU、SPUUを合成し、DSC測定と引張試験、生分解試験を行った。鎖延剤はいずれも生体由来のものと同一の化学構造を有する。続いてESD法により、種々の濃度のSPU（クロロホルム溶液）、SPUU（DMF+THF）溶液を、高電圧を印加しながら基板上に噴霧した。得られたファイバーを乾燥後、電界放出型走査型電子顕微鏡（FE-SEM）にて観察した。

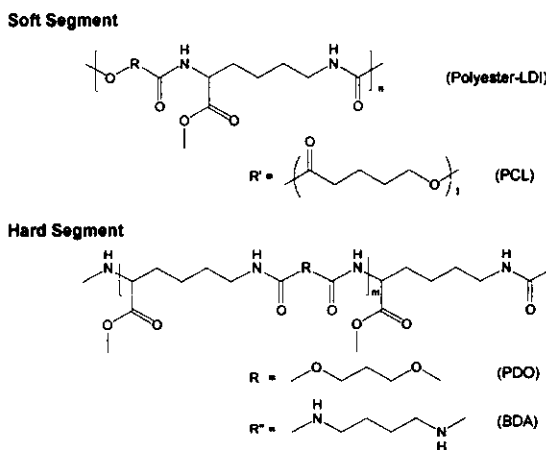


Fig. 2 Chemical structures of SPU and SPUU

C 研究成果

SPU および SPUU を合成後、フィルムを調製し DSC 測定を行った。DSC 測定の結果、SPUU のハートセグメントのガラス転移温度は、SPU よりも 77 K 高温側に存在することを確認した。これはウレタン結合と比較してウレア結合のほうが、分子間水素結合の密度が高いためであると考えられる。また、ハードセグメントとの相互作用によりソフトセグメントの結晶化が抑制される組成の SPUU は、汎用のポリウレタンと同様な優れた力学物性を示した。

いずれの SPU、SPUU も緩衝溶液中に長時間浸漬後、分解を示した。SPUU はハートセグメントが強固な水素結合を示す尿素基により凝集しているため、SPU に比べると分解速度は著しく低下した。

細胞培養の基材としての応用を目的として、ESD 法により SPU および SPUU ファイバーを調製し SEM 観察を行った。Fig 3 は、SPU ファイバーを (a) 10 wt% (b) 30 wt% クロロホルム溶液、印加電圧 12 kV、流速 1 ml/h から調製を行った SEM 像である。10 wt% の SPU から調製した場合、10~15 μm 程度の粒子と 500 nm~2 μm 程度のファイバーの混合形態が観察された。一方、30 wt% 溶液から調製した SPU では 2~5 μm 程度の比較的均一なファイバー構造が観察された。

同様に ESD 法で SPUU ファイバーの調製を試みた。Fig 4 は、(a) 5 wt%、(b) 12.5 wt% 溶液、印加電圧 19 kV の条件で DMF:THF = 1:1 溶液から SPUU ファイバーを調製を行った SEM 像である。5 wt% 溶液から調製した場合、1~3 μm の粒子が楕円形に変形し、その両末端から直径 100~400 nm 程度のファイバーが伸びた形態が観察された。また 12.5 wt% 溶液

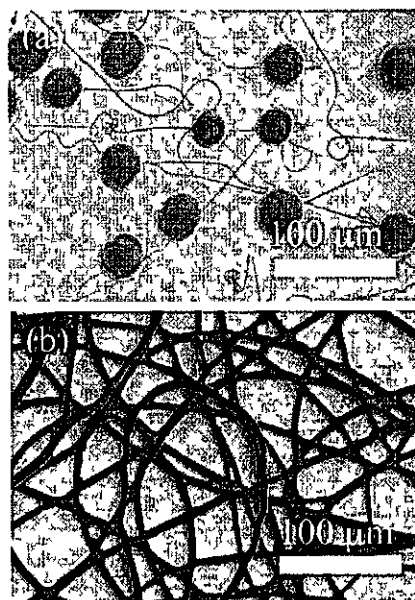


Fig 3 FE-SEM images of microstructure of electrospun deposited PCL(1250)(80)PDO (a) 20 wt% (b) 30 wt% under voltage of 12 kV

