

# 学位申請論文

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

総合歯科学分野

武田 宏明

生体擬似的環境の構築による唾液腺形態形成のメカニズム理解と制御

武田 宏明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 総合歯科学分野

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 総合歯科学分野 (指導: 鳥井康弘教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体材料学分野 (委託: 松本卓也教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 62 回日本歯科理工学会学術講演会 (2013 年 10 月 新潟)

第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月 東京)

## 緒言

口腔内で分泌される唾液には抗菌作用<sup>1)</sup>、粘膜保護作用<sup>2)</sup>、pH 緩衝作用<sup>3)</sup>、歯の再石灰化<sup>4)</sup>、消化作用<sup>5)</sup>、自浄作用<sup>6)</sup>といった機能があり、口腔内および生体環境の維持に重要な役割を果たしている。近年、増加傾向にある口腔乾燥症は唾液分泌の低下によって引き起こされる。この原因として、加齢<sup>7)</sup>や全身疾患<sup>8)</sup>、薬剤による副作用<sup>9)</sup>、放射線照射による唾液腺障害<sup>10)</sup>などが挙げられる。口腔乾燥症により、齲蝕<sup>11)</sup>や歯周病<sup>12)</sup>の進行、口腔カンジダ症の発症<sup>13)</sup>、味覚の低下<sup>14)</sup>、口腔内の灼熱感<sup>15)</sup>、食事や会話の困難など、QOL の低下が問題となる<sup>16)</sup>。唾液腺は、一度損傷してしまうと完全な組織再生は起こらないため、現在含漱剤や副交感神経刺激薬などの投薬や人工唾液の利用といった対症療法による治療が主として行われている<sup>17)</sup>。根本的な治療として、唾液腺の組織再生療法の確立が望ましいが、唾液腺は上皮系細胞、間葉系細胞および血管や神経などが高度に組織化されているため唾液腺の完全再生は困難であり、現在その目的に向けた種々の研究が進められている段階にある<sup>18)</sup>。

組織再生の達成にあたり組織発生を理解することは重要である。マウスの場合、大唾液腺の1つである顎下腺組織は胎生 11 日目に上皮組織が間葉組織に陥入することで始まる。陥入した上皮組織は、間葉組織に周囲を覆われた環境で分枝形態形成といわれる上皮組織の特徴的な形態変化とともに成長を進める。

上皮組織の構成細胞はこの間、活発に増殖、移動を繰り返し、唾液成分を生成する粘液細胞へと分化が進むとともに生成した唾液を排出するための管腔構造の形成も進む。間葉組織はこの間特に著明な形態変化を示さず、細胞増殖も上皮組織と比べると活発ではないが、増殖因子の発現や神経伸長の場として上皮組織の成長を補完している。顎下腺組織成長における重要な増殖因子としては FGF7, FGF10, EGF, IGF-1 などが報告されているが<sup>19-21)</sup>、正常な組織成長にはこれら増殖因子の時間的空間的に厳密な発現制御が重要である。また、これら増殖因子の発現に加え、分枝形態の裂部（クレフト部）ではフィブロネクチンの局在が重要<sup>22)</sup>であるなど細胞外基質の重要性も報告されている。

一方、近年の細胞工学、組織工学の進歩からボトムアップアプローチで細胞から実験室にて生体組織を合成する機運が高まっている。これまでに Microelectromechanical system (MEMS) 技術により作製した鋳型を用いた微小細胞塊の大量合成<sup>23)</sup>や温度応答性を用いた任意形状、任意サイズの細胞凝集塊の作製<sup>24)</sup>、細胞シートの積層<sup>25)</sup>など細胞凝集塊の作製方法が報告されている。これら凝集塊は *in vitro* での生体組織合成に向けた基盤原料となるが、ここで問題は如何にしてこれら細胞凝集塊を組織にまで誘導するか、すなわち組織化を達成するかである。この制御方法として、生体擬似的環境を *in vitro* にて構築し利用することは有効ではないかと着想した。ここで生体擬似的環境とは、

生体内で生じる化学的，物理的刺激を再現した人工環境のことを意味する．近年，人工材料を用いた生体擬似的環境の構築はバイオマテリアル研究の発達とともに増加傾向にある．特に，近年メカノトランスダクション研究の発達とともにない，物理的刺激を再現する生体擬似的環境が注目を集めている．Mooney<sup>26)</sup>や Disher ら<sup>27)</sup>は物理的刺激の中でも堅さ環境に着目し，人工材料を基に構築した周囲堅さ環境が細胞に及ぼす影響について検討した．その結果，彼らは異なる堅さ環境での細胞培養により，細胞の増殖や分化といった機能に変化が生じることを世界に先駆けて示した．これらの結果は生体擬似的物理環境が細胞操作に有効であるだけでなく，組織操作においても有効であることを示唆している．

堅さ環境が顎下腺の分枝形態形成に及ぼす影響については2011年に報告され<sup>28)</sup>，柔らかい環境で顎下腺の成長は促進され，堅い環境で顎下腺の成長が抑制されること，この理由として組織を構成する細胞の変形が関与していることなどが示されている．しかし，この現象に関する詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い．従って，このメカニズムを理解することで，より詳細な組織成長制御の可能性が高まる．本研究の目的は周囲堅さ環境にともなう顎下腺成長変化のメカニズムを検討すること，および顎下腺成長の詳細な制御の可能性を示すこととした．

本研究ではこの目的を達成するため、以下の3つの研究を段階的に進めた。まず、堅さ環境が顎下腺分枝形態形成に関与するメカニズムを検討し、次いで機能性ペプチド修飾ゲルによる接着環境が顎下腺分枝形態形成に及ぼす影響を検討し、さらに機能性ペプチド修飾ビーズを用いて顎下腺分枝形態形成が制御可能かどうかを検討した。

