

学位論文題名

鮭皮由来コラーゲンを利用した再生医療用材料の
開発に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、細胞を利用することによって生体組織を再生あるいは臓器機能の代替を行う再生医療の研究が盛んに行われている。正常な組織を再生させるためには、細胞が増殖・分化しやすい仮の足場 (Scaffold) を設定することが重要である。この足場材料として好適に利用・研究されてきたのがコラーゲンである。コラーゲン原料としてこれまで主に家畜由来の牛皮が使用されてきたが、牛海綿状脳症 (BSE) 問題により牛由来原料の使用が制限され、他種コラーゲンへの切替が求められるようになった。そこで本研究は、国内の主要な水産物である鮭に着目し、その水産廃棄物の鮭皮から得られる鮭皮コラーゲンをを用いた再生医療用材料の開発を試みた。再生医療用材料としては特に人工歯根材料、及び細胞シート工学用材料への応用を目的とした。

第1章は序論であり、本研究の背景および目的を明らかにした。

第2章では、鮭皮由来アテロコラーゲン (SAC) からスポンジ状の Scaffold を作成し人工歯根材料に応用する検討を行った。人工歯根材料は多孔性 Scaffold と増殖因子、及び細胞から構成されており、多孔性 Scaffold の中で細胞が三次元的に増殖して組織を再生させる働きがある。変性温度が 18.6°C の SAC から熱脱水架橋 (DHT) を使用して熱安定性の高い多孔性 SAC スポンジを作成できることが報告されているが、このスポンジは膨潤後に収縮するという問題を有していた。この収縮は三次元増殖の足場としての機能に影響することが予想される。そこで、収縮しない安定な SAC スポンジを作成するために化学的架橋を検討した。化学的架橋にはグルタルアルデヒド (GA)、エポキシ化合物 (EGDE) 及び水溶性カルボジイミド (EDC) を使用した。細胞培養には歯周組織再生で重要な歯根膜組織由来の細胞 (HPDL) を使用した。その結果、GA 架橋は高い熱安定性を付与できるが、GA が毒性を示し細胞増殖性は低かった。EGDE 架橋は十分な熱安定性を付与できず、細胞増殖性は低かった。EDC 架橋は高い熱安定性を付与でき、かつ HPDL は良好に増殖し分化機能 (アルカリフォスファターゼ [ALP] 発現) を維持していた。DHT 架橋はスポンジの収縮を招き、細胞増殖性は低かった。以上より、高い熱安定性、構造安定性、及び細胞親和性を与える架橋処理は EDC 架橋であることがわかった。In vivo 試験で良好な歯周組織再生を得ることができれば、EDC 架橋 SAC スポンジは人工歯根材料に応用可能であると期待できる。

第3章では、SAC からコラーゲン線維ゲルを作成し細胞培養に応用する検討を行った。コラーゲンの線維化途上に EDC 架橋を導入することによって 47°C でも安定な SAC 線維ゲル (SAC-EDC ゲル) を作成できることが報告されている。本章では架橋条件の最適化を行い

SAC-EDC ゲルの熱安定性の向上を検討した。その結果、コラーゲン濃度が 0.2%、EDC 濃度が 60mM、NaCl濃度が 42mM、リン酸ナトリウム濃度が 18mM のときに、変性温度が 55°C の SAC-EDC ゲルを作成できることがわかった。また、この SAC-EDC ゲルは市販の豚皮アテロコラーゲン線維ゲル (PAC ゲル) と比較して機械強度が約 5 倍高いことがわかった。次に、SAC-EDC ゲル上で、HPDL、ヒト骨芽細胞 (HOST)、ヒト線維芽細胞 (HF) の培養を行った。対照として PAC ゲルを用いた。その結果、いずれの細胞においても、SAC-EDC ゲルで培養した細胞の増殖性は PAC ゲルの場合より約 1.3~1.5 倍高いことがわかった。次に、この細胞増殖を促進する理由を考察するために、PAC ゲルを使用して架橋前後の細胞増殖性を比較した。その結果、EDC 架橋した PAC 線維ゲル (PAC-EDC ゲル) 上で培養した HPDL は、未架橋の PAC ゲル上よりも増殖性が高いことがわかった。但し、PAC-EDC ゲル上の HPDL 増殖性は SAC-EDC ゲル上より低かった。PAC-EDC ゲルと PAC ゲルの間に機械強度や線維構造の差はなかったことから、架橋処理によるコラーゲンの化学的変化が細胞増殖を促進していることが示唆された。従って、SAC-EDC ゲル上での細胞増殖の促進は EDC による化学的架橋が寄与していることが示唆された。以上より SAC-EDC ゲルは PAC ゲルと比較して細胞増殖性が高く、機械強度が高いという特徴を有していることが示された。

