

## 組織再生治療へ応用する脱細胞化組織由来ハイドロゲルの作製

\*<sup>1</sup>国立循環器病研究センター研究所, \*<sup>2</sup>関西大学化学生命工学部, \*<sup>3</sup>龍谷大学大学院先端理工学研究科

森本 美明\*<sup>1,2</sup>, 大石 千聖\*<sup>1,3</sup>, 中沖 隆彦\*<sup>3</sup>, 柿木 佐知朗\*<sup>2</sup>, 馬原 淳\*<sup>1</sup>

Mia MORIMOTO, Chisato OISHI, Takahiko NAKAOKI, Sachiro KAKINOKI, Atsushi MAHARA

### 1. 目的・方法

細胞外マトリックス (ECM) に含まれるコラーゲンやプロテオグリカンは細胞接着や創傷治療因子として機能することから、組織損傷部位の治癒・再生を誘導する材料として期待できる<sup>1)</sup>。酵素処理によって得られる可溶性ECMは、注入可能であり、生体温度となる37℃でハイドロゲル化することが知られている<sup>2)</sup>。一方、生体由来組織からなるハイドロゲルの機械的強度は、動物種や由来する組織によって大きく異なる。本研究では、機械的強度が高く、残存性が良好なECMハイドロゲルの作製法を検討することを目的として、半月板組織、耳介軟骨組織、アキレス腱組織の脱細胞化組織から可溶性ECMを作製し、ハイドロゲルの形成とその力学強度について検討した。さらに、細胞接着性試験から細胞親和性、*in vivo*注入試験では残存性を評価した。

ブタ由来半月板 (pME)、ブタ由来耳介軟骨 (pEC)、ウシ由来アキレス腱 (bAC) を980 MPaで10分間高圧処理を加えた後、デオキシリボヌクレアーゼ (DNase) 溶液に3日間37℃で浸漬させ、脱細胞化した。その後、凍結乾燥して粉末化し、ペプシンを含む塩酸 (HCl) 溶液を加えて攪拌することでECM溶液を得た。pHを7.4に調整後、37℃に加温し、ハイドロゲルを作製した。動的粘弾性測定により、力学的強度と注入性を評価した。また、作製したECM溶液でコートした24 wellプレートにマウス線維芽細胞 (NIH/3T3) を播種し、Calcein-AM染色を用いて増殖性や細胞伸展性を蛍光顕微鏡で観察した。次に、蛍光色素であるローダミンBイソチオシアナートを混合させたECM溶液をラットの膝関節に注入し、注入直後と注入3日後におけるECMハイドロゲルの残存性を蛍光顕微鏡により観察した。

### 2. 結果

組成を解析した結果、すべてのECM溶液にコラーゲン $\alpha$ 鎖や $\beta$ 鎖が含有されていることを認めた。動的粘弾性を解析した結果、最大貯蔵弾性率は、pMEが319 Pa、pECが88 Pa、bACが58 Paであり、pMEが最も高い弾性率を示した。加えて、せん断粘度により、すべてのECM溶液においてせん断応力を受けると、粘度が減少する擬塑性挙動がみられた。この結果から、pME、pEC、bAC由来のECM溶液は、注射可能な粘性を持つことがわかった。

細胞播種後7日目の細胞形態を観察した結果、いずれの表面でも細胞は伸展した。また、細胞播種後7日目の細胞密度は、pMEが71 cells/mm<sup>2</sup>、pECが167 cells/mm<sup>2</sup>、bACが122 cells/mm<sup>2</sup>であった。これらの結果は、生体由来ハイドロゲルの場合でも50~300 Pa程度の弾性率によって接着細胞の伸展が誘導される可能性を示唆しており、pEC由来のECMハイドロゲル上で培養された細胞が、最も増殖・伸展したことがわかった。さらに、ラットの膝関節にECM溶液を注入し観察した結果、溶液注入直後は膝関節部に良好に滞留し、注入3日後でもECMハイドロゲルが残存していることが確認された。

### 3. まとめ・独創性

機械的強度と細胞親和性が良好で、関節内への注入後も残存が認められたことから、組織注入用ハイドロゲルとして有望である可能性を見出した。本研究は、組織損傷部位の治癒・再生を誘導するECMハイドロゲル開発への展開が期待される。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

### 文 献

- 1) Diller RB, Tabor AJ: The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Biomimetics* (Basel) **7**: 87, 2022
- 2) Zhang W, Du A, Liu S, et al: Research progress in decellularized extracellular matrix-derived hydrogels. *Regen Ther* **18**: 88-96, 2021

#### ■ 著者連絡先

国立循環器病研究センター研究所  
(〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町6-1)  
E-mail. mahara@ncvc.go.jp