## 研究 1 堅さ環境が顎下腺分枝形態形成に関与するメカニズムの検討

### 目的

堅さ環境が顎下腺の分枝形態形成に及ぼす影響に関する過去の研究<sup>28)</sup>において、柔らかい環境は顎下腺の成長を促進し、堅い環境は顎下腺の成長を抑制することが報告されている。しかし、この詳細なメカニズムについては不明である。これまでの細胞生物学的、分子生物学的検討から、顎下腺成長に関与する種々の因子が報告されている。例えば、線維芽細胞増殖因子 7 および 10 (FGF7, FGF10) は顎下腺形態形成促進因子として知られている<sup>19)</sup>。また、顎下腺成長には副交感神経の伸長が関与していることも知られている<sup>29)</sup>。そこで、本研究では、堅さ環境が顎下腺分枝形態形成に関与するメカニズムを調べるため、FGF7, FGF10 の発現変化、副交感神経の伸長について検討を行った。

## 材料および方法

### 1. アルギン酸ゲルシートの作製

アルギン酸ナトリウム溶液 (0.3 ~ 4wt%, Wako, Osaka, Japan) をアルミナプレートで作製した型へ注いだ後, 1.5 時間塩化カルシウム溶液 (5wt%, Nacalai-tesque, Kyoto, Japan) に浸漬した. 得られたアルギン酸ゲルシートを 70% エタノールに 24 時間以上浸漬し滅菌した後, 小片にカットした (10×10×1.5 mm). ゲルシートは滅菌超純水にて一晩浸漬しゲル内溶液を水へ置換した後, 実験に使用した. 準備したゲルの堅さはヤング率で 4 ~ 184 kPa の範囲のものである.

### 2. 顎下腺の単離と培養

胎生 12.5 日の ICR マウス (Katayama Chem., Osaka, Japan) から顎下腺を取り出した後, 異なる堅さのゲル上に静置し, 5% CO<sub>2</sub> 存在下のインキュベーター (37 °C) 内で 3 日間培養した. 培地は 1% Penicillin-Streptomycin (Nacalai-tesque) を添加した DMEM/Ham's F-12 (DMEM/F12, Wako) を使用し, 24 時間ごとに交換した.

間葉組織の除去のためには, 取り出した顎下腺を Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄し, Dispase (1.2 U/L, Roche, Basel, Switzerland) を使用しインキュベーター内で 7 分間静置した. PBS でよく洗浄した後, 顕微鏡下にてピンセット

を用い、機械的に上皮組織と間葉組織を分離した。分離した上皮組織をゲル上に静置し、5% CO<sub>2</sub>存在下のインキュベーター (37 °C) 内で3日間培養した。1% Penicillin-Streptomycin, 100 ng/ml FGF7 (R&D systems, Minneapolis, MN), 20 ng/ml EGF (R&D systems) を添加した DMEM/F-12 をこの器官培養に使用し、培地は24時間ごとに交換した。

培養した顎下腺および上皮組織は経時的に倒立顕微鏡 (CKX41, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、USB2.0CMOS カメラ (ARTCAM-130SN2, ATRAY, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

なお、本研究は岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2013033) を得て実施した。

### 3. 神経細胞培養

モデル神経細胞としてラット副腎髄質由来の褐色細胞腫であるPC12細胞 (ATCC, VA, USA) を使用した。10% Horse-serum (Life Technologies, NY, USA) , 5% Fetal Bovine Serum (Life Technologies) , 1% Penicillin-Streptomycinを含むDMEM (Wako) を注いだ75 cm<sup>2</sup> Tissue Culture Flask (Asahi Glass, Tokyo, Japan) で5~6 継代した後、細胞を回収し実験に使用した。フラスコにはI型コラーゲン (BD Biosciences, MA, USA) コーティングを施した。培養は5% CO<sub>2</sub>存在下のインキュ



ベーター内 (37 °C) で行った.

アルギン酸ゲル上で細胞培養する際, 上記と同様のコラーゲンコーティングを行った. 細胞は 5000 cells/cm<sup>2</sup> でゲル上に播種し, 50 ng/ml の NGF ( Millipore, CA, USA) を含む培地で培養した. USB2.0CMOS カメラを用いて 24 時間ごとに撮影し, イメージ分析ソフト(Image J) を用いて神経突起の長さを測定した.

#### 4. 蛍光免疫染色

培養した顎下腺は PBS で洗浄した後, 4% paraformaldehyde (PFA) で固定した. 固定後, PBS, 1% bovine serum albumin (BSA, Nacalai-tesque), 0.1% tritonX-100 (Sigma-Aldrich, MO, USA) でブロッキングし, 蛍光免疫染色を行った. 一次抗体は Lectin from Arachis hypogaea (PNA, 1:200, Sigma-Aldrich) , anti- $\beta$ -III-Tubulin (1:1000, R&D system) , anti-FGF7 (1:1000, ABBIOTEC, CA, USA) , anti-FGF10 (1:2000, Millipore) を用い, 二次抗体には Alexa Fluor568 (1:200, Life Technologies) を用いた. 染色した顎下腺は共焦点レーザー顕微鏡 (C1 システム, Nikon, Tokyo, Japan) で観察した.

#### 5. Western Blotting

マウス顎下腺における FGF7, FGF10 の発現をウエスタンブロット法により検

討した. 異なる堅さのアルギン酸ゲルシート上で, 顎下腺を 72 時間培養し, PBS で洗淨した後, 氷冷 buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1% SDS, 0.5% Na Deoxycholate, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, Protease inhibitor) 中で破砕した. 4°C で 10000 rpm 遠心分離後, その上清を取り出し, 各試料のタンパク質濃度を一定にしたものをウエスタンブロット解析試料とした. マウス顎下腺上清タンパク質を 100°C で 5 分処理した後, 150 V の定電圧で 40 分間, ゲル電気泳動によりタンパク質を分離した. その後, PVDF 膜に 200 V の定電圧で 2 時間転写した. PVDF 膜を 5% skim milk でブロッキングした後, anti-FGF7 (1:1000) もしくは anti-FGF10 (1:2000) と室温で 1 時間反応させた. 洗淨後, 二次抗体として goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を加え, 室温で 1 時間反応させた. その後, Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) を反応させ, CCD カメラタイプ画像解析装置 (ImageQuant LAS 4000 mini, GE Healthcare, UK) を用いて, 各タンパク質を検出した.

## 6.統計処理

各実験系における統計解析には one-way ANOVA および Student's *t*-test を用いて有意水準 5% で検定した.