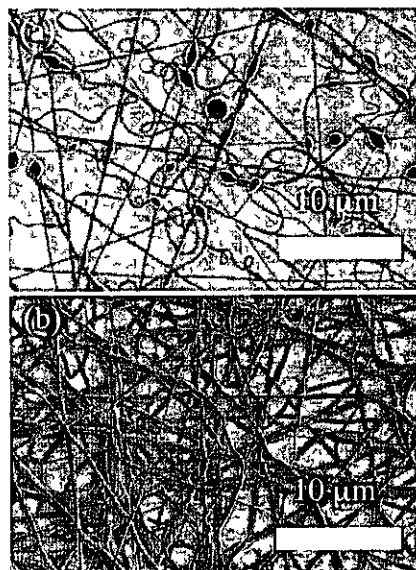


Fig 4 FE-SEM images of microstructure of electrospun deposited PCL(1250)(71)BDA (a) 5 wt% (b) 12.5 wt% under voltage of 19 kV

から調製した場合、200~700 nm 程度のファイバー形態が観察された。SPU、SPUU 共に溶液の濃度を上げることで、溶液の粘度が上昇し、安定したノズルが噴出されて粒子の生成が抑制されたと考えられる。

さらにこれらのファイバーを堆積させることにより不織布の調製を試みた。Fig 5 (a) は SPU35 wt%にて不織布の調製を行った SEM 像である。Fig 5 (b) は SPUU12.5 wt%から不織布を調製した SEM 像である。35 wt%から調製をおこなった場合、5~15 μm 程度のファイバーが形成されて、それらが堆積することにより不織布が形成された。また SPUU12.5 wt%においても 200~700 nm 程度の均一なファイバーが形成され、SPU と同様にこれらのファイバーを堆積させることで、SPUU による不織布の開発が可能となった。このように溶液濃度、印加電圧、流速を変化させることで種々の形態の SPU および SPUU 不織布の調製が可能となると考えられる。

D 考察

本研究で用いた LDI は非対称分子であるのでハードセグメントは結晶化せず、鎖延長剤がノールの場合、室温付近に T_g を、ノアミンの場合、100 $^{\circ}\text{C}$ 付近に T_g を示した。従って、実用的な物性を得るためにはシアミンでの鎖延長が必要不可欠である。また分解速度やマイクロファイバーの特性も鎖延長剤の種類に大きく依存した。

E 結論

LDI をシイソシアナート成分として導入した新規ポリウレタン系生分解性エラストマーの合成に成功した。さらに ESD によりマイクロファイバーや不織布が調製可能であることを明らかにした。

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Takahara A, Sakata H, Morita M, Koga

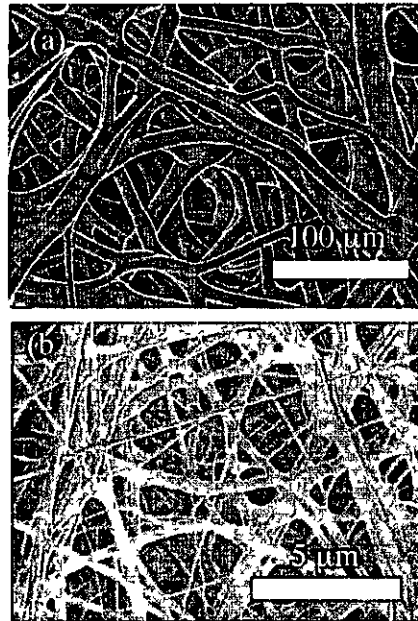


Fig 5 FE-SEM images of microstructure of electrospay deposited (a)PCL(1250)(80)PDO(a)5 wt%, (b)35 wt% under voltage of 12 kV (b)PCL(1250)(71)BDA (a)5 wt%, (b)12.5 wt% under voltage of 19 kV

T, Otsuka H Fabrication and Characterization of Multi-component Organosilane Nanofilms, Composite Interfaces, 10 489-504, 2003

- 2) Koga T, Morita M, Ishida H, Yakabe H, Sasaki S, Sakata O, Takahara A Analysis of Aggregation State of Polymer Thin Films Based on Grazing Incidence X-ray Diffraction, Trans Materials Research Society of Japan, 28 85-88, 2003

- 3) Takahara A Area-Selective Molecular Assembly of Organosilanes, in the Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Dekker, NY 2004

