

琉球大学学術リポジトリ

分子ステント法を用いて新たに開発した、軟骨基質高分子を複合化したダブルネットワークゲルの生体材料特性評価

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学 公開日: 2017-05-17 キーワード (Ja): キーワード (En): Double-network hydrogel, Glycosaminoglycan, Sodium hyaluronate, Chondroitin sulfate, Chondrogenic differentiation 作成者: 比嘉, 浩太郎, Higa, Kotaro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/36650

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Fundamental biomaterial properties of tough
glycosaminoglycan-containing double network hydrogels
newly developed using the molecular stent method

(分子ステント法を用いて新たに開発した、軟骨基質高分子を複合化したダブルネット
ワークゲルの生体材料特性評価)

氏名 比嘉 浩太郎



【目的】我々が独自に開発したダブルネットワーク(DN)ゲルは優れた力学物性とともに関骨分化誘導能を有している。臨床応用に向けた新たな材料として、分子ステント法によりコンドロイチン硫酸(CS)とヒアルロン酸(HA)の軟骨基質高分子を複合化したDNゲル(CS-DN、HA-DN)を開発した。本研究の目的は、これらのゲルの生体内における力学および生物学的特性について評価するとともに、ATDC5細胞の軟骨分化に与える影響を検討することである。

【方法】本研究では3つの実験を行った。(実験1)HA-DN、CS-DNのex vivo及びin vivoにおける力学強度および含水率を評価した。それぞれのゲルを直径10mm、高さ5mmの円板状に作成し、ex vivoでは37度5%CO₂の培養器内でPBS中に保存した。in vivoでは日本白色家兎10羽を用い背部皮下組織に埋植した。各群において6週、12週後に圧縮破断試験(n=7)を行い、破断強度および弾性率の測定を行った。また同時期の含水率測定(n=3)も施行した。(実験2)日本白色家兎21羽を用い、1x1x10mmの直方体のCS-DN、HA-DN、陰性対照

材料、陽性対照材料を背部の傍脊柱筋内に埋植した。埋植1、4、6週後にn=7ずつ筋組織ごと摘出し組織学的観察に加え、サンプル周囲の炎症領域幅を計測した。(実験3)CS-DN、HA-DN、ポリスチレン(PS)上でATDC5細胞を7日間培養し2型コラーゲン、アグリカン、Sox9、10型コラーゲン、Runx2の発現解析および2型コラーゲンの免疫染色を行った。統計解析には分散分析を用いた。

【結果】(実験1)Ex vivoにおけるHA-DNの破断強度、初期弾性率は7.90MPa、0.72MPa、CS-DNは2.47MPa、0.35MPaでありHA-DNは有意に高い値を示した。また両ゲルともにPBS保存期間における圧縮破断強度、初期弾性率、含水率の変化は認めなかった。in vivoにおいてHA-DNの破断応力、初期弾性率は埋植前と比べ有意に低下した。一方CS-DNでは埋植による破断応力、初期弾性率の有意な変化を認めなかった。埋植12週における両ゲルの破断応力および初期弾性率に有意差は認めなかった。(実験2)埋植1週でのCS-DN周囲の炎症領域幅はHA-DN、陰性対照より有意に大きく、陽性

対照より有意に小さかったが、4、6週では陰性対照と有意差を認めなかった。一方で HA-DN は全埋植期間において陰性対照群と比べ同程度の炎症反応を惹起するのみであった。(実験 3) HA-DN、CS-DN 上の ATDC5 細胞は細胞凝集塊を形成し、蛍光免疫染色では PS に比べ 2 型コラーゲンの有意な発現を認めた。またリアルタイム PCR では PS ディッシュと比較し、HA-DN ゲル、CS-DN ゲル培養で 2 型コラーゲンとアグリカンの有意な発現上昇を認めた。

【考察および結論】HA-DN は CS-DN より高強度であるが、生体内で HA-DN の破断強度および初期弾性率は低下し、CS-DN では不変であった。CS-DN は埋植 1 週目のみ陰性対象材料と比べ周囲組織の炎症反応を認めた。一方 HA-DN は陰性対象材料と同程度の炎症反応のみ惹起した。CS-DN、HA-DN は *in vitro* における高い軟骨分化能を持ち、軟骨再生誘導ゲル材料としての可能性を示した。