## 結果

### 1. 堅さ環境が顎下腺上皮組織の成長に与える影響

堅さ環境が顎下腺上皮組織の成長に及ぼす影響を検討するため、上皮組織のみを堅さの異なるゲル上で培養した。いずれの堅さ環境で培養した場合も、上皮組織の分枝は見られず、成長は抑制された (図 1)。

### 2. 堅さ環境が顎下腺間葉組織の増殖因子発現に与える影響

堅さ環境が顎下腺間葉組織における増殖因子の発現に及ぼす影響を検討するため、顎下腺組織成長に重要な役割を果たす FGF7 および FGF10 の発現を調べた。蛍光免疫染色の結果から、いずれの堅さ環境において培養した顎下腺でも FGF7 および FGF10 は間葉組織に発現が認められた。ウェスタンブロッティングの結果から、184 kPa のゲルで培養した顎下腺は 4 kPa のゲルで培養した顎下腺と比較し、FGF7 および FGF10 の発現量は有意に減少していた (図 2)。

### 3. 堅さ環境が神経成長に与える影響

発生段階において副交感神経を除去すると、上皮前駆細胞の数が減少し、形態形成も抑制されることから、顎下腺組織の成長には副交感神経の伸長が重要

であると考えられている<sup>29)</sup>。そこで、異なる堅さ環境で培養した顎下腺の神経組織の分布を蛍光免疫染色で観察した。その結果、顎下腺上皮組織の分枝に沿って、神経組織は伸長していた。184 kPa のゲルで培養した顎下腺の神経組織は 4 kPa のゲルで培養した顎下腺の神経組織と比較して、神経組織の伸長は少なかった (図 3-A)。

神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞は神経成長因子 NGF を添加することで、その形態を変え神経細胞様形質を示し、神経突起を伸ばす。PC12 細胞を異なる堅さ環境で培養し、神経突起の伸長を計測したところ、184 kPa のゲルで培養した PC12 細胞の神経突起の伸長は平均 22.9  $\mu\text{m}$  であったのに対し、4 kPa のゲルで培養した場合は平均 54.1  $\mu\text{m}$  であり、柔らかいゲル上では神経突起の伸長が有意に増加することが明らかとなった (図 4)。

#### 小括

堅さ環境は、主として顎下腺間葉組織に影響していること、柔らかい環境では FGF7 や FGF10 の発現量が多く、堅い環境では発現量が抑えられること、また、柔らかい環境では神経の伸長が長く、堅い環境では伸長が短いことが明らかとなり、これら複合的な原因により堅さ環境が唾液腺組織成長制御に働くことが示された。

## 研究 2

機能性ペプチド修飾ゲルによる接着環境が

顎下腺分枝形態形成に及ぼす影響の検討

### 目的

顎下腺分枝形態形成においてフィブロネクチンは顎下腺分岐部に局在し、この発現により細胞配列の乱れが生じて、分岐が促進されることが報告されている<sup>22)</sup>。フィブロネクチンには種々の機能が知られているが、その中でも特に重要な機能として細胞接着性があり<sup>30)</sup>、この細胞接着性が顎下腺分枝形態形成にも影響を及ぼす可能性がある。フィブロネクチンを介した細胞接着はフィブロネクチン構造中の **GRGDS** (グリシン - アルギニン - グリシン - アスパラギン酸 - セリン) という 5 残基のアミノ酸配列によって達成されている<sup>31)</sup>。このペプチドは細胞のインテグリンと結合し細胞接着に働く<sup>32)</sup>。そこで本研究ではこのペプチドに着目し、ペプチドを導入したアルギン酸を用いて、ペプチド濃度の異なるゲル環境を作製し、このゲル上での顎下腺成長について検討した。

### 材料および方法

#### 1. RGD 修飾アルギン酸の作製と分析

RGD 修飾アルギン酸を作製するにあたり、G<sub>4</sub>RGDS ペプチドを使用した。

G<sub>4</sub>RGDS は GRGDS というフィブロネクチンの作用モチーフに G を 3 つ付与したものであり、これによりペプチドに可動性をもたせ、ペプチドの作用を高めることが可能となる<sup>33)</sup>。RGD 修飾アルギン酸の作製は、カルボジイミドを用いてアルギン酸のカルボキシ基とペプチドのアミノ基をアミド結合させることで G<sub>4</sub>RGDS ペプチドを固定化した。すなわち、冷却した超純水にアルギン酸ナトリウム ( $1.5 \times 10^{-5}$  mol/l) を溶解し、1-Ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) -carbodiimide hydrochloride ( $3 \times 10^{-3}$  mol/l, Watanabe Chem., Hiroshima, Japan) を添加し、10 分間攪拌した。その後、N-hydroxysulfosuccinimide ( $3 \times 10^{-3}$  mol/l, Sulfo-NHS, Thermo Fisher Scientific, IL, USA) と G<sub>4</sub>RGDS ( $1.5 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4}$  mol/l, Scrum, Tokyo, Japan) を添加し、室温にて 8 時間攪拌した。この溶液を透析膜 (Biotech CE, Spectrum, CA, USA) を用いて 4 日間透析した後に凍結乾燥し、得られた粉末をゲル作製 (184 kPa) に使用した。また、ペプチドの固定化を確認するため、合成した RGD 修飾アルギン酸ナトリウムを pH2.2 クエン酸バッファーに溶解し、アミノ酸分析装置による解析を行った。

## 2. 顎下腺の単離と培養

胎生 12.5 日の ICR マウスから顎下腺を取り出した後、RGD 修飾アルギン酸

ゲル上に静置し、5% CO<sub>2</sub> 存在下のインキュベーター (37 °C) 内で3日間培養した。培地は1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM/F12 を使用し、24 時間ごとに交換した。

培養した顎下腺組織は一定時間ごとに倒立顕微鏡で観察し、USB2.0CMOS カメラを用いて撮影した。

なお、本研究は岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2013033) を得て実施した。

### 3. 神経細胞培養

モデル神経細胞としてPC12細胞を使用した。培地は10% Horse-serum, 5% Fetal Bovine Serum, 1% Penicillin-Streptomycinを含むDMEMを使用した。培養は5% CO<sub>2</sub> 存在下のインキュベーター内 (37 °C) で行った。

RGD 修飾ゲル上で培養する場合は、I型コラーゲンによるコーティングを行わず、ゲルをそのまま使用した。細胞は 5000 cells/cm<sup>2</sup> でゲル上に播種し、50 ng/ml NGF を含む培地で培養した。USB2.0CMOS カメラを用いて 24 時間ごとに撮影し、イメージ分析ソフト (Image J) を用いて神経突起の長さを測定した。

