

耳介軟骨再生を指向したシルクフィブロイン基盤材料の創製

(農工大院・工) ○広瀬萌子、鎌田彩花、秋岡翔太、中澤靖元

【緒言】耳介軟骨は外傷や先天性異常などにより欠損や奇形を生じる。軟骨は自己修復能が低く自然治癒が困難であることから、現在は足場となる組織工学材料を用いて自己組織の再生を誘導するアプローチが注目されている。シルクフィブロイン(SF)は高い成形加工性を有し、耳介軟骨の形状を再現した材料骨格を形成するのに適している。SF 多孔質材料は多数の空隙を有し、細胞の接着、増殖、組織再生のための足場材料として有用であることから、軟骨組織工学材料としての利用が期待される。しかし、従来の凍結乾燥法やポロージェンリーチング法といった空隙作製手法では、材料内部に閉塞した空隙や連通部の径が狭い空隙が存在し、細胞浸潤の制限により組織再生領域が材料表面に限定される。また、SF は細胞接着部位をもたず、軟骨形成誘導能に不足する。

そこで本研究では、連通空隙をもつ SF 基盤材料の作製と、細胞接着部位を導入した SF 基盤複合化材料の作製を試みた。具体的には、3D プリンターで作製した造形体を鋳型として空隙の形状を制御し、材料内部に三次元的に連通した空隙を有する SF 多孔質材料を作製する。また、複合化材料にはヒアルロン酸(HA)を選択した。HA は、細胞表面受容体 CD44 を介した細胞間架橋により細胞凝集を形成し、間葉系幹細胞の軟骨分化を促進する役割が期待される。さらに CD44 との結合により安定した細胞周囲マトリックスを形成し、軟骨の恒常性を維持することから、SF を骨格として材料形態を維持できる HA/SF 複合化材料を作製する。本研究では、作製した各 SF 多孔質体の構造や機械的特性を調査し、連通空隙の形成および HA 複合化による材料特性への影響を考察した。

【実験方法】充填率が異なる二種類の造形体を 3D プリンターで作製した。造形体は井桁構造を有し、構成する柱の積層位置は一定で正則な位相であり、柱の充填率がそれぞれ 20 %(No.1)と 50 %(No.2)である。造形体内部に SF/ジメチルスルホキシド(DMSO)混合溶液を充填し凍結したのち、造形体を融解・除去することで多孔質化 SF を得た。続けて、SF 多孔質体を溶媒に浸漬することで造形体を溶解し、連通空隙を有する各サンプルを得た。また、カルボジイミド化合物を用いて HA カルボキシ基にチラミン(4-hydroxy phenylethylamine)を修飾したチラミン HA(tHA)と、SF、マッシュルーム由来チロシナーゼを混合し(tHA 0.5 (w/v)%, SF 2.0 (w/v)%、酸素流入下で酸化架橋反応を行い、HA-SF 水溶液を調製した。SF と HA-SF 中の tHA の重量比が 80:20、90:10、95:5、100:0 となるよう HA-SF 水溶液と SF 水溶液を混合した水溶液に、DMSO(終濃度 1.0 (v/v)%)を添加し凍結したのち、融解することで、多孔質化された HA/SF 複合化材料(SF80、SF90、SF95、SF100)を作製した。各材料は乾燥状態で走査型電子顕微鏡(SEM)による形態観察と、超純水に膨潤させた状態で一軸圧縮試験を行った。

【結果・考察】Fig. 1 より、SF/No.1、SF/No.2 において、使用した造形体の形状を反映した、連通空隙(黄色矢印)を確認した。各 SF 多孔質体の圧縮弾性率は、SF、SF/No.1、SF/No.2 の順に低下し、造形体の充填率の増加により空隙が占める体積割合が増加し、試料密度が低下したことに起因すると考えられる。一方、HA/SF 複合化材料の圧縮弾性率を Fig.2 に示す。その結果、HA 含有率の高い SF80 は、他の複合化材料や SF と比較し低値をとった。SF80 は酵素による酸化架橋の影響を強く受け、SF の分子鎖間に嵩高い HA が入り込んだことで SF のβシート構造のパッキングが阻害され、弾性率が大きく低下した可能性がある。一方で、HA と SF の複合化材料は 0.5 kPa–4 kPa の圧縮弾性率で軟骨形成マーカーの発現が増大した知見があり、本複合化材料は十分に利用可能であるといえる。発表では、空隙率や含水率などの材料特性とあわせて機械的特性の変化について報告する。

【謝辞】本研究は一部、JST 共創の場形成支援プログラム(JPMJPF2104)、および東京農工大学融合研究支援制度『TAMAGO』により実施した。

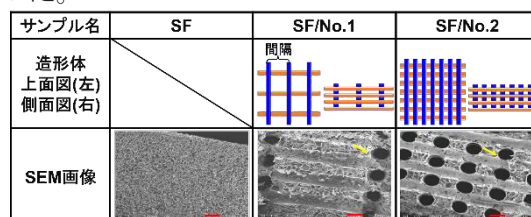


Fig. 1 造形体の設計と SF 多孔質材料断面の SEM 画像 (スケールバー: 500 μ m、黄色矢印: 連通空隙)

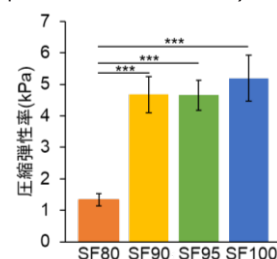


Fig. 2 HA/SF 複合化材料の圧縮弾性率 (***: $p < 0.01$)

Fabrication of Silk Fibroin Based Materials for Auricular Cartilage Regeneration, Moeko HIROSE, Ayaka KAMATA, Shota AKIOKA and Yasumoto NAKAZAWA*: Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Naka-chou, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan, Tel: +81-42-388-7612, *E-mail: y-nakazawa@go.tuat.ac.jp