2 学会発表

- 1) Takahara T, Koga T, Morita M, Otsuka

- H Surface structure and surface properties of patterned multicomponent organosilane monolayers, The First International Congress on Bio-Nanointerface, 2003年5月
- 2) 山口智弘、大塚英幸、高原 淳 環境適合型イソシアネートを用いたセグメント化ポリウレタンの合成と生分解性 第52回高分子年次大会, 2003年5月
- 3) 高原 淳、古賀智之、大塚英幸、森田正道 有機ノラン単分子膜のマイクロパターンニングと表面特性 第52回高分子年次大会, 2003年5月
- 4) Takahara A, Koga T, Morita M, Otsuka H, Preparation and characterization of multicomponent organosilane nanofilms, Advanced Polymeric Materials and Technology, 2003年8月
- 5) 古賀智之、森田正道、大塚英幸、高原 淳 有機ノラン単分子膜表面での酸-塩基反応に基づく微粒子の一選択的固定化 第56回コロイドおよび界面化学討論会, 2003年9月
- 6) 古賀智之、森田正道、大塚英幸、高原 淳 走査フォース顕微鏡測定に基づく多成分系有機ノラン単分子膜の表面官能基分布評価 第52回高分子討論会, 2003年9月
- 7) 山口智弘、大塚英幸、高原 淳 環境適合型イソシアネートを用いた生分解性セグメント化ポリウレタン、セグメント化ポリウレアの合成と特性評価 第52回高分子討論会, 2003年9月
- 8) 高原 淳 有機ノランナノ薄膜の表面構造と表面特性の精密制御 第53回有機デハイス研究会, 2003年10月
- 9) Koga T, Morita M, Otsuka H, Takahara A Site-specific arrangement of microparticles on organosilane monolayer patterned through photolithography process, 第8回IUMRS先進材料国際会議 (IUMRS-ICAM 2003), 2003年10月
- 10) Yamaguchi T, Otsuka H, Takahara A, Physicochemical properties and biodegradation of segmented polyurethane and poly(urethane-urea) derived from lysine-based diisocyanate, 第8回IUMRS先進材料国際会議 (IUMRS-ICAM 2003), 2003年10月
- 11) 高原 淳、石田英臣、古賀智之、森田正道、大塚英幸 有機ノランナノフィルムの表面機能特性の二次元制御 第8回ケイ素化学協会シンポジウム, 2003年10月
- 12) Takahara A, Koga T, Morita M, Otsuka H Photolithographically defined micropatterned organosilane monolayer as a template surface for guided self-assembly of charged microparticles, tAVS 50th International Symposium, 2003年11月
- 13) 古賀智之、森田正道、大塚英幸、高原 淳 有機超薄膜の局所光分解に基づく表面官能基の面内配列制御 第25回バイオマテリアル学会大会, 2003年12月
- F 知的財産の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

感温性人工細胞外マトリックスの応用
温度応答性高分子化合物を用いたターゲット細胞の培養下 *in situ* 選別回収

分担研究者 高松 洋（九州大学先端物質化学研究所助教授）

研究要旨 多種類の培養細胞の中から特定の細胞のみを選別する技術は、特に幹細胞研究においては極めて重要である。本研究では、浮遊状態の細胞を選別回収するセルソーティングとは異なり、温度応答性的高分子化合物を培養基材とするディノニュに培養した細胞を、顕微鏡下で観察しながら回収する新しい方法の開発を行った。この方法が技術的に可能であることを示した前年度の研究に引き続き、高分子化合物のコーティング法の改良、およびデハイスの改良を行った結果、単一細胞および相互接着細胞の選別回収に成功した。

A 研究目的

本研究は、培養下での細胞選別回収法の開発を目的とする。この新しい方法は、下限臨界共溶温度以下では水溶性を示し、その温度以上では水中に析出するという温度応答性の相分離特性を有する高分子化合物を利用した方法である。この高分子化合物をコーティングしたディノニュに細胞を培養し、培養状態を顕微鏡下で観察しながら任意のターゲット細胞の底面を冷却する。そして、脱着した細胞をマイクロピペットで回収する。この方法を用いると、培養状態における細胞形態での細胞選別が可能であるだけでなく、トリプシン等のタンパク質分解酵素を用いないため、ターゲット細胞とその周囲のディノニュ細胞を含めた細胞塊の回収も可能である。

既に、本方法が実現可能であることは実証したが、回収の確率が非常に低く、その原因は高分子化合物のコーティングにあることが明らかになった。そこで、本研究では、コーティング法の改良およびデバイスの改良を行った上で、再度、細胞の選別回収を試みた。