### 4. 蛍光免疫染色

培養した顎下腺は PBS で洗淨した後、4% PFA で固定した。固定後、PBS, 1% BSA, 0.1% tritonX-100 でブロッキングし、蛍光免疫染色を行った。一次抗体は PNA (1:200) , anti- $\beta$ -III-Tubulin (1:1000) , anti-FGF7 (1:1000) , anti-FGF10 (1:2000) を用い、二次抗体には Alexa Fluor568 (1:200) を用いた。染色した顎下腺は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

## 5. Western Blotting

マウス顎下腺における FGF7, FGF10 の発現をウエスタンブロット法により検討した。RGD 修飾アルギン酸ゲルシート上で、顎下腺を 72 時間培養し、PBS にて洗淨した後、氷冷 buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1% SDS, 0.5% Na Deoxycholate, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, Protease inhibitor) 中で破砕した。4°C で 10000 rpm 遠心分離後の上清を取り出し、各試料のタンパク質濃度を一定にしたものをウエスタンブロット解析試料とした。マウス顎下腺上清タンパク質を 100°C で 5 分処理した後、150 V の定電圧で 40 分間ゲル電気泳動によりタンパク質を分離した。その後、PVDF 膜に 200 V の定電圧で 2 時間転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルクでブロッキングした後、anti-FGF7 (1:1000) もしくは anti-FGF10 (1:2000) と室温で 1 時間反応させた。洗淨後、二次抗体として goat anti-rabbit IgG-HRP を加え、室温で 1 時間反応させた。その後、Luminata Forte



Western HRP substrate を反応させ、CCD カメラタイプ画像解析装置を用いて、各タンパク質を検出した。

## 6.統計処理

各実験系における統計解析には one-way ANOVA および Student's *t*-test を用いて有意水準 5%で検定した。

## 結果

### 1. RGD が顎下腺形態形成に与える影響

アルギン酸ナトリウムへの RGD 導入濃度は仕込み RGD 量に依存して増大した (図 5)。この結果を基に導入濃度 0 ~ 0.23%の RGD 固定化ゲルを準備した。

RGD が顎下腺分枝形態形成に与える影響を検討するために、顎下腺の分枝形態形成を抑制する 184 kPa のゲルで培養したところ、顎下腺の分枝形態形成は導入濃度に依存して促進された (図 6)。この結果、RGD 導入濃度が 0.18%以上であれば、顎下腺分枝形態形成にそれ以上の変化が見られなかったため、以後の実験では 0.18%の導入濃度の RGD 修飾アルギン酸ゲルを使用した。

### 2. RGD 修飾アルギン酸ゲルが顎下腺の増殖因子発現に与える影響

蛍光免疫染色の結果、RGD 修飾アルギン酸ゲルで培養した顎下腺の間葉組織に FGF7 および FGF10 の発現が認められた。ウェスタンブロッティングにより、RGD 修飾ゲルで培養した顎下腺の FGF7 および FGF10 の発現量は、184 kPa のアルギン酸ゲルで培養した顎下腺よりも FGF7 では約 3 倍で、FGF10 では約 8 倍となり、有意に増加することが明らかとなった (図 7)。

### 3. RGD 修飾アルギン酸ゲルが神経成長に与える影響

蛍光免疫染色の結果、RGD 修飾アルギン酸ゲルで培養した顎下腺の神経組織は良好な成長を示した (図 3 - B)。また、PC12 細胞を異なる導入濃度の RGD 修飾ゲル上で培養し、神経突起の伸長を比較した。その結果、RGD 導入濃度が 0% の通常のアルギン酸ゲル上では PC12 は生着せず、神経突起の伸長は認められず、RGD 導入濃度が 0.18% の場合、神経突起の伸長は平均 26.2  $\mu\text{m}$  であり、RGD 導入濃度に依存して神経突起伸長が促進された (図 8)。

#### 小括

本研究においてアルギン酸ゲルへの RGD 導入率を増加させると顎下腺組織の分枝がより促進された。これは、RGD 修飾アルギン酸ゲル上で培養した顎下腺組織の FGF7、FGF10 の発現量が増加したこと、および RGD 導入率に依存

した神経突起の伸長によるものと考えられた。

### 研究 3

#### 機能性ペプチド修飾ビーズを用いた顎下腺分枝形態形成制御

##### 目的

研究 2 の結果，RGD ペプチドの存在は顎下腺間葉組織における FGF7，FGF10 の増殖因子発現や神経組織の伸長を促進することにより，顎下腺の分枝を増加することが示された。この結果は RGD ペプチドを用いることで顎下腺成長制御が可能であることを示唆している。そこで，本研究では RGD ペプチド修飾ゲルを種々の形態，サイズで準備し，この RGD 修飾ゲルを用いたさらなる顎下腺成長制御を試みた。

##### 材料および方法

###### 1. ゲルビーズの作製

アルギン酸ナトリウム溶液および RGD 修飾アルギン酸ナトリウム溶液 (1 ml) をシリンジポンプ (kd Scientific, MA, USA) を用いて，洗浄針 (22G テルモノンベベル針，Terumo, Japan) から 1 ml/h の速度で押し出した。実験室内に設置さ

れた圧縮空気を用いて、分断したアルギン酸溶液を塩化カルシウム溶液 (5wt%) に滴下することで反応させ、ビーズを作製した。得られたビーズは篩にて大きさを分別し (50 ~ 200  $\mu\text{m}$ ) , 70% エタノールに 24 時間以上浸漬し滅菌した後、超純水にてゲル内溶液を置換し使用した。

## 2. アルギン酸ゲルシートの作製

アルギン酸ナトリウム溶液 (4wt%) をアルミナプレートで作製した型へ注いだ後、1.5 時間塩化カルシウム溶液 (5wt%) に浸漬した。得られたアルギン酸ゲルシートを 70 %エタノールに 24 時間以上浸漬し滅菌した後、小片にカットした (10×10×1.5 mm)。ゲルシートは滅菌超純水に一晩浸漬しゲル内溶液を水へ置換した後、実験に使用した。

## 3. 顎下腺の単離と培養

胎生 12.5 日の ICR マウスから顎下腺を取り出した後、アルギン酸ゲル上に静置した。その後、顎下腺上に異なるサイズ(50 ~ 200  $\mu\text{m}$ )の RGD 修飾アルギン酸ゲルビーズ、ならびに非修飾のアルギン酸ゲルビーズを各組織あたり 1 つ静置し、5% CO<sub>2</sub> 存在下のインキュベーター (37 °C) 内で 3 日間培養した。培地は 1% Penicillin-Streptomycin を添加し、DMEM/F12 を使用し、24 時間ごとに交換

した.

