

Title	人工細胞外マトリックスの分子設計とハイブリッド組織体の形成
Author(s)	近藤, 明宏
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38768
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 近 藤 明 宏

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 1 1 3 3 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 6 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

薬学研究科応用薬学専攻

学 位 論 文 名 人工細胞外マトリックスの分子設計とハイブリッド組織体の形成

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 三 浦 喜 温

(副査)
教 授 眞 弓 忠 範 教 授 馬 場 明 道 教 授 宮 本 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

生体組織において細胞は、細胞外マトリックスに接着あるいは取り囲まれており、その環境下において接着・伸展・移動・増殖・分化などの多彩な機能を発現する。細胞外マトリックスは接着性タンパク質・構造タンパク質・プロテオグリカンから構成されている。細胞外マトリックスの主要な機能は細胞接着性であり、接着性タンパク質に共通する接着活性部位の最小アミノ酸配列 (Arg-Gly-Asp:RGD) が同定されている。本研究では、細胞外マトリックスの構造や機能の一部を高分子に組み込んだ二次元および三次元人工細胞外マトリックスを分子設計し、それをを用いたハイブリッド組織体の形成を目的とした。細胞接着活性リガンドとして RGD 配列を含むペプチド (RGD ペプチドと略称) を基材表面に化学的に導入すれば、二次元人工細胞外マトリックスができると考えられる。一方、三次元人工細胞外マトリックスでは、1) 細胞接着性、2) 細胞と混合時に親水性、3) 物理的刺激負荷により、細胞を包埋できるゲル化機能が要求される。上記の分子設計概念にそって開発された人工細胞外マトリックスを用いると、生体組織を模倣したハイブリッド組織体を形成できると考えられる。

まず最初に細胞非接着性であるポリビニルアルコール (PVA) フィルム表面へ RGD ペプチドを導入することにより二次元人工細胞外マトリックスを分子設計した。N, N'-カルボニルジイミダゾール (CDI) により表面水酸基を活性化し、Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP) を導入した。X 線光電子分光法 (ESCA) により表面分析を行ない、表面に GRGDSP が固定化されたことを示した。RGD ペプチド導入 PVA フィルムの表面上で牛血管皮細胞の培養を行なうと、接着・伸展し、単層を形成した。無血清培養時でも細胞は接着・伸展した、また、細胞播種時に RGDS を添加すると、細胞は接着阻害を受けたことおよび接着した細胞に RGDS を添加すると脱着したことから RGD リガンド・レセプター機構を介して細胞接着が起こったといえる。

次に光架橋性三次元人工細胞外マトリックスの分子設計を行なった。コンドロイチン硫酸の側鎖水酸基の一部に光二量性有するクマリン基を、側鎖のカルボキシル基の一部に RGD ペプチド (Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Phe: GGGRGDSPF) を導入した。RGD ペプチド導入光架橋性コンドロイチン硫酸水溶液と血管平滑筋細胞とを混合し、光照射を行ない、ゲル化させると細胞が包埋された。培養 3 時間後は細胞は球状であったが、培養 4 日後には伸展形態を示した。これより、RGD ペプチド導入光架橋性コンドロイチン硫酸は三次元人工細胞外マトリックスとしての機能を有しているといえる。

さらに感温性三次元人工細胞外マトリックスの分子設計を行なった。細胞非接着性であるアガロースの側鎖水酸基

へGGGRGDSPFをCDIを用いて導入した。RGDペプチド導入アガロース（RGD-アガロース）ゲル内で血管平滑筋細胞を包埋培養すると、培養3時間後にはすでに接着・伸展が起こり、経時的に伸展性が増大した。これより、RGD-アガロースは三次元人工細胞外マトリックスとしての機能を有しているといえる。RGDペプチド導入光架橋性コンドロイチン硫酸の場合と比較して、RGD-アガロースのほうが包埋後の細胞の生存率が高く、伸展性に優れていた。従って、三次元人工細胞外マトリックスとしてRGD-アガロースのほうが適しているといえる。

RGD-アガロースゲル上で初代培養肝細胞の二次元培養を試みた。未処理のアガロースゲル上では細胞は接着しなかったが、RGD-アガロースゲル上では細胞はゲル上に接着したスフェロイドを形成した。肝細胞の接着性・伸展性・移動性を画像処理装置を用いて定量的に解析した結果、コラーゲン上では肝細胞は同心円状に大きく伸展したが、RGD-アガロースゲル上では比較的伸展性が低かった。また、コラーゲン上ではほとんど細胞は移動しなかったが、RGD-アガロースゲル上では無秩序な方向へ細胞は移動した。RGD-アガロースゲル上での平均移動速度はコラーゲン上よりも1.6倍大きかった。これらの結果より、RGD-アガロースゲル上では、コラーゲン上と比べて肝細胞は接着・伸展が抑制され、運動性が高い状態にあるといえる。これは細胞-基質間相互作用と比べて相対的に細胞-細胞間相互作用が強くなり、そのため凝集を起こし、スフェロイドを形成したと考えられる。RGD-アガロースゲル肝細胞の包埋を行うと、アガロースの場合と比べて形態的にはその差は区別できなかったが、RGD-アガロースに包埋された肝細胞はアガロースに包埋した場合よりも高いアルブミン分泌能を有していた。これは肝細胞がRGDペプチドを分子認識して接着し、弱い細胞-基質間相互作用を受けたためにアルブミン分泌能のような代謝機能が促進されたと考えられる。

血管内皮細胞の二次元ハイブリッド組織体と肝細胞の三次元ハイブリッド組織体を組み合わせた階層性ハイブリッド肝組織の構築を試みた。階層性モデルは多孔質膜（Millicell-CM）上でRGD-アガロースの薄膜を作製後、その上で肝細胞スフェロイドを形成させてから、RGD-アガロースを重層して包埋し、そのゲル表面上を血管内皮細胞で被覆することにより作製した。走査型電子顕微鏡観察より階層性構造が構築されていることを確認した。また、アルブミン分泌能は、約10日以上にわたって良好に維持されていた。

この階層性ハイブリッド肝組織モデルは、新しい型のハイブリッド型人工肝臓への応用が期待できる。

論文審査の結果の要旨

人工臓器の作製には生体細胞の安定な生存方法を考えることが一つの重要な問題である。この研究では合成高分子に接着活性部位の最小アミノ酸配列RGDを化学的に結合することにより、二次元及び三次元の人工細胞外マトリックスを作製し、細胞の安定な生存方法を見出し、階層性ハイブリッド肝組織の構築に成功し、10日間の肝機能の安定な維持を可能にした。これは新しい型のハイブリッド型人工肝臓の基盤とみなすことができる。よって本論文は博士論文に値すると判定された。