

Abstract

In this study, we prepared and characterized enzyme (α -chymotrypsin or lactase)-encapsulating core-shell fibermats by electrospinning. The hydrophilic copolymer of acrylamide (AM) and diacetone acrylamide (DAAM), poly(AM/DAAM), was used as the base material to obtain the core unit of nanofibers. During electrospinning, poly(AM/DAAM) was crosslinked with the bifunctional crosslinker adipic acid dihydrazide (ADH) in the presence of enzyme molecules. The cores were wrapped with hydrophobic poly(ϵ -caprolactone) (PCL) layers as shell unit. Different from the fibermats of only poly(AM/DAAM)/ADH, the core-shell fibermat of poly(AM/DAAM)/ADH and PCL exhibited sufficient mechanical strength and stability of the stacked nanofibrous structure in a neutral-pH buffer. Furthermore, when the PCL-shell thickness was controlled to be less than 150 nm, the encapsulated enzymes exhibited an apparent activity of >70-80% for low-molecular weight substrates in an immersion buffer. These results indicate that the core-shell fibermats of poly(AM/DAAM)/ADH and PCL (or other hydrophobic polymer) could be used as effective enzyme-immobilizing platforms.

概要

本研究では、エレクトロスピンニングにより作製可能となる、酵素 (α -キモトリプシンまたはラクターゼ)を繊維内部に固定化したコアシェル不織布の作製法や特徴に関する検討を行った。コアシェル繊維のコア繊維部分には、アクリルアミド (AM) とジアセトンアクリルアミド (DAAM) からなるコポリマー poly(AM/DAAM) を主部材に用い、酵素を含むこの高分子水溶液に対して二官能性架橋剤であるアジピン酸ジヒドラジド (ADH) を添加しつつ電解紡糸をすることにより、各々のコア繊維内部にて poly(AM/DAAM) と ADH からなる架橋高分子の中に酵素分子を閉じ込めることが可能となった。一方でシェル層として、この繊維表面を疎水高分子であるポリ (ϵ -カプロラクトン) (PCL) の薄い層で覆った。その結果 PCL 層により覆わない場合と比較し、中性バッファー溶液浸漬時にも不織布の特徴となる繊維積層構造の安定性や十分な機械的強度が得られた。さらに、このシェル層の厚みを 150 nm 以下と非常に薄くすることで、低分子基質に対してであれば、コア繊維部分に固定化された酵素が、同量の酵素をバッファー溶液中に溶解した場合と比較し 70-80% の活性を発揮可能であることが分かった。以上のことから、poly(AM/DAAM)、ADH、PCL から構成されるコアシェル不織布は、効果的な酵素固定化プラットフォームとして利用可能であることが明らかとなった。

Background: Aiming at *in situ* regenerative therapy, the tailored design of cytokine-releasing scaffolds is still one of the crucial issues to be studied. A core-shell fibermat is one of the attractive platforms for this purpose. But very few detail the importance of choosing the right material for the shell units that can endow efficient release properties.

Objective: In this study, we characterized the effectiveness of core-shell fibermats that possess cross-linked gelatin (CLG) as the shell layer of constituent nanofibers, as a protein-releasing cell-incubation scaffold.

Methods: For the core nanofibers in the core-shell fibermats, we utilized a crosslinked copolymer of poly(acrylamide)-*co*-poly(diacetone acrylamide) (poly(AM/DAAM)) and adipic acid dihydrazide (ADH), poly(AM/DAAM)/ADH. By coaxial electrospinning and the subsequent crosslinking of the gelatin layer, we successfully constructed core-shell fibermats consisting of double-layered nanofibers of poly(AM/DAAM)/ADH and CLG. Using fluorescein isothiocyanate-labeled lysozyme (FITC-Lys) as a dummy guest protein, we characterized the release behavior of the core-shell fibermats containing a CLG layer. Upon loading basic fibroblast growth factor (bFGF) as cargo in our fibermats, we also characterized impacts of the released bFGF on proliferation of the incubated cells thereon.

Results: Although the single-layered poly(AM/DAAM)/ADH nanofiber fibermats did not adhere to the mammalian cells, the core-shell fibermat with the CLG shell layer exhibited good adherence and subsequent proliferation. A sustained release of the preloaded FITC-Lys over 24 days without any burst release was observed, and the cumulative amount of released protein reached over 65% after 24 days. Upon loading bFGF in our fibermats, we succeeded in promoting cell proliferation, and highlighting its potential for use in therapeutic applications.

Conclusion: We successfully confirmed that core-shell fibermats with a CLG shell layer around the constituent nanofibers, were effective as protein-releasing cell-incubation scaffolds.

背景: 再生医療による *in situ* での治療法発展のためには、サイトカインの徐放を可能とする材料開発は依然として研究されるべき重要な課題の1つであり、この目的においてコアシェル不織布は魅力的なプラットフォームの1つである。しかしコアシェル不織布に予め固定化しておいたサイトカインの効果的な徐放において、シェル部分への適切な材料選択が重要であることの議論は非常に限られていた。

目的: 本研究では、タンパク質徐放を可能とする細胞培養材料として架橋ゼラチン (CLG) をシェル部分の部材として用いたコアシェル不織布の有効性を評価する。

方法: コアシェル繊維のコア繊維部分には、poly(AM/DAAM)とアジピン酸ジヒドラジド (ADH) から得られる架橋高分子 poly(AM/DAAM)/ADH を用いた。同軸エレクトロスピンニングとゼラチン層の架橋を経て、poly(AM/DAAM)/ADH からなるコア繊維を CLG 層が覆ったコアシェル繊維からなるコアシェル不織布の構築に成功した。フルオレセインイソチオシアネート標識リゾチーム (FITC-Lys) を擬似タンパク質としてコア繊維部分に予め担持し、徐放性の評価を行った。さらに塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)をコア繊維部分に予め担持したコアシェル不織布も作製し、この不織布上で培養した細胞の増殖性における、徐放された bFGF の効果を評価した。

結果: CLG 層を持たない単層の poly(AM/DAAM)/ADH のみの繊維からなる不織布では、哺乳類細胞に対する接着性を持たなかったが、CLG 層を持ったコアシェル不織布では良好な細胞接着性とその後の増殖がみられた。予め担持された FITC-Lys は、バーストリリースを起こすことなく 24 日に渡る一定の徐放が見られ、24 日後の累積放出量は、予め担持した FITC-Lys の 65% に及んだ。FITC-Lys の代わりに bFGF を担持することで、細胞増殖の誘導が可能となることが見られ、これは治療用途での使用を期待させるものであった。

結論：CLG のシェル層を持つコアシェル繊維を持つコアシェル不織布が、タンパク質の徐放を可能とする細胞培養足場材として効果的であることが明らかとなった。