培養した顎下腺は一定時間ごとに倒立顕微鏡で観察し、USB2.0CMOS カメラを用いて撮影した.

#### 4.統計処理

各実験系における統計解析には one-way ANOVA および Student's *t*-test を用いて有意水準 5% で検定した.

### 結果

シリンジポンプにより押し出した溶液を圧縮空気で分断することでアルギン酸ゲルビーズの作製に成功した (図 9 - A). この条件でビーズは、30~60  $\mu\text{m}$  のサイズをピークとする図 9 - B のような分布を示した. 184 kPa のゲルを用い顎下腺分枝形態形成を抑制した環境下で、作製したゲルビーズがどのように顎下腺形態形成に作用するかを検討した. その結果、RGD 修飾ゲルビーズを用いたものは、非修飾のアルギン酸ゲルビーズを用いたものと比較し、顎下腺の分枝を有意に促進することが示された (図 10 - A~D). 異なるサイズのビーズを使用した結果、ビーズサイズが 50  $\mu\text{m}$  で 40%、100  $\mu\text{m}$  で 60%、200  $\mu\text{m}$  で 80% の割合で分枝に成功し、ビーズの大きさに依存して分枝の起こりやすさが変化

することが示された (図 10・F). さらに確認のため, 複数のビーズ (100  $\mu\text{m}$ ) を用いて顎下腺を培養したところ, ビーズを静置した部位に分枝が誘導されることが分かった (図 10・E).

#### 小括

RGD 修飾ゲルビーズは非修飾のゲルビーズと比較して有意に分枝を促進した. またこの分枝形成においてビーズサイズが影響することが認められた. さらに, RGD 修飾ゲルビーズを応用することで, 分枝形態を制御できることが示された.

#### 考察

我が国では超高齢社会となるにつれ, 口腔乾燥症の患者は著しく増加し, その患者数は約 800 万人と推定されている. 患者は中高年に多く, 口腔乾燥の結果生じる不具合は, 患者の QOL 低下に直結し, 大きな問題となっている. 口腔乾燥症に対しては, 人工唾液やヒアルロン酸ナトリウムなどによる口腔内の保湿や唾液分泌低下に関連する薬剤の減量や変更が対症療法的に行われているのが現状である. これら以外にも, aquaporin-1 の cDNA をアデノウイルスを介して導入する遺伝子治療に向けた研究<sup>34)</sup>や, マウスから取り出した唾液腺細胞を凝集塊培養することで幹細胞を濃縮, 移植し, 唾液腺機能回復を目指す研究<sup>35)</sup>なども進められている. しかし, これらの治療方法は, 有効性がある一方で、

アデノウイルスの利用や幹細胞の未分化性などのように臨床応用の実現に向けては問題が大きい。

近年の細胞生物学，分子生物学の進歩により，細胞だけでなく成長に関与する分子や遺伝子群の研究が進み，組織を構成するパーツや組織生成を誘導する分子メカニズムの理解が進んできた．また，遺伝子工学や細胞工学に加え，材料工学や機械工学を含む一般工学の生物学への関与が進み，分子や細胞さらには生体組織を人為的に制御できるようになりつつある．すなわち，生物素材の組み合わせや機能化によりボトムアップ的アプローチで細胞や生体組織を人工的に作製できる基盤が整いつつある．このアプローチの一端として岡野らのグループは，温度応答性のポリマーを培養基材に固定化することで，培養細胞層をシート状に回収できる培養皿を開発した<sup>25)</sup>．この手法を用いることで，細胞外基質を保持した状態で細胞シートを回収でき，このシートの積層化により，三次元立体組織構築のための基盤材料が作製できる．三次元立体組織の生存には組織内部への酸素や栄養供給が必要であり，この問題を解決するために血管内皮細胞層を繊維芽細胞シート間に挟み込むことで三次元組織内へ毛細血管網を導入することに成功している<sup>36)</sup>．一方，唾液腺組織の構築に関しては，器官原基法による器官再生が進められている<sup>37)</sup>．この方法では分離した細胞を高密度で再凝集化し，上皮細胞と間葉細胞を密着させることで，唾液腺原基を人工

的に作製している。さらに、この人工原基をマウスに移植することで、宿主の導管と連続し唾液分泌を起こすことが確認されている。ここで、これらの技術をより発展させるためには、作製組織のサイズや形態を制御し、組織作製期間を短縮することが必要となる。また現段階でこれらの組織は移植により完成されているが、究極的には *in vitro* で完全な組織作製を達成することが強く望まれる。そこで本研究では、組織周囲環境の適切な構築により *in vitro* での唾液腺成長、形態の制御を目指して研究を行った。

アルギン酸ナトリウムは褐藻類から抽出した糖類である<sup>38)</sup>。FDA で食品や医用材料として承認されており、細胞、組織に対する親和性の高い材料である<sup>39)</sup>。アルギン酸水溶液はこれに二価の陽イオンを加えることでゲル化し、その堅さはアルギン酸濃度で容易に調整することができる<sup>40)</sup>。そこで、本研究ではアルギン酸ゲルを培養基材として使用することとした。また、唾液腺組織の培養および顕微鏡を用いた観察では基材の平板形状が重要となる。しかし、アルギン酸のゲル化において塩化カルシウム溶液を作用させると、ゲル化反応が早く、作用した場所からゲル化が進み、局所での変形がおこる。そこで、本研究では多孔性アルミナ板を使いアルギン酸溶液を挟み込んだ状態で塩化カルシウム溶液を導入し、均一に溶液を供給することで平板状のゲル作製を行うよう工夫した。



