

学 位 論 文 題 名

Peptide-conjugated Chitosan Membranes As Extracellular Matrix Mimetics ; New Biomaterials For Tissue Engineering

(ペプチド-キトサン膜を用いた人工基底膜の創製に関する研究)

学位論文内容の要旨

エネルギー・資源の枯渇、地球環境の汚染に関する問題が広く論じられる中、我が国では2000年に「循環型社会基本法」が施行された。環境への負担を減らし次世代に持続可能な社会を実現するためには、単に廃棄物対応の循環ではなく、自然やエネルギーなどすべての資源が効率的に循環できる循環型社会の構築が必須である。リデュース・リユース・リサイクルが機能することによって、経済社会の中での資源の循環を実現することができ、それと同時に自然の循環を尊重することができると考えられる。

キチン、キトサンは、カニ、エビなどの甲殻類の殻をはじめとして昆虫の表皮、軟体動物の骨格や殻、キノコ、病原菌など細菌細胞壁に広く分布している。地球上で毎年推定一千億トンも生合成され、同時に生分解されている。この生合成と生分解の循環が地球の環境と生態系を保全していた。長年の間、食された後に残される大量のカニ殻は廃棄処分されているのが現状で、循環のバランスが保てなくなっている。そこで水産加工場から廃棄されるカニ殻キチンを原料にキトサンの工業生産が始まった。キトサンは、反応可能な一級アミノ基を有するため、化学修飾が比較的容易であり、様々な機能を付加することが可能である。これまでに食品・工業・農業分野、医用材料分野、成型品分野などで数々の応用が進展した。しかし未だにそのほとんどが生ゴミ・産業廃棄物として処理されている状況である。

本申請者は天然産業廃棄物キトサンを有効利用することに強い関心を抱き、有効利用の手段として医用材料へ応用することを目的として研究を行ってきた。キトサンは、免疫原性が低く、生分解性であるので、これらの特性を保ったまま組織と強い親和性を持つ柔軟な膜や線維として形成し医用材料として実用化されている。またキトサンは、コラーゲンやフィブリンなどの脊椎動物由来の生体高分子と比べて、人畜共通感染症等の危険性ははるかに低く、医用材料などの用途で人に用いるのに適していると考えられる。近年、医用材料の分野では基底膜などの細胞外マトリックスが生体内で担う役割の重要性が認識されつつあり、その機能を模倣した医用材料の研究が報告されはじめた。特に、発生段階や組織再生時における基底膜構成タンパク・ラミニンの機能に注目が集まっている。本申請者は、キトサンに化学的に生物活性（ラミニン由来活性ペプチド）を固定化することで、生体内の組織の再生、維持に重要な役割を果たす基底膜の活性を模倣した人工基底膜の創製を試みた。

第一章では、ペプチド-キトサン膜を開発し、膜の活性を検討した。キトサンに二価官能性試薬のN-(マレイミドベンゾイルオキシ)-スクシイミド(MBS)を導入し MB-キトサンを調製した。キトサンに固定化させる生物活性として基底膜の主要構成成分であるラミニンの細胞接着部位（生物活性ペプチド）の中で、細胞接着活性が強い部位、インテグリンやシンデカンといった細胞膜上の受容体（レセプター）が同定されてい

る部位を用いた。ペプチドのN末端にシステインを付加し、システインのSH基を介してキトサン膜のMB基と共有結合させペプチド-キトサン膜を調製する方法を開発した。この方法によって得られたペプチド-キトサン膜に由来の異なる様々な株化細胞を加えて無血清状態で2時間培養し細胞接着活性を測定すると、活性ペプチドを固定化したキトサン膜は明瞭な細胞接着活性を獲得することがわかった。接着する細胞数は、キトサン膜に固定化したペプチド量に依存すること、また、培養皿にペプチドを直接コートする方法よりも、キトサン膜に化学的に結合させる方が、用いたペプチドの質量あたりの接着する細胞数が多いことがわかった。これはキトサン膜が細胞に対して物理的に良好な足場として働いていることや、膜に結合されたペプチドが活性型コンフォメーションをとりやすいためと考えられる。さらに、固定化するペプチドによって細胞は異なる形態を示し、このような細胞形態の違いは結合するレセプターの違いによることを明らかにした。また、ペプチド-キトサン膜上で副腎髄質由来の神経系細胞はペプチドの種類に依存して形態的に異なる神経突起伸長活性を示すことを明らかにした。この結果から、ペプチド-キトサン膜は直接細胞に働きかけて接着する機能を持ち、細胞の分化を促進することができる可能性を示すことができた。

