

細胞足場としての自己組織化エラスチンゲルの開発

Development of self-organization elastin gel as a scaffold for tissue engineering

○ 傍嶋達也 (三重大) 堀江俊貴 (三重大) 山田将義 (三重大)

晝河政希 (三重大) 影山聡志 (三重大) 堀内孝 (三重大) 宮本啓一 (三重大)

Tatsuya SOBAJIMA, Mie University, Toshiki HORIE Mie University, Masayosi YAMADA Mie University
Masaki HIRUKAWA Mie University, Satoshi KAGEYAMA, Mie University
Takashi Horiuti, Mie, University, Keiichi MIYAMOTO, Mie University

Abstract: Elastin is one of the elastic fiber abundantly contained in the organ which needs elasticity, such as an artery and a ligament. The soluble elastin is generated by carrying out heat oxalic acid treatment of the insoluble Elastin, and it becomes possible to process. Moreover, the soluble elastin can also cause self-organization called the coacervation. We produced elastin gel with a continuous pore structure using self-organization as a scaffold for tissue engineering.

Key Words: Elastin gel, Coacervation, self-organization,

1. 緒言

靱帯、動脈、肺など、弾性を必要とする組織には弾性線維が豊富に存在している。中でも弾性線維の主成分は弾性タンパク質であるエラスチンで、熱シュウ酸処理により水溶性エラスチンに分解し、調製することができる。

水溶性エラスチンにはコアセルベーションといった特異な自己凝集を持つことが知られている。これは低温では透明な均一溶液で、ある温度の時にエラスチンがマイクロに凝集し溶液が濁り始め、その後エラスチンがマクロに凝集し、完全な二層に相分離し、再度冷却すると元の均一溶液に戻る可逆的な現象である。

我々はこれまでにコアセルベーション温度の違いによりA~Eの5種類のクラスに区別した水溶性エラスチンを開発してきた。⁽¹⁾(Table 1)

Table 1 Type of soluble Elastin

Elastin class	A	B	C	D	E
Coacervate temperature	>22.5°C	22.5 -25.0°C	25.0 -30.0°C	30.0 -35.0°C	35.0 -50.0°C

本研究では、架橋剤を用いることでゲル化が容易なエラスチンAと、ゲル化しない特徴を持つエラスチンEの二種類のエラスチンを混合し、洗浄処理を施すことにより、細胞がゲル内で移動可能となる連続孔を持ったゲルを作製することを目的とした。

2. 方法

2-1 エラスチン混合ゲルの作製

エラスチンA、及びエラスチンEを任意の組成比にしてmilli-Q水に溶解して混ぜ合わせ、Dode-DSP⁽¹⁾(架橋剤)、Na₂CO₃(加速剤)を加えた。その後遠心分離(2000rpm/3min)で脱気し、37°Cのインキュベーター内で静置して自己組織化させることでゲルを作製した。ゲル化後は脱イオン水にて2日間洗浄して、エラスチンEを除去した。

2-2 コアセルベーションの可視化

エラスチン溶液にローダミンBイソチオシアナート(RITC)をラベル化し、温度調節を付属させた共焦点レーザー顕微鏡(LSCM)にて温度上昇と共にタイムラプスにより観察した。エラスチンAとEの混合溶液の観察の際にはエラスチンEのみをRITCでラベル化させて観察を行った。

2-3 走査型電子顕微鏡(SEM)によるゲルの観察

ゲル化後の内部構造をSEMにより観察した。洗浄前後の構造の検討により、ゲル内の孔径のコントロールに対するエラスチンAとEの混合の効果を評価した。観察するゲルをエタノールで段階的に脱水し、t-Bu-OH/Et-OH(50%w/w)、t-Bu-OH(100%)で置換し、凍結乾燥した。その後、金イオンスパッタリングをし、SEMにて観察を行った。

2-4 ゲル内細胞培養

作製したゲル上にブタ大動脈由来の平滑筋細胞を播種し、静置した。培地を洗浄液として1日間洗浄し、その後培地を取り除き、PBSで洗浄し、アセトン/Me-OHで5分間固定した。BSA/PBSを加えてブロッキングをし、一次抗体としてα-SMA、二次抗体としてDylightとPIを加え、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3. 結果