本研究ではまず、堅さ環境が顎下腺分枝形態形成に影響を与えるメカニズムについて検討した。堅さ環境が顎下腺の分枝形態形成に影響することはすでに報告<sup>28)</sup>されており、本研究でも柔らかい環境では成長が促進され、堅い環境では抑制されることが確認された。一方、顎下腺上皮組織はいずれの堅さにおいても分枝せず、成長は抑制された。このことから、堅さ環境は顎下腺上皮組織の成長に直接的に影響を与えるのではなく、間葉組織に及ぼした影響が間接的に上皮組織形態変化を誘導したものと考えられた。そこで、顎下腺間葉組織に注目し、間葉組織に発現し、顎下腺の成長に重要な役割を果たすことで知られる FGF7、FGF10 の発現について検討した。その結果、堅さ環境の違いによってこれらタンパク質の発現部位は変わらず間葉組織で多く発現していること、またその発現量は周囲堅さ環境により異なり、184 kPa の堅さでは有意に抑制されていた。

以前の研究でもこれら増殖因子の発現は、遺伝子レベルで堅さ環境に依存することは報告されているが<sup>41)</sup>、今回タンパク質レベルでも堅さ環境に依存していることが確認された。また、RGD 修飾ゲルにより顎下腺の分枝が促進されたこと、およびこの顎下腺において FGF7、FGF10 の発現が上昇していたことから、RGD 修飾による間葉細胞の接着状態変化が FGF7、FGF10 の発現を制御していることが示された。Hoffman ら<sup>42)</sup>は、コラーゲンの NC1 ドメインが上皮

細胞の  $\beta 1$  インテグリンに結合することでホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) , セリン/スレオニンキナーゼ (Akt)のシグナルが活性化され, そのシグナル下流で FGF ファミリーの発現を高め, 上皮細胞を増殖させ, 分枝形態形成に働くことを報告している. この報告は本研究の結果を支持するものである.

顎下腺分枝形態形成において, 神経組織の成長が分枝の誘導に関連があることがすでに報告されている<sup>29)</sup>. 蛍光免疫染色の結果から, 堅さ環境の違いにより, 顎下腺分枝形態形成と協調した顎下腺神経組織の成長, すなわち, 4 kPa で培養した顎下腺神経組織の成長は促進され, 184 kPa で培養した顎下腺神経組織の成長は抑制されることが認められた. そこで PC12 細胞を用いて, 堅さ環境が PC12 細胞の神経突起の伸長に与える影響を検討したところ, 184 kPa の堅さでは神経突起の伸長は有意に抑制されていた. また, RGD 修飾ゲル上で培養した PC12 細胞は細胞接着を高め, 神経突起を伸長したことから, フィブロネクチンの存在は顎下腺の成長に重要な神経成長の場としても重要であると考えられた. しかし, これらの増殖因子発現および神経細胞の神経突起伸長が顎下腺分枝形態形成に与えるメカニズムの詳細についてはさらなる検討が必要である.

組織再建や再生に関連した足場材料はこれまでに多くの研究や開発が進めら

れている。組織周囲環境に近似した足場材料を作製するため、生体内において足場として働く細胞外基質の研究が行われてきた。細胞外基質は細胞接着、増殖、遊走、分化やアポトーシスに関与し、最終的に組織形成に働く。この細胞外基質の持つ機能を足場材料に使用することで、足場の高機能化が期待できる。フィブロネクチンに存在する **GRGDS** 配列はその代表であり、今回使用したアルギン酸の他にもポリ乳酸<sup>44)</sup>、ハイドロキシアパタイト<sup>45)</sup>、ポリエチレングリコール<sup>46)</sup>などに化学的に修飾させることで機能的な材料の作製が報告されている。今回使用した **GRGDS** ペプチドと同様に、ラミニン由来の **IKVAV** ペプチドは神経突起伸長を促進することが知られている<sup>47)</sup>。この他、血管新生を促進する **SVVYGLR**<sup>48)</sup>や **YIGSR**<sup>49)</sup>など異なる機能のペプチドを導入することでさらなる細胞および組織の形態や機能を制御することが可能になるものと考えられる。

これまでの発生生物学的研究において、発生期の生体組織に神経誘導因子を含有したビーズを置くことで周辺神経細胞の軸索がビーズに向かって伸長することが報告されている<sup>50, 51)</sup>。また、**FGF-1** を徐放するアルギン酸ゲルビーズを使用することで、長期にわたる血管新生を誘導することが報告されている<sup>52)</sup>。

このようにビーズを用いた組織誘導の研究はすでに複数報告がある。今回、組織形態制御のために用いたアルギン酸ゲルビーズは、シリンジポンプを用いて一定速度でアルギン酸溶液を押し出し、圧縮空気にて分断、塩化カルシウム溶

液と反応させ作製した。この方法により、ビーズの直径を調整することが容易となった。今回 RGD 修飾ゲルシートを用いることで、顎下腺分枝形態形成を促進できたので、RGD 修飾ゲルビーズを用いて局所的な形態制御が可能となるのではないかと考え、ビーズを静置する位置や大きさを変えて、顎下腺の培養を行った。その結果、非修飾のアルギン酸ゲルビーズでは分枝はさほど起こらなかったが、RGD 修飾ゲルビーズを置いた部位では特異的に分枝を誘導することができた。一方、サイズが大きい程分枝が多く認められたことから、物理的な障壁が分枝誘導に部分的に関与していることも示された。さらに、RGD 修飾ゲルビーズを複数置いたところ、ビーズを置いた部位に特異的に分枝を誘導できた。

今後は、組織周囲環境を適切に調整することで唾液腺をより任意な形態に変化させ、成長制御することが課題として考えられる。例えば、基材平面の任意部位に異なる堅さ環境を構築したり、RGD を修飾したりすることで、部位特異的かつ高精細に成長の促進、抑制を制御することが可能と考えられる。また、ビーズの大きさ、形状、素材や修飾因子を変更したり、ビーズを配置する時間的、空間的調整を行ったりすることでも形態の制御が可能と考えられる。さらに、組織制御において形態だけでなく、機能の制御も重要である。より多くの知見および技術の集積により、唾液腺としての機能を十分に発揮するための組