第2章では、ペプチド-キトサン膜を用いて、より生体に近い環境の模倣を試みた。実際の生体内の細胞には、様々なレセプターを介した情報が基底膜から同時に伝達されている。代表的なレセプターのインテグリンファミリーに注目し、インテグリン特異的に作用するペプチドキトサン膜の活性評価を行った。ラミニン、コラーゲン、フィブリノーゲンといった基底膜などの細胞外マトリックス構成タンパク質由来のインテグリン接着部位（ペプチド）を約10種類合成し、開発したペプチド-キトサン膜に利用した。これらのペプチド-キトサン膜の生物活性を調べたところ、4種類のペプチドでインテグリン特異的な細胞接着を確認することができた。さらにこれらは異なるインテグリンを介して細胞と作用していることを明らかにした。また、作用するインテグリンにより、神経系細胞の神経突起伸長促進に違いがあることも明らかにした。この結果から、キトサン膜に固定化させるペプチドを組み合わせることにより、標的細胞あるいは組織に適した環境を提供できる可能性を示すことができた。

第3章では、実際に動物を用いた *in vivo* 実験への応用のためのキトサン膜の調製を試みた。近年、受傷部位に上皮系の細胞を添加することで、細胞自身のもつ効果により創傷治癒を促すという細胞移植法が注目されてきている。この方法では、加える細胞が組織に効率良く接着することが必須で、細胞が接着するための足場となり細胞を生物学的に制御できる基質が重要視されている。そこで強い細胞接着活性を有するペプチド-キトサン膜の受傷部への細胞のキャリアとしての応用を図った。これまで用いていたペプチド-キトサン膜は、細胞への活性を検討するには有効な手段であったが、生体内に用いる際には、MB基の毒性が懸念された。そこで、クロロアセチル基を導入したクロロアセチルキトサンを新規に開発し、その生物活性を確かめた。キトサンは無水クロロ酢酸と反応させることによりクロロアセチルキトサンを合成した。また、ピンセットなどで容易に取り扱える膜に加工することに成功した。その膜上にペプチドを固定化させて細胞接着活性を確かめたところ、MB-キトサンと同等の強い細胞接着活性を持つことを明らかにした。

これらの結果から、ペプチド-キトサン膜は新規の「足場」として有効だけでなく、目的細胞の接着や分化をコントロールできる人工基底膜として応用可能であることが示された。

このような付加価値を有したペプチド-キトサン膜は 地球環境に優しい医用材料として認識されるとともに、実際の医療へ大きな寄与をもたらすと考えられる。また本研究とその成果は地球環境科学ならびに資源化科学研究に大きく寄与するものであると確信する。

学位論文審査の要旨

主 査	助 教 授	春 木 雅 寛
副 査	教 授	坂 入 信 夫
副 査	教 授	荒 木 義 雄
副 査	名誉教授	西 則 雄
副 査	教 授	野 水 基 義 (東京薬科大学)

学 位 論 文 題 名

Peptide-conjugated Chitosan Membranes As Extracellular Matrix Mimetics ; New Biomaterials For Tissue Engineering

(ペプチド-キトサン膜を用いた人工基底膜の創製に関する研究)

近年、天然資源の循環型社会への組み込みが模索されている中で、種々の廃棄物の有効利用は地球環境にとって今後ますます重要になるものと考えられる。カニ、エビなどの甲殻類の殻の主要構成成分であるキトサン（脱アセチル化キチン）は、水産加工場で大量に廃棄されているが、反応可能な一級アミノ基を有するため様々な機能を付加することが可能な高分子多糖である。現在では廃棄されたカニ殻の一部を原料にしたキトサンが工業生産され、食品・工業・農業・医用材料分野などで利用されている。

