

## 塩基性線維芽細胞増殖因子-キトサン複合体 (bFGF-Chitosan)

## からの bFGF の徐放と活性維持に関する研究

## 学位論文内容の要旨

成長因子は細胞増殖と細胞分化を誘導し組織再生に大きく関与しており、シグナル伝達の中でも最も重要な生体分子であると広く認められている。しかし、成長因子は変性しやすく、そのため、室温や生体内 (37 ° C) では、短い期間でしか活性を保つことができない。この問題点に対する解決策の一つは、「細胞」や「Scaffold」に大量かつ頻回に成長因子を直接投与することである。しかし残念なことに、この方法では感染や再生組織の腫瘍形成を惹起する可能性がある。それ以外の解決策としては、生体活性物質を徐放させるドラッグデリバリーシステムの応用がある。この技術により適当な量を適切なタイミングで長い期間、目的とする物質を徐放させることが可能になる。この技術を応用すれば、成長因子を長期間徐放させることが可能になり、良好な組織再生が得られると考えられる。

塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast Growth Factor 以下 bFGF) は細胞増殖因子の 1 つであり、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの様々な細胞に対し細胞増殖を促進させる成長因子として報告されている。実際に、bFGF の臨床応用は創傷治癒の分野で既に実行されており、優れた結果が報告されている。bFGF は細胞外マトリックスに含まれるヘパラン硫酸またはヘパリンなどの多糖類と複合体を形成し内部に貯蔵されること、細胞外マトリックスとの複合体が生体内における変性や酵素分解から bFGF を保護している可能性などが報告されている。したがって、多糖類のうちの 1 つであるキトサンは、生体内と同じ温度下でも同様に生体活性物質を貯蔵できる可能性があると考えられると著者らは考えた。

キトサンに生体活性物質を導入する手法には、共有結合、ポリイオンコンプレックスを用いる手法、埋入・混入による手法が考えられる。共有結合は反応に専門知識が不可欠であるが、安定性が高く、また徐放化等の制御が可能であることより、大いに発展性が期待されるため、この共有結合を用い、新規の bFGF・キトサン化合物 (以下 bFGF-Chitosan) を開発した。共有結合で合成した bFGF-Chitosan は、生体内と同じ 37 ° C という増殖因子にとっては過酷な環境下において、ポリイオン結合や分子間結合よりも安定性があると考えられる。本研究では、bFGF は SH-Chitosan と共有結合で結合しているためより長期の徐放が得られると仮説を立てた。

本研究では、第一に SH-Chitosan と bFGF を結合させる方法を確立すること、次に成長因子が変性しやすい環境下で 14 日後に bFGF-Chitosan 複合体から徐放された bFGF の量を測定し、bFGF が活性を保っていることを証明することを目的とした。

SH-Chitosan の作り方の詳細は、過去の論文を参考にした。要約すると、4 g のキトサン粉末に 1% の酢酸 200 ml を加えて、2% (w/v) のキトサン溶液 (pH 2.68) を作製する。キトサン溶液 (3.5

g) に 50 mM の sodium phosphate buffer solution (44 ml, pH 8.0) と 2 mM の EDTA および 150 mM の NaCl に溶解し、最後に 112 mg の 2-Iminothiolane を加え、100%窒素下で室温で 3 時間攪拌させて合成する。キトサンと反応しなかった 2-Iminothiolane は膜透析にて取り除き、チオール基が修飾されたキトサン (SH-Chitosan) を作成した。次に SH-Chitosan に bFGF を導入し、bFGF-Chitosan を作成した。実際の化学反応は以下のようなものである。まず、3.0 ml の 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer (pH 8.0) に 1.0 mg の SH-Chitosan を溶かした溶液を作製し、bFGF (1.0 mg) を添加した。bFGF は熱で容易に変性してしまうため、この混合溶液を 7 日間 4 ° C の低温でゆっくりと反応させた。つぎに、SH-Chitosan とジスルフィド結合しなかった bFGF を取り除くため、7 日間 4 ° C で透析膜 (分子量 100,000) を用いて透析した。SH-Chitosan に対する bFGF が結合した割合を決定するため、アミノ酸分析を行った。凍結乾燥した bFGF-Chitosan を高真空脱気下、6 N HCl で加水分解 (110°C、24 h) し、遊離アミノ酸とグルコサミンをアミノ酸分析器を用いて測定した。

凍結乾燥した bFGF-Chitosan (1.0 mg) を 1 ml のキチナーゼ (2 µg/ml) とキトサナーゼ (4 µg/ml) の混合溶液に加え、37 ° C にて溶解した。1、4、7、10、14 日目に放出された bFGF を含有する上清を新しい溶液と交換した。採取した bFGF を含有した上清はサンプルとして採取し、-80 ° C で冷凍保存した bFGF-Chitosan から放出した bFGF の量は ELISA を用いて評価した。また、14 日目に放出された bFGF の活性を調べるため、細胞増殖能を評価した。細胞増殖アッセイはヒト線維芽細胞を播種し、サンプル溶液を含んだ培養液で 2 日間培養した。細胞数は WST-8 法にて吸光度を測定することにより計測した。コントロールは bFGF が入っていない群と 14 日間 37 ° C で暴露させた bFGF を入れた群を用いた。

