

(研究題目) サイトカインリザーバーとしての機能性ハイドロゲルの合成
Synthesis of functional hydrogel play as a cytokine reserver

(研究者)

岸田晶夫 助教授 鹿児島大学工学部応用化学工学科
Akio Kishida, Associate Professor,
Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering,
Faculty of Engineering, Kagoshima University

For controlling soft tissue regeneration and wound healing, the functional hydrogel, which work as a cytokine reserver, was prepared. In this study, we focus on the synthesis and the evaluation of physiological activities of sulfonated poly(glucosyloxyethyl methacrylate (PolyGEMA) and its hydrogel. The sulfonated polyGEMA has relatively high anticoagulant activity and its hydrogel was successfully prepared by γ -ray radiation crosslinking.

1. 研究目的

生体に外科的侵襲があった場合、または人工材料を生体に埋入して使用する場合は、過度な創傷治癒や組織との界面での慢性的な炎症は組織や臓器間の癒着をもたらし、逆に加齢などによる治癒能力の衰えは術後管理を著しく繁雑にする。近年、創傷治癒に関するサイトカインについての研究が伸展し、それぞれのサイトカインについての知見も集積されてきた。本研究の目的は、このような細胞生化学の最近の成果をもとにして、生体組織の治癒過程を制御するための新しい材料工学的的方法論に基づき、サイトカインリザーバーとなる新しい材料を開発してこの方法論の有効性を実証することである。

具体的には、炎症や創傷治癒に関わる多くのサイトカインの中から、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) および腫瘍増殖因子 (TGF- β) に注目した。bFGFは、炎症初期に治癒に関連している炎症細胞群を遊走させる機能を有し、TGF- β は組織中に不活性な状態で存在し、炎症・治癒においてマクロファージの機能を制御していると考えられている。遊離のbFGFあるいはTGF- β を用いた治癒促進の研究が報告されているが、bFGFは非常に不安定であり、またTGF- β は濃度依存的に創傷治癒を促進・阻害する作用があるためその投与方法・投与量が問題となる。bFGFやTGF- β は組織中においてヘパリン様多糖に結合した状態で存在し、炎症の過程に応じて、遊離もしくは再結合する。また、他の多くの細胞成長因子が同様に組織中のヘパリン様多糖に結合して存在していることが知られている。これらの事実から、組織中のヘパリン様多糖のサイトカインリザーバーとしての機能を代行する材料が開発できれば、創傷治癒の機構解明や機能制御が可能になると考えられる。

2. 研究経過および成果

本研究は、(1)ヘパリン活性を有する親水性高分子の合成、(2)合成した親水性高分子の生理活性の評価、(3)合成した親水性高分子を用いた機能性ハイドロゲルの合成、(4)サイトカイン結合ハイドロゲルとマクロファージとの相互作用、以上の段階を踏まえて行った。

(1)ヘパリン活性を有する親水性高分子の合成

親水性高分子に硫酸基を結合させるとヘパリンの抗凝固活性が発現されることが明らかになっている。本研究では、側鎖に糖残基を有する単量体を用いて、天然の多糖類と合成高分子の双方の利点を合わせもつ親水性高分子-オリガノシリコンエチルメタクリレート (poly(GEMA)) を硫酸化した硫酸化poly(GEMA)を合成した。

PolyGEMA($M_n=1.8 \times 10^5$)をN,N-dimethylformamide(DMF)に溶解させ0℃に保ち、DMF-SO₃混合物を加え、25℃窒素気流下で撹拌して反応を行った。反応終了後、この反応物をNaOH-メタノール-水(1:90:9, W/W/W)に滴下して中和し、その後、水およびメタノールをエバポレーションによって除去し、蒸留水によって透析し、凍結乾燥を行った。硫酸化polyGEMAの硫酸化度は、元素分析より求めた。硫酸化polyGEMAの硫酸化の確認は、polyGEMAでは確認されなかった800cm⁻¹付近のC-O-Sの吸収と1260cm⁻¹付近のS=Oの吸収により行った。元素分析により求められる硫酸化度は、polyGEMAとSO₃との反応時間等によりモノマーユニット当り0.12から3.75まで変化させることができた

