

氏名	Xiaomeng Li			
学位の種類	博士(工学)			
学位記番号	博甲第 8354 号			
学位授与年月日	平成 29 年 9 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	数理物質科学研究科			
学位論文題目	Preparation of Gelatin Hydrogels with Different Stiffness and Pore Structures and Their Application for Cartilage Tissue Engineering (硬さと多孔質構造が異なるゼラチンハイドロゲルの作製及び軟骨組織再生への応用)			
主査	筑波大学教授(連係大学院)	博士(工学)	陳 国平	
副査	筑波大学教授	工学博士	長崎 幸夫	
副査	筑波大学准教授(連係大学院)	博士(工学)	田口 哲志	
副査	筑波大学准教授(連係大学院)	博士(工学)	荏原 充宏	

論文の要旨

本論文は、ゼラチンの側鎖にメタクリロイル基を導入し、続く光架橋反応によって作製したゼラチンハイドロゲルの硬さ及び多孔質構造による軟骨細胞の機能及び軟骨再生への影響を明らかにし、さらにその原因を考察したものである。

第1章は、研究背景として、軟骨細胞の機能制御及び軟骨組織再生のための足場材料技術、特にハイドロゲルの作製と機能に関する研究の状況が先行文献に基づいてまとめられている。そして研究背景を踏まえ、本論文の研究全体を貫く目的が示されている。

第2章では、ゼラチンハイドロゲルの硬さが及ぼす軟骨細胞の機能への影響を明らかにするために、メタクリロイル基の導入率が異なるメタクリロイル化ゼラチンマクロマーの合成、これらのマクロマーを用いて作製したゼラチンハイドロゲルで軟骨細胞を三次元培養した結果について述べられている。まず、ゼラチンとメタクリル酸無水物を反応させることにより、メタクリロイル化ゼラチンマクロマーを合成した。次に、光重合開始剤の存在下でメタクリロイル化ゼラチンマクロマーに紫外線を照射することにより、ゼラチンハイドロゲルを作製した。このときメタクリロイル基の導入率を変えることにより、ゼラチンの濃度が一定でヤング率が 3.8、17.1、29.9 kPa のゼラチンハイドロゲルを作製した。この3種類のゼラチンハイドロゲルにウシ関節軟骨細胞を内包し、三次元培養を14日間行い、軟骨細胞の形態及び軟骨細胞外マトリックスの分泌について調べた。ヤング率が 29.9 kPa のゼラチンハイドロゲルで培養した軟骨細胞は、同 3.8、17.1 kPa のゼラチンハイドロゲルで培養した場合に比べて多くの硫酸化グリコサミノグリカンを分泌した。

アクチンフィラメントを染色したところ、ヤング率が 29.9kPa のゼラチンハイドロゲルで培養した軟骨細胞は丸い形態を有し、細胞が集合していることが分かった。また、軟骨細胞に特徴的に発現する遺伝子を解析した結果、ヤング率が 29.9kPa のゼラチンハイドロゲルで培養した軟骨細胞は、他のゲルの場合と比べ、II型コラーゲンとアグリカンの遺伝子を高発現した。さらに、サフラニンO染色により、ヤング率が 29.9kPa のゼラチンハイドロゲルで培養した軟骨細胞は、他のゲルの場合と比べ、最も豊富な軟骨細胞外マトリックスを産生したことが分かった。したがって、ヤング率が 29.9kPa のゼラチンハイドロゲルは軟骨細胞の機能保持にもっとも効果的であることが示された。本章で得られたハイドロゲルの硬さによる軟骨細胞の機能への影響は、軟骨再生のためのハイドロゲルの物理的性質の制御に関して重要な知見であると考えられる。