アミノ酸分析の結果では bFGF 自体から分解されたアミノ酸とキトサンから分解された D-グルコサミンが bFGF-Chitosan に含まれることが判明した。SH-Chitosan 分子に対する bFGF 分子の割合は 1 対 160 であった。bFGF は経時的に量は減少するものの、14 日間放出されることを確認した。bFGF は 24 時間で 39.7 µg の bFGF が放出し、14 日後は 1.6 µg の bFGF が放出された。また、14 日目に徐放された bFGF 群は、2 種類のコントロール群と比較し有意に細胞増殖能を有していた。この結果より、bFGF-Chitosan から徐放された bFGF が 37 ° C の恒温で温められても、14 日間にわたり細胞増殖能を維持したことが証明できた。また、2 種類のコントロール群の間での有意差はなかった。このことにより、bFGF 単独を 14 日間 37 ° C で曝露するとその活性はほとんど失われてしまうことが示された。

本研究の限界は bFGF の徐放と細胞増殖能の評価が *in vitro* でしか行われていないことである。今後の研究において、*in vivo* の評価が必要である。

共有結合にて bFGF-Chitosan が作製されたことが確認できた。この合成物から bFGF が 14 日間活性を保ったまま徐放されたことを *in vitro* で証明した。この合成物で作製した scaffold が欠損した組織の再生を促し、再生医学の分野で応用できる可能性が大いにある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男  
副 査 教 授 安 田 和 則  
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

## 塩基性線維芽細胞増殖因子-キトサン複合体 (bFGF-Chitosan) からの bFGF の徐放と活性維持に関する研究

塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast Growth Factor 以下 bFGF) は細胞増殖因子の 1 つであり、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの様々な細胞に対し細胞増殖を促進させる成長因子として報告されている。実際に、bFGF の臨床応用は創傷治癒の分野で既に実行されており、優れた結果が報告されている。bFGF は細胞外マトリックスに含まれるヘパラン硫酸またはヘパリンなどの多糖類と複合体を形成し内部に貯蔵されること、細胞外マトリックスとの複合体が生体内における変性や酵素分解から bFGF を保護している可能性などが報告されている。したがって、多糖類のうちの 1 つであるキトサンは、生体内と同じ温度下でも同様に生体活性物質を貯蔵できる可能性があると考えた。キトサンに生理活性物質を導入する手法には、共有結合、ポリイオンコンプレックスを用いる手法、埋入・混入による手法が考えられる。共有結合は反応に専門知識が不可欠であるが、安定性が高く、また徐放化等の制御が可能であることより、大いに発展性が期待されるため、この共有結合を用い、新規の bFGF -キトサン化合物 (以下 bFGF-Chitosan) を開発した。共有結合で合成した bFGF-Chitosan は、生体内と同じ 37 ° C という増殖因子にとっては過酷な環境下において、ポリイオン結合や分子間結合よりも安定性があると考えられる。本研究では、bFGF は SH-Chitosan と共有結合で結合しているためより長期の徐放が得られると仮説を立てた。本研究では、第一に SH-Chitosan と bFGF を結合させる方法を確立すること、次に成長因子が変性しやすい環境下で 14 日後に bFGF-Chitosan 複合体から徐放された bFGF の量を測定し、bFGF が活性を保っていることを証明することを目的とした。採取した bFGF を含有した上清はサンプルとして採取し、-80 ° C で冷凍保存した bFGF-Chitosan から放出した bFGF の量は ELISA を用いて評価した。また、14 日目に放出された bFGF の活性を調べるため、細胞増殖能を評価した。細胞増殖アッセイはヒト線維芽細胞を播種し、サンプル溶液を含んだ培養液で 2 日間培養した。細胞数は WST-8 法にて吸光度を測定することにより計測した。コントロールは bFGF が入っていない群 と 14 日間 37 ° C で暴露させた bFGF を入れた群を用いた。bFGF は経時的に量は減少するものの、14 日間放出されることを確認した。また、14 日目に徐放された bFGF 群は、コントロールと比較し有意に細胞増殖能を有していた。本研究の限界は bFGF の徐放と細胞増殖能の評価が in vitro でしか行われていないことである。今後の研究において、in vivo の評価が必要である。共有結合にて

bFGF-Chitosan を作製し、この合成物から bFGF が 14 日間活性を保ったまま徐放されたことを *in vitro* で証明した。

審査に当たり、藤堂教授から、bFGF に注目した理由および Chitosan を利用した理由について質問があった。bFGF が既に臨床応用されていてその有効性・安全性が確立している点を Chitosan にはアミノ基がついており化学修飾しやすい点を挙げ適切に回答した。安田教授からは、*in vivo* における bFGF-Chitosan の分解と bFGF の徐放される機序と熱によって bFGF が失活しなかった機序について、さらには bFGF-Chitosan の分解される最適な *curve pattern* についての質問があった。Chitosan が生体内では lysozyme により分解されうる点と Chitosan と bFGF が高分子化合物となり失活を防いだ可能性を過去の文献を引用し回答した。また、常に同程度に緩やかに分解させる *curve pattern* が最適であると回答した。三浪教授から他の増殖因子やサイトカインなどを bFGF のかわりに導入できる可能性についての質問があった。同様な手技を用いて、チオール基を含むたんぱく質を Chitosan に導入できる可能性を述べた。

今回発表した方法は他の *growth factor* に対しても応用できる可能性があり、論文記載した *scaffold material* は再生医学への応用が期待できるものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。