B. 研究方法

実験試料 マウスの繊維芽細胞株 3T3 を用いた細胞の選別回収を行った。

温度応答性高分子化合物 下限臨界共溶温度が約 31℃のポリ（イソプロピルアクリルアミド）（Poly（N-isopropyl-acrylamide）PNIPAAm）およびそれをグラフト化した下限臨界共溶温度 34℃の PNIPAAm 化ゼラチンを用いた。

コーティングディノシュ $\phi 22\text{mm}$ の丸型カ
ハ－ガラスに PNIPAAm および PNIPAAm ゼ
ラチンの混合水溶液を滴下し、スピコータ
で薄膜を形成すると同時に水分を蒸発させ、
コーティングを行った その後、外径 22mm、
内径 20mm、高さ 4mm のリング状のポリカ
－ボネイト製の枠をカハ－ガラスに接着し、
ディノシュを作成した

スピコーティングの評価 スピコーティ
ングによる薄膜形成の評価を細胞接着性が低
い PNIPAAm を用いて行った $\phi 22\text{mm}$ の丸型
カバーガラスの半面を厚さ $50\mu\text{m}$ のシリコン
ゴムノートで覆い、10% PNIPAAm 水溶液を
滴下してスピコーティングを行った シリ
コンゴムノートを剥した後、細胞を播種し、
1日後の培養状態を観察した そして、コー
ティング層の有無による細胞接着状態の違い
によりスピコーティングの評価を行った

コーティング条件の評価 2%, 4%, 6%, 8%,
10%の 5 通りの質量分率の PNIPAAm 水溶液
を用いて、それぞれカハ－ガラスにスピコー
ティングを行い、細胞播種 1 日後の培養状
態を観察した そして、水溶液濃度の評価、
すなわちコーティング層形成に必要な十分な
PNIPAAm の量の評価した

細胞の接着 脱着特性の評価 細胞の接着お
よび冷却による脱着は、PNIPAAm および
PNIPAAm ゼラチンの混合比に依存するため、
PNIPAAm ゼラチンの質量分率が 0%, 10%,
25%, 50%, 100%の 5 通りの組成について比
較検討した いずれの場合も、上述の

PNIPAAm を用いたコーティング実験の結果
に基づき、PNIPAAm と PNIPAAm ゼラチン
の総量の質量分率が 6%の水溶液を用いてコ
ーティングを行った 細胞密度 $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$
でディノシュに細胞を播種し、1日培養した
ディノシュを 37°C の MEM で軽く洗浄し、浮
遊細胞を除去した後、 37°C 下で培養状態を観
察、記録した その後、 5°C のサーモプレー
トで 10 分間冷却した後、ディノシュを再び
MEM で軽く洗浄して観察、記録した

温調 局所冷却デバイス ディノシュの温度
調節および局所冷却には顕微鏡ステーノ用の
サーモプレート (MATS-505R30, ニコンイン
ステノク) を利用した (図 1) 37°C に保つ
た透明の導電ガラス製ヒータ (厚さ 0.5mm)
の上にディノシュを載せ、ガラスの中央部に
設けられた $\phi 1\text{mm}$ の孔に向かって冷却ガスを
噴射し、ディノシュ底面を冷却した 冷却ガ
ス (窒素ガス) は外径 1mm 、内径 0.6mm の
ガラス管に導入され、出口より斜め上方の孔
に向かって噴射される ガラス管出口近傍の
冷却ガスの温度は、 $\phi 0.25\text{mm}$ の T 型シース熱
電対で測定した

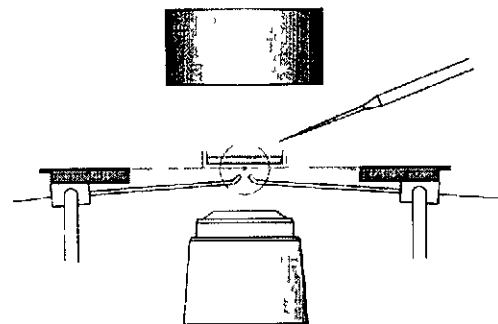


図 1 温調 局所冷却デバイス

冷却特性 表面にφ0.12mm の K 熱電対素線を接着したカバーガラスを冷却デバイスの上に置き、熱電対が孔の中心部に位置するように設置した。細胞の回収と同様に冷却し、カバーガラス上面の温度変化を記録した。