第 4 章では、SAC-EDC ゲルを利用した、細胞シート工学用の細胞シート調製方法と細胞シート重層化方法を検討した。細胞シート工学は培養担体から細胞をシート状に剥離し、それを重層化することによって体外で人工的に組織化を試みる新しい組織工学である。本章では、SAC-EDC ゲルがコラゲナーゼによって溶解消失することを利用して、SAC-EDC ゲル上で培養した細胞をシート状に剥離する検討を行った。はじめに HPDL の増殖性と分化機能 (ALP 発現) に影響を与えないコラゲナーゼ消化条件を検討した。その結果、50U/mg の濃度で 2 時間処理した HPDL はコラゲナーゼによる影響を受けていないことがわかった。HPDL を 10 日間培養した SAC-EDC ゲルを上述の条件でコラゲナーゼ消化した結果、培養した HPDL がシート状に剥離することがわかった。この HPDL シートは免疫染色の結果、細胞骨格 (アクチン)、基底膜成分 (フィブロネクチン) を維持していることが示された。一方、PAC ゲルは細胞増殖性が低いために同じ方法で細胞シートを調製することはできなかった。次に細胞シートの重層方法を検討した。歯根膜組織は歯根と歯槽骨をつなぐように水平に配向して咀嚼の力を緩衝している。この生体組織を模倣し、HPDL 細胞シートを重層化することによって歯根膜様組織を作成する検討を行った。HPDL を培養した SAC-EDC ゲルを別の培養した HPDL 上に乗せてコラゲナーゼ消化を行った結果、HPDL シートの重層化を行うことができた。機械強度の低い PAC ゲルではこの方法を適用できなかった。以上より、SAC-EDC ゲルを用いて細胞シートの調製、および細胞シートの重層化が可能であり、細胞シート工学に応用可能であることが示唆された。

本研究で得られた成果は以下の通りである。

- ・ 高い熱安定性、構造安定性、及び細胞親和性を与える架橋処理は EDC 架橋であった。
- ・ EDC 架橋コラーゲン線維ゲルの作成条件を最適化した結果、変性温度が 55°C の SAC 線維ゲルを得ることができた。
- ・ SAC 線維ゲルは PAC ゲルに比べて細胞増殖性が高く、さらに機械強度が高いという特徴を有していた。
- ・ SAC 線維ゲルを利用して細胞シートの調製と重層化を行うことが可能であった。

本研究の成果は、これまで再生医療用材料に応用できなかった変性温度の低い魚類コラーゲンから、人工歯根材料や細胞シート工学に応用可能な再生医療用材料を開発できることを示し、水産廃棄物の有効利用に寄与できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 棟 方 正 信
副 査 教 授 高 木 睦
副 査 教 授 田 口 精 一
副 査 助 教 授 田 島 健 次

学 位 論 文 題 名

鮭皮由来コラーゲンを利用した再生医療用材料の 開発に関する研究

近年、細胞を利用することによって生体組織を再生あるいは臓器機能の代替を行う再生医療の研究が盛んに行われている。正常な組織を再生させるためには細胞が増殖・分化しやすい仮の足場 (Scaffold) が必要であり、その足場材料として生体由来のコラーゲンが好適に利用されている。コラーゲン原料としては主に家畜由来の牛皮が使用されてきたが牛海綿状脳症 (BSE) 問題により牛由来原料の使用が制限されるようになった。そこで著者はこれまでヒトへの伝染病伝播の例がない鮭に着目し、水産廃棄物の鮭皮から得た鮭皮コラーゲンを用いて再生医療用材料の開発を試みた。鮭を含む魚類由来コラーゲンは変性温度が低くヒトの体温では溶解するので架橋処理によるコラーゲンの安定化方法を検討した。また、再生医療用材料として人工歯根材料及び細胞シート工学材料への応用を検討した。

