

平成 年 月 日

平成 27 年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：神戸大学大学院工学研究科

職名：准教授

氏名：大谷 亨

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：安定化された成長因子の放出制御による血管再生用足場材料の創製
2. 再生医科学研究所共同研究者： 山本 雅哉 准教授
3. 研究期間：平成 27 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

4. 研究経過及び研究成果：

本研究では poly(ethylene glycol) (PEG) をグラフトした hyaluronic acid (HA) (PEG-*g*-HA) を用いたヒドロゲルを作製し、この PEG グラフト化による放出挙動への影響、内包量と放出率、放出期間の規格化を目指した。PEG をグラフト化することで、HA とマイクロ相分離することが既往の研究から明らかとなっており、インスリンが PEG ドメインへ分配することで放出制御が可能であることが明らかになっている。本研究ではこの原理を利用し、成長因子である塩基性繊維芽細胞(bFGF)の放出制御に適用し、血管新生用の scaffold としての可能性について *in vitro* 及び *in vivo* より検討した。

HA23 (M_n : 230 kDa) と α -Methyl- ω -aminopropoxy polyoxyethylene (PEG-NH₂, M_n : 5,200) とを純水に溶解させ、縮合剤存在下にて室温にて攪拌した。このとき、多糖:PEG 重量比を変更し、透析による精製後、PEG グラフト率が 5 及び 63wt% の二つの PEG-*g*-HA (P5gHA23、P63gHA23) を得た。得られた PEG-*g*-HA をさらに両末端アミノ化 PEG と同様に縮合反応することで、P5gHA23 ゲルおよび P63gHA23 ゲルを得た。どちらのヒドロゲルも透明のヒドロゲルであり、含水率は 95% 以上と同等であった。凍結乾燥後のゲルに、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) ラベル化した bFGF を添加して 1 日放置後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) 溶液に浸漬させ、適宜サンプリングを行い蛍光強度測定により FITC 化 bFGF の累積放出率を算出した。これらヒドロゲルからの bFGF 放出量は PEG グラフト化率が 63% のときに減少し、かつ放出速度も小さくなる傾向が見られた。一方、PEG グラフト率が 5% のときは、放出速度が増大し、放出量も多く

なる傾向がみられた。FITC ラベル化 bFGF は PEG と HA の水性二層分離系において PEG 相へ分配される傾向が示されたことから、PEG グラフト化に伴って PEG 相へ分配された結果であると示唆された。

さらに、これらヒドロゲルからの bFGF 徐放化によるマウス背部皮下における血管新生について評価した。マウス背部皮下埋入 1 週間後のヘモグロビン量を定量したところ、血管新生は PEG グラフト化によって有意に増大し、組織学的評価からも血管新生が確認された。以上から、PEG-g-HA の PEG グラフト率の違いは、bFGF の放出制御による血管新生の規格化を推進するための大きな要因となることが示された。今後は、個々の個体差に適用可能な bFGF 放出速度・放出量を規格化し、ヒドロゲルの分解・消失制御も可能とする架橋法の検討についても推進していく。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

1. Ari. YAMAMOTO, Masaya. YAMAMOTO, Yasuhiko TABATA, Tooru, OOYA, Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor By Poly(ethylene glycol)-*g*raft-Hyaluronic Acid Hydrogels for Angiogenesis, in preparation.

【国内発表】

1. 山本阿里, 大谷 亨, “成長因子と相互作用するアニオン性ブロック共重合体の調製” 第63回高分子年次大会、名古屋、2014年5月30日.
2. 山本阿里, 大谷 亨, “硫酸基とカルボキシ基を有するポリマーのヘパリン類似活性評価” 第60回高分子研究発表会(神戸)、神戸、2014年7月24日.
3. 山本阿里, 大谷 亨, “細胞増殖因子と複合化したヘパリン類似ポリマーによる細胞増殖活性制御のアプローチ” 第36回日本バイオマテリアル学会、船堀、2014年11月18日.
4. 山本阿里, 大谷 亨, “ヘパリン類似ポリマーの化学構造による細胞増殖因子結合性の違い” 神戸大学研究基盤センター若手フロンティア研究会2014, 神戸, 2015年12月24日.
5. 山本阿里, 大谷 亨, “ヘパリン類似ポリマーを用いた細胞増殖因子内包ゲルの作製” 第64回高分子年次大会、札幌、2015年5月27日.
6. 山本阿里, 大谷 亨, “超分子ゲルとヘパリン類似ポリマーを組み合わせた成長因子放出制御ゲルの調製” 第64回高分子討論会、仙台、2015年9月17日.
7. 山本阿里, 大谷 亨, “ヒアルロン酸を用いた細胞増殖因子内包ゲルの精密放出制御へのアプローチ” 第37回日本バイオマテリアル学会、京都、2015年11月10日.
8. 大谷 亨, “ヒアルロン酸とポリエチレングリコールを組み合わせたプロテインデリバリーの可能性” 高分子学会九州支部フォーラム～高分子科学と医療技術の交差点～、熊本、2016年1月18日.