織周囲環境の整備を試みる必要がある。

本研究では、組織周囲環境が唾液腺組織に影響を与えるメカニズムについて検討するとともに、その制御を試みた。分枝形態形成は唾液腺だけでなく、肺や膵臓、乳腺などの組織にも認められることから、同様の形態形成メカニズムや制御の可能性も期待できる。

## 結論

堅さといった物理的因子や RGD といった接着因子を付与した組織周囲環境をハイドロゲルを用い擬似的に構築した。この構築環境を用いることで唾液腺分枝形態形成のメカニズムの理解、さらには唾液腺組織成長制御の可能性が示された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科総合歯科学分野，鳥井康弘教授，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野，松本卓也教授に謹んで感謝の意を表します。また，本研究を進めるにあたり種々の御配慮，御援助，御助言を頂きました鈴木一臣岡山大学名誉教授，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野，岡山大学病院総合歯科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Kalmar, J. R., and Arnold, R. R.: Killing *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by human lactoferrin. *Infect. Immun.*, **56**, 2552-2557, 1988.
- 2) Tabak, L.A.: Structure and function of human salivary mucins. *Oral Biol. Med.*, **1**, 229-234, 1990.
- 3) Jager, D. H., Vieira, A. M., Ligtenberg, A. J., Bronkhorst, E., Huysmans, M. C., and Vissink, A.: Effect of salivary factors on the susceptibility of hydroxyapatite to early erosion. *Caries Res.*, **45**, 532-537, 2011.
- 4) Karlinseya, R. L., Mackeya, A. C., Blankena, D. D. and Schwandt, C. S.:

Remineralization of eroded enamel lesions by simulated saliva *in vitro*. *Open Dent. J.*, **6**, 170-176, 2012.

5) Robyt, J. F., and French, D.: The action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3917-3927, 1970.

6) Stookey, G. K.: The effect of saliva on dental caries. *J. Am. Dent. Assoc.*, **139**, 11S-17S, 2008.

7) Nagler, R. M., and Hershkovich, O.: Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile. *Arch. Oral Biol.*, **50**, 7-16, 2005.

8) Vissink, A., Panders, A. K., Nauta, J. M., Ligeon, E. E., Nikkels, P. G., and Kallenberg C. G.: Applicability of saliva as a diagnostic fluid in Sjögren's syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **694**, 325-329, 1993.

9) Peeters, F. P. M. L., deVries, M. W., and Vissink, A.: Risks for oral health with the use of antidepressants. *Gen. Hosp. Psychiatry*, **20**, 150-154, 1998.

10) Jellemaa, A. P., Doornaerta, P., Slotmana, B. J., Leemansb, C. R., and Langendijk, J. A.: Does radiation dose to the salivary glands and oral cavity predict patient-rate xerostomia and sticky saliva in head and neck cancer

patients treated with curative radiotherapy. *Radiother. Oncol*, **77**, 164-171, 2005.

11) Jawed, M., Shahid, S. M., Qader, S. A., and Azhar, A.: Dental caries in diabetes mellitus: role of salivary flow rate and minerals. *J. Diabetes Complications*, **25**, 183-186, 2011.

12) Najera, M. P., al-Hashimi, I., Plemons, J. M., Rivera-Hidalgo, F., Rees, T. D., Haghghat, N., Wright, J. M.: Prevalence of periodontal disease in patients with Sjögren's syndrome. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **83**, 453-457, 1997.

13) Abraham, C. M., al-Hashimi, I., and Haghghat, N.: Evaluation of the levels of oral Candida in patients with Sjögren's syndrome. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **86**, 65-68, 1998.

14) Negoro, A., Umemotoa, M., Fujii, M., Kakibuchi, M., Terada, T., Hashimoto, N., and Sakagami, M.: Taste function in Sjögren's syndrome patients with special reference to clinical tests. *Auris Nasus Larynx*, **31**, 141-147, 2004.

15) Bergdahl M.: Salivary flow and oral complaints in adult dental patients. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, **28**, 59-66, 2000.



- 16) Suh, K. I., Lee, J. Y., Chung, J. W., Kim, Y. K., and Kho, H. S.: Relationship between salivary flow rate and clinical symptoms and behaviours in patients with dry mouth. *J. Oral Rehabil.*, **34**, 739-744, 2007.
- 17) Napeñas, J. J., Brennan, M. T., and Fox, P. C.: Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology*, **97**, 76-83, 2009.
- 18) Ogawa, M., Oshima, M., Imamura, A., Sekine, Y., Ishida, K., Yamashita, K., Nakajima, K., Hirayama, M., Tachikawa, T., and Tsuji, T.: Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat. Commun.*, **4**, 2498, 2013.
- 19) Steinberg, Z., Myers, C., Heim, V. M., Lathrop, C. A., Rebusini, I. T., Stewart, J. S., Larsen, M., and Hoffman, M. P.: FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development*, **132**, 1223-1234, 2005.
- 20) Häärä, O., Koivisto, T., and Miettinen, P. J.: EGF-receptor regulates salivary gland branching morphogenesis by supporting proliferation and maturation of epithelial cells and survival of mesenchymal cells. *Differentiation*, **77**, 298-306, 2009.
- 21) Limesand, K. H., Barzen, K. A., Quissell, D. O., and Anderson, S. M.:

Synergistic suppression of apoptosis in salivary acinar cells by IGF1 and EGF. *Cell Death Differ.*, **10**, 345-355, 2003.

22) Sakai, T., Larsen, M., and Yamada, K. M.: Fibronectin requirement in branching morphogenesis., *Nature*, **423**, 876-881, 2003.

23) Iwasaki, A., Matsumoto, T., Tazaki, G., Tsuruta, H., Egusa, H., Miyajima, H., and Sohmura, T.: Mass fabrication of small cell spheroids by using micro-patterned tissueculture dish. *Adv. Eng. Mater.*, **11**, 801-804, 2009.

24) Sasaki, J., Asoh, T., Matsumoto, T., Egusa, H., Sohmura, T., Alsberg, E., Akashi, M., and Yatani, H.: Fabrication of 3D cell constructs using temperature-responsive hydrogel. *Tissue Eng. Part A*, **16**, 2467-2473, 2010.

25) Okano, T., Yamada, N., Sakai, H. and Sakurai, Y.: A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J. Biomed. Mater.* , **27**, 1243-1251, 1993.