細胞の選別回収 50%PNIPAAm セラチン-50%PNIPAAm をコーティング層とするディノニュを用いて、細胞の選別回収実験を行った。37℃に保った温調・局所冷却デバイスにディノニュを載せ、顕微鏡ステーシに取り付けた X-Y 2 軸ハントルを用いてターゲットの細胞を顕微鏡視野の中心に移動した。その後、冷却を開始し、顕微鏡で観察しながら脱着する細胞をマイクロピペットを用いて吸引した。なお、液の吸引にはノリンシポンプを用いた。細胞の回収の様子は CCD カメラで観察しデジタルビデオに記録した。

C 研究成果及び考察

PNIPAAm をスピニングコーティングした場合、シリコンゴムシートのカバーによりコーティング層の形成がなくガラス基板が露出している半分の面には一様に細胞が接着し伸展したが、もう半分には細胞の接着がほとんど見られなかった（図 2）。また、コーティングに用いる PNIPAAm 水溶液の濃度が 6%以上の場合には細胞が接着しなかったのに対し、4%以下では細胞の接着が観察された（図 3）。したがって、ガラスの全面に PNIPAAm のコーティング層を形成するには、濃度が 6%以上の PNIPAAm 水溶液を用いる必要がある。

細胞の接着および冷却による脱着特性は、PNIPAAm および PNIPAAm セラチンの混合比に大きく依存する。上述の結果が示すように、100%PNIPAAm の場合には細胞の接着性が低いのに対し、PNIPAAm セラチンの混合比を増加すると接着性が増加し、

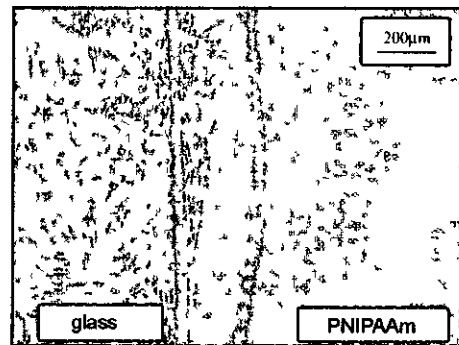
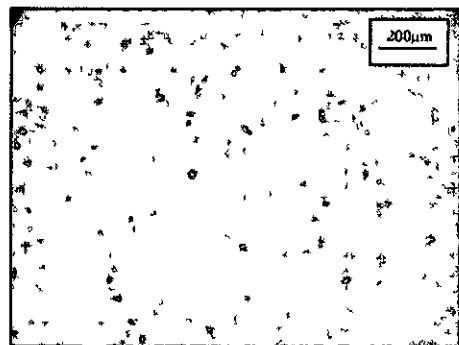
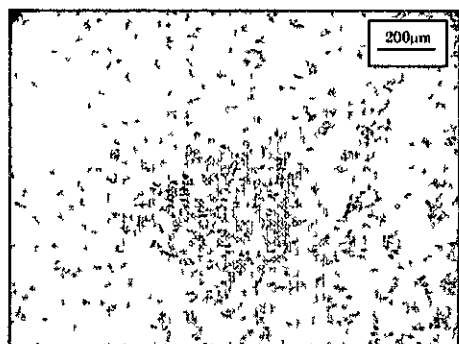


図 2 ガラス表面と PNIPAAm コーティング層における培養状態の比較



(a) 6% PNIPAAm 水溶液



(b) 6% PNIPAAm 水溶液

図 3 PNIPAAm 水溶液濃度が細胞接着に及ぼす影響

25%PNIPAAm セラチンの場合に細胞の接着数は最大になった(図4) 一方, PNIPAAm セラチンの割合が10%以下および100%では冷却しても細胞の脱着がほとんど見られなかったのに対し, 50% PNIPAAm セラチンでは冷却によりかなりの細胞の脱着が観察された(図4) この結果より, 本研究の目的には50% PNIPAAm -50% PNIPAAm セラチンが最適であると考えられる なお, <10% PNIPAAm セラチンの場合にも相当数の接着細胞が計数されているか, その形態は球状のままでありほとんど伸展していなかった