人工歯根材料は多孔性 Scaffold と成長因子及び細胞から構成された生体埋め込み型の歯周病治療材料である。歯周病治療では増殖能が低く数の少ない歯根膜細胞の再生が重要視されている。著者は鮭皮由来アテロコラーゲンを用いて多孔性 Scaffold を作成し歯根膜細胞の足場となるか検討を行った。架橋処理は化学剤を使用した方法と物理的な熱脱水架橋 (DHT) を行った。化学剤はグルタルアルデヒド (GA)、エポキシ化合物 (EGDE) 及び水溶性カルボジイミド (EDC) を使用した。細胞培養には歯根膜組織由来の歯根膜細胞 (HPDL) を使用した。その結果、GA 架橋は高い熱安定性を付与できるが GA が毒性を示し細胞増殖性は低かった。EGDE 架橋は十分な熱安定性を付与できず細胞増殖性は低かった。EDC 架橋は高い熱安定性を付与できかつ HPDL は良好に増殖し分化機能 (アルカリフォスファターゼ [ALP] 発現) を維持して

いた。DHT 架橋はスポンジの収縮を招き細胞増殖性は低かった。以上より、高い熱安定性、構造安定性、及び細胞親和性を与える架橋処理は EDC 架橋であり、その SAC 架橋物は HPDL の足場として働くことが示された。

次に著者は SAC から細胞培養が可能なコラーゲン線維ゲルの作成を行った。コラーゲンの線維化途上に EDC 架橋を導入することによって 47°C でも安定な SAC 線維ゲル (SAC-EDC ゲル) を作成できることが報告されている。著者は架橋条件の最適化を行い SAC-EDC ゲルの熱安定性の向上を検討した。その結果、EDC 濃度が 60mM のときに変性温度が 55°C で最大となることがわかった。この条件の SAC-EDC ゲルは市販の豚皮アテロコラーゲン線維ゲル (PAC ゲル) と比較して細く均一な線維構造を持っていた。次に、SAC-EDC ゲル上で HPDL、ヒト骨芽細胞 (HOST)、ヒト線維芽細胞 (HF) の培養を行った結果、いずれの細胞でも SAC-EDC ゲルで培養した細胞の増殖性は PAC ゲルの場合より約 1.3~1.5 倍高かった。次に、この細胞増殖を促進した理由を考察するために、PAC ゲルを使用して架橋前後の細胞増殖性を比較した。その結果、EDC 架橋 PAC ゲル (PAC-EDC ゲル) 上で培養した HPDL は未架橋 PAC ゲル上よりも増殖性が高く、架橋処理は細胞増殖を促進することが示された。従って、SAC-EDC ゲル上での細胞増殖の促進は EDC による化学的架橋が寄与していることが示唆された。以上より SAC-EDC ゲルは従来の PAC ゲルと同様に細胞培養に応用可能であることが示された。

次に著者は SAC-EDC ゲルを利用した細胞シートの調製方法と細胞シートの重層化方法を検討した。細胞シート工学は培養担体から細胞をシート状に剥離しそれを重層化することによって体外で人工的に組織化を試みる新しい組織工学である。著者は SAC-EDC ゲルがコラゲナーゼによって溶解消失することを利用して、SAC-EDC ゲル上で培養した HPDL をシート状に剥離し重層化する検討を行った。はじめに SAC-EDC ゲルの消化条件を検討した。その結果、完全消化する条件は 50U/mg、2 時間であった。また、このコラゲナーゼ消化条件は HPDL の増殖性と ALP 発現にほとんど影響がないことを確認した。次に HPDL を 10 日間培養した SAC-EDC ゲルを上述の条件でコラゲナーゼ消化した結果、培養した HPDL がシート状に剥離した。この HPDL シートは免疫染色の結果、細胞骨格 (アクチン)、基底膜成分 (フィブロネクチン) を維持していることがわかった。次に細胞シートの重層化方法を検討した。HPDL を培養した SAC-EDC ゲルを別の培養した HPDL 上に乗せてコラゲナーゼ消化を行った結果、HPDL シートの重層化を行うことができた。以上より、SAC-EDC ゲルとコラゲナーゼを用いて HPDL シートの調製および重層化を行うことが可能であった。

これを要するに、著者は変性温度の低い鮭皮コラーゲンの再生医療用材料としての開発に新知見を得たものであり、再生医療工学および組織工学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。