Fig.1 にエラスチンAを30%、エラスチンEを70%で混合させて作製したゲルのSEM画像を示す。左の図は洗浄を加えていないゲルであり、右の図は2日間洗浄処理を施したゲルの断面構造を観察したものである。

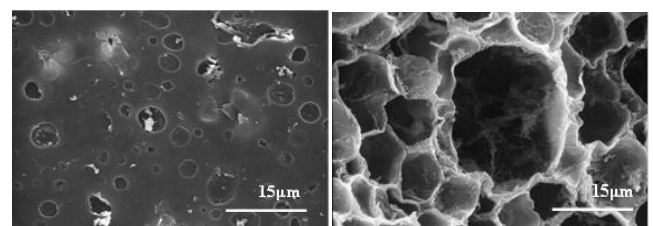


Figure1 Elastin A · E mixture gel (Not wash / 2Days wash)

この結果より、エラスチンゲルの断面に円状の孔が多数できていることが観察された。これらの平均孔径を、エラスチン A と E の混合比を変えて作製したゲルについて、それぞれ測定した結果を Fig.2 に示した。

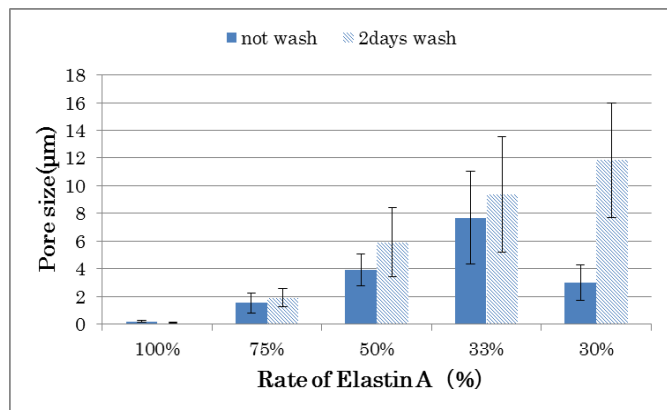


Figure2 Average pore size of Elastin gel

エラスチンAが100%のゲルでは、洗浄前の平均孔径が $0.17 \pm 0.07 \mu\text{m}$ であったのに対し、洗浄後は $0.10 \pm 0.03 \mu\text{m}$ と、大きく変化しなかった。

しかし、エラスチンAが50%、エラスチンEが50%のゲルでは、洗浄前の平均孔径が $3.90 \pm 1.14 \mu\text{m}$ であったのに対し、洗浄後は $5.91 \pm 2.50 \mu\text{m}$ となり、洗浄後の方がゲルの孔径が大きくなった。この結果は他の混合比でも同様であり、エラスチンAの混合比の減少（エラスチンEの混合比の増加）と共に、ゲルの断面の平均孔径は増大する傾向が見られた。

4. 考察

エラスチンAとエラスチンEはコアセルベーション温度に差があり、ゲル化する際の 37°C という温度は、異なる二種類のミクロな相分離を引き起こすと考えられる。凝集しやすいエラスチンAの相では架橋により網目構造を形成しゲル化を起こす一方で、凝集しにくいエラスチンEの相では一部が架橋するものの、大部分は架橋できずにゲル内に留まり、洗浄中に分子鎖の長さによりゲル外に排出されたと考えられる。そのため、エラスチンEの含有量が多い程ゲルの孔径が大きくなり、本来のゲルの孔径以上の大きさの孔の形成を可能にすると示唆される。

また、コアセルベーション挙動の観察結果より、これらのエラスチンEの相同土が結合し連続構造を形成し、洗浄により連続孔を形成できる可能性もあることがわかった。

5. 結論

本研究により、二種類の性質の異なるエラスチンを加え自己組織化させることで、ゲル内でミクロな相分離を起こし、一方をゲル化させて洗浄によって他の一方をゲル内部から除去する方法に成功した。

6. 参考文献

1) Keiichi Miyamoto, et al: Creation of cross-linked electrospun isotopic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker. Int. J. Biol. Macromol; vol. 45, pp. 33–41. 2009