本研究の局所冷却デバイスを用いると, デ

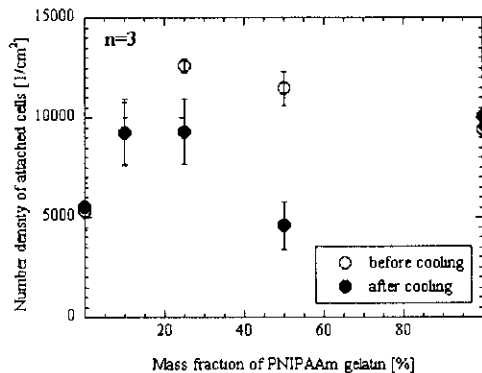


図4 PNIPAAm と PNIPAAm セラチンの混合比が細胞の接着・脱着に及ぼす影響

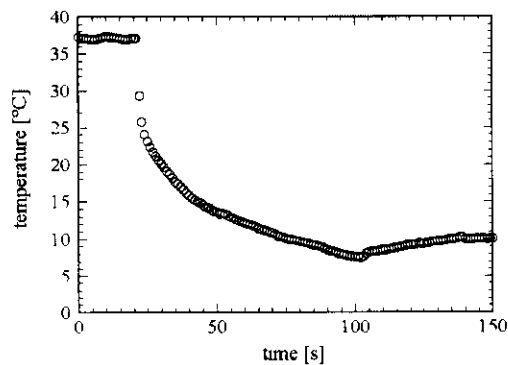


図5 ディノニュー底面の温度変化

ィノニューの底面を急速に冷却することが可能であり, ガラス表面の温度を約20°C下げするのに要する時間は冷却開始から約10秒であった(図5)

このデバイスを用いて細胞の選別回収を行った結果, 単一細胞の回収(図6および図7)および相互接着した細胞2個の同時回収(図8)に成功した また, ほぼ一様なコーティング層が形成されているため, 細胞の選別回収はディノニューの場所に依存せず, 回収確率

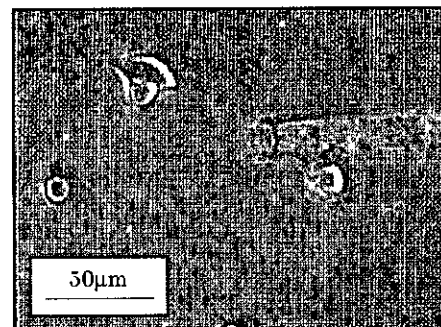
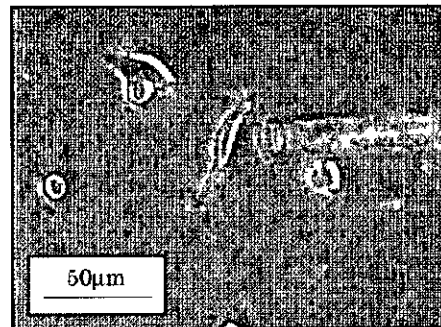
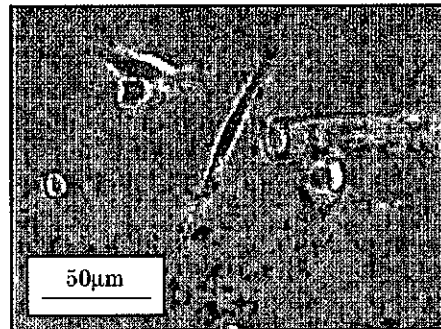


図6 単一細胞の選別回収(例1)

はこれまでの結果に比べて格段に高くなった

今後、この方法の実用化の為には、高温維持部の断熱性を高めて低温になる部分の面積を減らす技術の開発および少量の吸引を可能にする技術の開発が必要であると考えられる
また、液体窒素ガスではなく空気を用いた冷却が可能なデバイスの開発が望まれる

D 結論

感温性高分子化合物をほぼ一様にコーティング

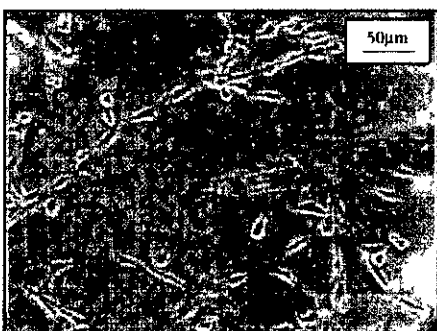
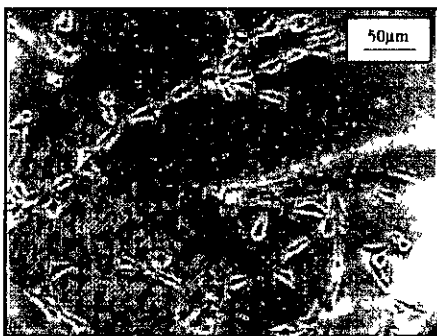


図7 単一細胞の選別回収 (例2)