(2)硫酸化poly(GEMA)の生理活性（抗凝固活性・サイトカイン結合活性）の評価

polyGEMA及び硫酸化polyGEMAの抗凝固活性はLee-White法を用いて評価した。硫酸化polyGEMAを添加した場合、全血凝固時間は濃度依存的に延長され、抗凝固活性剤を含まない血液やpolyGEMAを含む血液よりも大幅に凝固時間の延長が認められた。次に抗血液凝固活性を有することが知られている他の高分子と硫酸化polyGEMAの抗凝固活性の比較を行った。それぞれの高分子の硫酸化度や分子量が異なるため単純な比較はできないが、本実験結果からは硫酸化polyGEMAはポリスチレンスルホン酸(PS)やポリビニル硫酸(PVS)などのビニル系硫酸化高分子より高い活性を示したが、硫酸化多糖の一つであるデキストラン硫酸(DS)より低い活性を示した。また1IU/mgのヘパリンより1mg/mlの硫酸化polyGEMAは高い抗凝固活性を示した。この結果より、硫酸化poly(GEMA)の抗血液凝固活性発現は硫酸基の存在と多糖構造によるものであると考えられた。

次にこの抗凝固活性の発現機構がヘパリン同様あるいは類似のメカニズムにより発現されているか否かを調べるために、まずアンチトロンビンIII(ATIII)とのコンプレックス形成能により評価した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を利用して硫酸化polyGEMA、ヘパリンの存在下、非存在下でのATIIIとトロンビンのコンプレックス形成速度を比較したが、硫酸化polyGEMA

-ATIIIの複合体の形成速度の増加は確認されなかった。次に、活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)、プロトロンビン時間(PT)、そしてフィブリノーゲン凝集時間(TT)を測定して検討を行った。aPTTとPTのいずれも硫酸化polyGEMAが約100 μ g/mlで凝固の阻害が認められたが、TTが100 μ g/mlより高い濃度で凝固しなくなったため、硫酸化polyGEMAはトロンビンの活性、あるいはフィブリノーゲンの凝集を阻害することにより抗凝固活性を発現していると推論される。以上の結果から、硫酸化polyGEMAの抗凝固活性発現機構はヘパリンの発現機構と異なるものと判断した。

a F G Fと細胞増殖促進増強活性を、L929細胞を用いて評価した。poly(GEMA)には活性が見られなかったが、硫酸化poly(GEMA)については、硫酸化度に応じて活性が増大することが明らかとなった。活性の大きさはヘパリンには及ばなかったが、他の硫酸化多糖(ヘキストラン硫酸)と同等の活性を有していた。

(3)硫酸化高分子ハイドロゲルの作製

本研究では、ハイドロゲル作製法として放射線架橋法を用いた。硫酸化polyGEMAを蒸留水に各濃度で溶解し、窒素で5分間バブリングした後、その水溶液に152krad/hrで γ 線を照射することによって架橋反応を行った。様々な硫酸化度の硫酸化polyGEMA水溶液の濃度を変化させて放射線照射を行ったところ硫酸化度の増加と共に、ポリマー水溶液が高濃度でないとゲル化しなくなった。これは硫酸化度の増加と共にポリマー間のイオン反発が大きくなり、ポリマー同志が水溶液中で近づくにくくなるため、架橋されなかったものと思われる。

次に抗血液凝固活性を示すことが報告されている硫酸化高分子への放射線照射によるハイドロゲルの合成を試みた。各々の硫酸化高分子の放射線照射に用いることのできる最高濃度のものを用いたが、硫酸化polyGEMAのゲルのみが生成した。以上の結果より、硫酸化polyGEMAのハイドロゲルはサイトカインゲルとしての材料化に適していると考えられた。

(4)サイトカイン結合硫酸化ハイドロゲルによるマクロファージの機能制御

本研究では、作製した種々の硫酸化ハイドロゲルにa F G FまたはT G F- β を含有させ、マクロファージとの相互作用をin vitroで観察し、I L-1の産生量等で活性を評価した。位相差顕微鏡観察では活性化等の所見が得られなかったため、I L-1の産生量の定量を試みたが細胞濃度が低すぎるため検出できなかった。そこで、細胞内のm R N A発現をP C R法によって増幅し、検出することを考案した。現在、培養環境下におけるP C R法の評価法としての有用性を検討している。

3. 発表論文リスト

- 1) A.Kishida, M.Akashi, et al., Anticoagulant Activity of Sulfonated Poly(glucosyoxymethylmethacrylate), Biomaterials, to be submitted
- 2) A.Kishida, M.Akashi, et al., Evaluation of Biocompatibility of Biomaterials using RT-PCR., Biomaterials, to be submitted