26) Discher, D. E, Janmey, P., and Wang, Y. L.: Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, **310**, 1139-1143. 2005.

27) Boontheekul, T., Hill, E. E., Kong, H. J., Mooney, D. J.: Regulating myoblast phenotype through controlled gel stiffness and degradation. *Tissue Eng.*, **13**, 1431-1442, 2007.

- 28) Miyajima, H., Matsumoto, T., Sakai, T., Yamaguchi, S., An, S.H., Abe, M., Wakisaka, S., Lee, K. Y., Egusa, H., and Imazato, S.: Hydrogel-based biomimetic environment for *in vitro* modulation of branching morphogenesis. *Biomaterials*, **28**, 6754-6763, 2011.
- 29) Knox, S. M., Lombaert, I. M., Reed, X., Vitale-Cross, L., Gutkind, J. S., and Hoffman, M. P.: Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science*, **329**, 1645-1647, 2010.
- 30) Yamada, K. M., Yamada, S. S., and Pastan, I.: Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and contact inhibition of movement to transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1217-1221, 1976.
- 31) Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, **309**, 30-33, 1984.
- 32) Hynes, R. O.: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, **48**, 549-554. 1987.
- 33) Beer, J. H., Springer, K. T., and Collier, B. S.: Immobilized Arg-Gly-Asp

(RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood*, **79**, 117-128, 1992.

34) Baum, B. J., Zheng, C., Cotrim, A. P., McCullagh, L., Goldsmith, C. M., Brahim, J. S., Atkinson, J. C., Turner, R. J., Liu, S., Nikolov, N., and Illei, G. G.: Aquaporin-1 gene transfer to correct radiation-induced salivary hypofunction., *Handb. Exp. Pharmacol.*, **190**, 403-418, 2009.

35) Nanduri, L. S., Lombaert, I. M., van der Zwaag, M., Faber, H., Brunsting, J. F., van Os, R. P., and Coppes, R. P.: Salisphere derived c-Kit(+) cell transplantation restores tissue homeostasis in irradiated salivary gland., *Radiother Oncol*, **108**, 458-463, 2013.

36) Sasagawa, T., Shimizu, T., Yamato, M., and Okano, T.: Expression profiles of angiogenesis-related proteins in prevascular three-dimensional tissues using cell-sheet engineering. *Biomaterials*, **35**, 206-213, 2014.

37) Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M., Saitoh, M., Tomooka, Y., and Tsuji, T.: The development of a bioengineered organ germ method., *Nat. Methods*, **4**, 227-230, 2007.

38) E. C. C. Stanford: New Substance obtained from some of the Commoner Species of Marine Algae:Algin., *Chem.News*, **47**, 254-257 and 267-269, 1883.

- 39) Shapiro, L., and Cohen, S.: Novel alginate sponges for cell culture and transplantation., *Biomaterials*, **18**, 583-590, 1997.
- 40) Konga, H. J., Leea, K. Y., and Mooney, D. J.: Decoupling the dependence of rheological/mechanical properties of hydrogels from solids concentration. *Polymer*, **43**, 6239–6246, 2002.
- 41) Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., and Piccolo, S.: Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, **474**, 179-183, 2011.
- 42) Rebutini, I. T., Myers, C., Lassiter, K. S., Surmak, A., Szabova, L., Holmbeck, K., Pedchenko, V., Hudson, B. G., and Hoffman, M. P.: MT2-MMP-dependent release of collagen IV NC1 domains regulates submandibular gland branching morphogenesis. *Dev. Cell*, **17**, 482-493, 2009.
- 43) Gunn, J. W., Turner, S. D., Mann, B. K.: Adhesive and mechanical properties of hydrogels influence neurite extension. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **72**, 91-97, 2005.
- 44) Puset, X., Mauchauffé, R., Giannotti, M. I., Rodríguez-Cabello, J. C., Sanz, F., Engel, E., Mateos-Timoneda, M. A., and Planell, J. A.: Enhanced

cell-material interactions through the biofunctionalization of polymeric surfaces with engineered peptides. *Biomacromolecules*, **14**, 2690-2702, 2013.

45) Borcard, F., Staedler, D., Comas, H., Juillerat, F. K., Sturzenegger, P. N., Heuberger, R., Gonzenbach, U. T., Juillerat-Jeanneret, L., and Gerber-Lemaire, S.: Chemical functionalization of bioceramics to enhance endothelial cells adhesion for tissue engineering. *J. Med. Chem.*, **55**, 7988-7997, 2012.

46) Zhang, C., Hekmatfer, S., and Karuri, N. W.: A comparative study of polyethylene glycol hydrogels derivatized with the RGD peptide and the cell-binding domain of fibronectin. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **102**, 2013.

47) Song, Y., Li, Y., Zheng, Q., Wu, K., Guo, X., Wu, Y., Yin, M., Wu, Q., and Fu, X.: Neural progenitor cells survival and neuronal differentiation in peptide-based hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **22**, 475-487, 2011.

48) Park, K. M., Lee, Y., Son, J. Y., Bae, J. W., and Park, K. D.: *In situ* SVVYGLR peptide conjugation into injectable gelatin-poly(ethylene glycol)-tyramine hydrogel via enzyme-mediated reaction for enhancement of endothelial cell activity and neo-vascularization. *Bioconjug Chem.*, **17**, 2042-2050, 2012.

- 49) Iwamoto, Y., Nomizu, M., Yamada, Y., Ito, Y., Tanaka, K., and Sugioka, Y.: Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR). *Br. J. Cancer*, **73**, 589-595. 1996.
- 50) Tucker, K. L., Meyer, M., and Barde, Y. A.: Neurotrophins are required for nerve growth during development., *Nat. Neurosci.*, **4**, 29-37, 2001.
- 51) Knox, S. M., Lombaert, I. M., Haddock, C. L., Abrams, S. R., Cotrim, A., Wilson, A. J., and Hoffman, M.P.: Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nat. Commun.*, **4**, 1494, 2013.
- 52) Moya, M. L., Lucas, S., Francis-Sedlak, M., Liu, X., Garfinkel, M. R., Huang, J. J., Cheng, M. H., Opara, E. C., and Brey, E. M.: Sustained delivery of FGF-1 increases vascular density in comparison to bolus administration. *Microvasc. Res.*, **78**, 142-147, 2009.