したディノシュを作成することができた。そして、そのディノシュに培養した細胞を、顕微鏡下で選別し、ターゲット細胞のみを回収することが可能になった。また、相互接着した細胞群の回収にも成功した

E 研究発表 なし

F 知的財産の出願・登録状況 なし

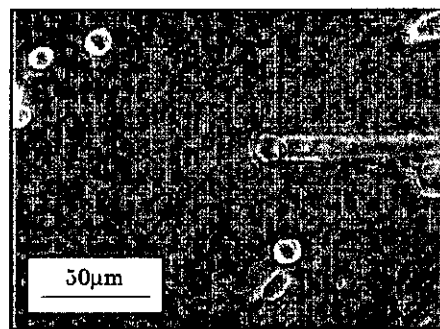
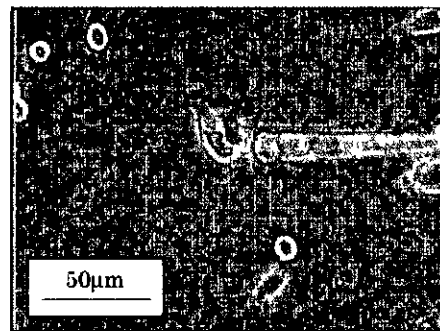
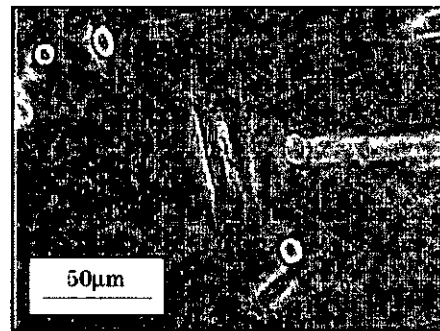


図8 相互接着細胞の選別回収

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

人工細胞外マトリックスによる再生軟骨組織工学

分担研究者 岩本 幸英（九州大学大学院医学研究院整形外科教授）

研究要旨 自己修復しない組織である関節軟骨の再生を試みるため、*in vitro* において感温性ゼラチンと軟骨細胞を用いて軟骨様組織を再構築した。*in vivo* にて、ウサギの膝関節に作製した関節軟骨欠損部位に軟骨細胞を用いたハイブリッド組織を移植し、欠損部の軟骨を再生できることを示した。長期移植成績向上のための、移植術式・条件のスクリーニング実験を行い、最適術式・条件を決定した。

A 研究目的

関節軟骨再生の際、*in situ* でゲル化する液状の骨格基材（scaffold）は複雑な形状を呈する軟骨欠損部を完全に補填することかできる。この概念を基に我々は昨年度、室温では液体であり、34℃以上でゲル化するという特徴をもつ感温性ゼラチンである poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted gelatin (PNIPAAm-gelatin)を用い、軟骨欠損部の複雑な形状に適合することができる新しい軟骨再生技術を開発した。今年度は、再生人工軟骨組織の長期移植成績向上のための、移植術式・条件の検討を行った。

B 研究方法

（実験 1 *In vitro* での PNIPAAm-gelatin を用いた軟骨様組織の再構築）

まず、PNIPAAm-gelatin を以下の手順で合成した。主鎖のゼラチン（分子量 約 9.5×10^4 ）のリンン残基のアミノ基に感温性のポリマー

である PNIPAAm ポリマー（分子量 約 13×10^5 ）を UV を用いて重合した。この PNIPAAm ポリマーかゼラチン 1 分子当たり 約 33 5 個（全アミノ基の約 91%）導入された PNIPAAm-gelatin を実験に用いた。

10 週齢の日本白色家兔の関節軟骨より単離した軟骨細胞を単層培養にて増殖させた後、この細胞を 5%PNIPAAm-gelatin-DMEM 溶液（細胞密度 1.5×10^7 ）と懸濁し、37℃でゲル化させた後、培養を行った（図 1）。培養組織の評価を細胞レベルでは細胞生存率（相対的 DNA 量）、細胞形態（共焦点レーザー走査型顕微鏡）、細胞周期（フローサイトメーター）、細胞分泌細胞外マトリックス（タイプ I I コラーゲン、硫酸化グリコサミノグリカン s-GAG）の定性という観点で、また、組織レベルでは細胞外マトリックスの定量、荷重・除重に対する力学的特性の測定（クリープメーター）を行った。全ての計測は $n=3$ で行った。