キトサンは、生分解性が高く、脊椎動物由来の生体高分子と比べて、人畜共通感染症等の危険性ははるかに低いなどの医用材料に適した特性を有する素材である。一方、医用材料の分野では基底膜などの細胞外マトリックスが生体内で担う役割の重要性が認識されつつあり、その機能を模倣した医用材料の研究が報告されはじめた。特に、組織の発生・再生時における基底膜構成タンパク・ラミニンの機能に注目が集まっている。

本申請者はキトサンをさらなる付加価値を付けた医用材料として開発することを目的として研究を行った。すなわち、キトサンに化学的に生物活性（ラミニン由来活性ペプチド）を固定化することにより、生体内の組織の再生、維持に重要な役割を果たす基底膜の活性を模倣した人工基底膜の創製を試みた。

第一章では、ペプチド-キトサン膜を開発し、膜の活性を検討した。キトサンに二価官能性試薬の N-(マレイミドベンゾイルオキシ)-スクシイミド(MBS)を導入した MB-キトサンを調製し、ラミニンの細胞接着部位（生物活性ペプチド）を化学的に固定化させペプチド-キトサン膜を作成した。これに細胞を加えて無血清条件下で培養すると明瞭な細胞接着活性を獲得することがわかった。接着する細胞数は、キトサン膜に固定化したペプチド量に依存した。また、ペプチドによって異なる細胞形態は、結合するレセプターの違いによることを明らかにした。これらの結果から、ペプチド-キトサン膜が細胞膜上の特定のレセプターを介して直接細胞に作用することを示した。

第二章では、ペプチド-キトサン膜を用いて、より生体に近い環境の模倣を試みた。ペプチドが結合する細胞膜上の代表的なレセプターのインテグリンに特異的に作用するペプチド-キトサン膜の活性評価を行った。細胞外マトリックス構成タンパク質由来のインテグリン接着部位（ペプチド）を約10種類合成し、このうち4種類のペプチド-キトサン膜でインテグリン特異的な細胞接着活性を確認した。また、作用するインテグリンにより、神経系細胞の神経突起伸長を促進したことから、分化の誘導に違いがあることも明らかにした。ペプチドが介するレセプターによって細胞への作用が大きく異なったことから、目的細胞あるいは組織に適した活性を有するペプチドをキトサン膜に固定化することにより、ペプチド-キトサン膜が様々な細胞の活性を誘導する、生体内に近い環境を提供できる可能性を示した。

第三章では、動物実験を行いペプチド-キトサン膜の実際の評価を行った。動物実験用に大量に調整可能なクロロアセチルキトサンを開発し、強い細胞接着活性を有するAG73ペプチドを固定化した。膜をピンセットなどで容易に取り扱えるように加工し、動物の受傷部に被覆して数日後、創傷治癒促進作用を確認した。また、AG73-キトサン膜上に表皮細胞を接着させた細胞組み込み型AG73-キトサン膜を調整し、これをヌードマウスに移植して数日後、マウス組織中に移植した表皮細胞を確認した。これらの結果から、AG73-キトサン膜は創傷治癒を促進し、また細胞移植時のキャリアとしての可能性も示した。

本申請者は、以上のように、開発したペプチド-キトサン膜を用いて細胞接着活性や細胞分化の機構を明らかにし、生体に近い環境の模倣を試みた。さらに動物実験により創傷治癒の促進効果を確認した。これらの結果から、ペプチド-キトサン膜は目的細胞あるいは組織に適した環境を提供し、細胞をコントロールできる人工基底膜として応用可能であることを示した。

本研究とその成果は、資源化素材であるキトサン膜に細胞への直接的な作用性を付加させることに成功し、応用範囲を広げた点で、医用材料研究に貢献するだけでなく、資源化科学研究に新しい方向性を示すとともに地球環境科学ならびに生態環境科学研究に大きく寄与するものであると確信する。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。