第3章では、ゼラチンのアミノ基、ヒドロキシ基、及びカルボキシル基の側鎖にメタクリロイル基を導入し、より架橋密度が高いゼラチンハイドロゲルの作製、及びその軟骨細胞の機能への影響について述べられている。第2章で合成したメタクリロイル化ゼラチンマクロマー（ゼラチン一次修飾体）をさらにメタクリル酸グリシジルと反応させることにより、ゼラチン二次修飾体を合成した。このゼラチン二次修飾体を光架橋して得られたゼラチンハイドロゲルはゼラチン一次修飾体のハイドロゲルより架橋密度が高いため、高い貯蔵弾性率と低い生分解性を示した。ゼラチン二次修飾体のハイドロゲルで三次元培養した軟骨細胞は高い活性と丸い形態を有したが、ゼラチン一次修飾体のハイドロゲルで培養した軟骨細胞に比べ軟骨細胞外マトリックスの分泌が減少したことが分かった。

第4章では、細胞の増殖を促進するため、ゼラチンハイドロゲルの内部に多孔質構造を導入したゼラチンハイドロゲル多孔体の作製及び軟骨細胞の機能への影響について述べられている。まず、空孔形成剤として未架橋のゼラチンハイドロゲルの立方体微粒子を作製した。次に、第3章で合成したゼラチンの二次修飾体の水溶液に未架橋のゼラチンハイドロゲルの立方体微粒子を添加し、光架橋により未架橋のゼラチンハイドロゲルの立方体微粒子が分散したゼラチンハイドロゲルを作製した。最後に、これを 37°C でインキュベートして未架橋のゼラチンハイドロゲル立方体微粒子を溶解させ、ゼラチンハイドロゲル多孔体を得た。ゼラチンハイドロゲル多孔体で三次元培養した軟骨細胞は、多孔質構造がないゼラチンハイドロゲルで培養した軟骨細胞に比べて高い増殖率を示したが、軟骨細胞外マトリックスの産生量は減少した。このように、ゼラチンハイドロゲルの多孔質構造の有無により、軟骨細胞は異なる影響を受けることが分かった。本章で得られた知見は、軟骨再生のための足場材料の設計と作製に重要であると考えられる。

第5章では、これまでに述べた内容の総括と今後の展望が示されている。硬さ及び多孔質構造を制御したゼラチンハイドロゲルを作製し、軟骨細胞を三次元培養することにより、ハイドロゲルの性質と軟骨細胞の機能の関係を明らかにした。すなわち、ハイドロゲルの物理的性質による軟骨細胞の機能制御が可能となった。本論文の研究を通じて得られた知見は、軟骨細胞の三次元培養及び軟骨組織再生のための足場材料の設計と作製に有用であると結論されている。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文は、ゼラチンハイドロゲルの硬さ及びマイクロ多孔質構造を制御することで、ハイドロゲルで三次元培養した軟骨細胞の機能への影響を明らかにしたものである。まず、ゼラチン側鎖のアミノ基をメタクリル酸無水物と反応させ、メタクリロイル基の導入率が異なる 3 種類のメタクリロイル化ゼラチンマクロマー及びヤング率が異なる 3 種類のゼラチンハイドロゲルを作製した。本ハイドロゲルで軟骨細胞を三次元培養し、硬さが高いゼラチンハイドロゲルで培養した軟骨細胞は軟骨細胞本来の機能を最もよく保持されていたことを明らかにした。また、前述のメタクリロイル化ゼラチンマクロマーのヒドロキシ基及びカルボキシル基をメタクリロイル酸グリシジルと反応させ、メタクリロイル基の導入量がさらに高いゼラチン修飾体を合成した。このゼラチン修飾体で作製したゼラチンハイドロゲルはさらに高い貯蔵弾性率に加え、低い生分解性を示した。本ゼラチンハイドロゲルは軟骨細胞の機能を抑えることを明らかにした。さらに、ゼラチンハイドロゲルにマイクロ多孔質構造を導入し、ゼラチンハイドロゲル多孔体の作製に成功し、マイクロ多孔質構造による軟骨細胞の機能への影響を明らかにした。得られた結果にもとづき、多孔質構造は軟骨細胞の増殖に有利に働くと結論づけている。これら一連の研究成果は、ゼラチンハイドロゲルの硬さや多孔質構造などをデザインすれば、ハイドロゲルで三次元培養した軟骨細胞の機能を制御できることを示しており、軟骨組織の再生のための足場材料の設計・作製において重要な学術的貢献を果たすものである。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として十分な学術的価値をもつものと認める。

〔最終試験結果〕

平成29年8月18日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。