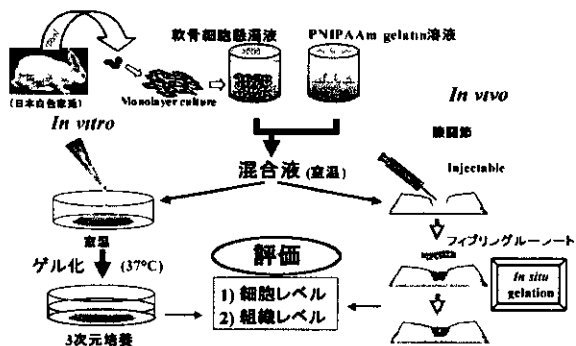


Fig. 1. In vitro 実験と in vivo 実験の概要

(実験 2 In vivo での PNIPAAm-gelatin を用いた関節軟骨修復 長期移植のための術式・条件スクリーニング)

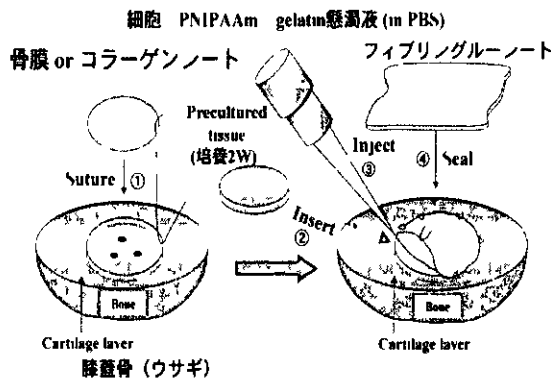
これまでの *in vitro* における研究では次の二つの問題が生じる可能性が考えられた。一つは一旦ゲル化した移植組織が温度低下のために液状となり漏れること、もう一つは荷重負荷のために移植組織が陥凹することである。これらの問題点を解決するために、二種類の被覆材（骨膜またはコラーゲン膜）を用いて移植を行い、軟骨様組織は移植前に 2 週間培養したものと移植前に培養していないものを用いて、最適術式・条件を検討した。

体重約 4 kg の日本白色家兎の膝関節軟骨に直径 3.5 mm の軟骨欠損を作製した。まず、欠損部位に予め 2 週間培養した軟骨様組織、または PNIPAAm-gelatin 懸濁液を入れ、この組織と周囲組織（周辺軟骨、軟骨下骨）の間に細胞-PNIPAAm-gelatin 懸濁液を入れゲル化

表 1 動物実験における移植内容物の構成

Group	No. of knees	移植物			被覆材	
		PNIPAAm gelatin	軟骨細胞	Precultured tissue	骨膜	コラーゲンフィルム
1	n=4	○	○	○	○	—
2	n=4	○	○	○	—	○
3	n=5	○	○	—	○	—
4	n=5	○	○	—	—	○

*全てのグループにおいて、ノーリング材としてフィブリングルーシートを使用。細胞密度 1.5×10^7 cells/ml、PNIPAAm-gelatin 濃度 5%、Precultured tissue の培養期間 2 週間



した後、脛骨より採取した骨膜またはコラーゲン膜で被覆し、更にフィブリングルーシートで縫い目を密閉した（図 2、表 1）。

これらの組織を術後 5 週間目に採取し、関節の拘縮・滑膜炎の有無、関節表面の外観、組織の組織学的・免疫組織化学的評価を行なった。

C 研究成果

(実験 1 In vitro での PNIPAAm-gelatin を用いた軟骨様組織の再構築)

生細胞数は培養期間 3 週間の間、ほぼ一定であり増殖も死滅もしなかった（相対 DNA 量より評価）。細胞形態は球状の細胞形態が経時的に増え、培養 3 週間目には殆どの細胞が球形であった（顕微鏡観察）。細胞周期は G0/G1 期にある細胞の全細胞数に対する割合が 3 次元培養（ゲル内）においては単層培養時に比較し優位に多かった（フローサイトメトリー）。また、分化型軟骨細胞の特異的マーカーであるタイプ I I コラーゲンと s-GAG を共に認めた。以上の各点に基づき、単層培養にて一旦脱分化傾向にあった細胞が再分化したことを確認した。

培養組織内の細胞外マトリックス（タイプ I I コラーゲン、s-GAG）量は共に経時的に増加し、タイプ I I コラーゲンは培養 12 週目に正常軟骨の約 1/5、s-GAG の量は正常軟骨とほぼ同等量に達した。また、培養組織