

## 論文内容の要旨

博士論文題目 Heparin-Like Activity of Enzymatically Synthesized Amylose Derivatives

(酵素合成アミロース誘導体のヘパリン様活性)

氏名 高原 純一

(論文内容の要旨)

【背景・目的】ヘパリンは細胞外マトリックスを構成する多糖類のひとつで、多数の硫酸基とカルボキシル基を有している。ヘパリンは抗凝固活性を持つことから医療用材料表面への抗凝固活性の付与や透析時等の血栓形成を防ぐ目的で幅広く用いられている。またヘパリンは塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)等のヘパリン結合性細胞増殖因子と結合することが知られおり、これまでヘパリンとアルギン酸の架橋ゲルが bFGF を担持および徐放し、血管新生を促進することが報告されている。しかしながらヘパリンには出血やヘパリン起因性血小板減少症等の副作用、また動物由来の未知のウイルスやアレルゲン混入のリスクがある。これらの問題を解決するために、本論文では酵素合成アミロース(ESA)の誘導体を合成し、抗凝固活性と生物活性を検討した。

【結果】グルコースを主原料として酵素反応により合成される ESA は、糖鎖の分岐が無く、分子量が均一で任意の分子量を持つ。無水コハク酸を用いて ESA にカルボキシル基を(SucESA)、さらにタウリンを用いてスルホン酸基を(SulfESA)導入した。無水コハク酸およびタウリンの添加量に応じて、異なった置換度(DS)の SucESA および SulfESA が得られた。

ヒト正常血漿中の凝固因子 factor Xa およびトロンビンに対する ESA 誘導体の抗凝固活性は、誘導体の置換度が高くなるほど、強い抗凝固活性を持つことが明らかになった。精製された factor Xa とトロンビンに対する ESA 誘導体の阻害試験から、SucESA は factor Xa とトロンビンの両方を阻害するが SulfESA は factor Xa のみを阻害することが明らかとなった。

高置換度の誘導体は factor Xa とトロンビンに対する阻害が強かったことから、ESA 誘導体の抗凝固活性の発現には、負電荷の密度が影響していることが示唆された。また、高分子量の SucESA はトロンビンに対する阻害活性が高かった。

ESA 誘導体をエチレンジアミンで架橋したハイドロゲルを bFGF とともにラット背部皮下へ埋植するとゲル内への活発な細胞浸潤と血管新生が認められ、再生医療用担体としての可能性が示された。

(論文審査結果の要旨)

ヘパリンは細胞外マトリックスを構成する多糖類のひとつで、多数の硫酸基とカルボキシル基を有している。ヘパリンは抗凝固活性を持つことから医療用材料表面への抗凝固活性の付与や透析時等の血栓形成を防ぐ目的で幅広く用いられている。またヘパリンは塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)等のヘパリン結合性細胞増殖因子と結合することが知られおり、これまでヘパリンとアルギン酸の架橋ゲルが bFGF を担持および徐放し、血管新生を促進することが報告されている。しかしながらヘパリンには出血やヘパリン起因性血小板減少症等の副作用、また動物由来の未知のウイルスやアレルゲン混入のリスクがある。これらの問題を解決するために、本論文では酵素合成アミロース(ESA)の誘導体を合成し、抗凝固活性と生物活性を検討し、以下に示す結果を得た。

1. グルコースを主原料として酵素反応により合成される ESA は、糖鎖の分岐が無く、分子量が均一で任意の分子量を持つ。無水コハク酸を用いて ESA にカルボキシル基を(SucESA)、さらにタウリンを用いてスルホン酸基を(SulfESA)導入した。無水コハク酸およびタウリンの添加量に応じて、異なった置換度(DS)の SucESA および SulfESA が得られた。
2. ヒト正常血漿中の凝固因子 factor Xa およびトロンビンに対する ESA 誘導体の抗凝固活性は、誘導体の置換度が高くなるほど、強い抗凝固活性を持つことが明らかになった。精製された factor Xa とトロンビンに対する ESA 誘導体の阻害試験から、SucESA は factor Xa とトロンビンの両方を阻害するが SulfESA は factor Xa のみを阻害することが明らかとなった。
3. 高置換度の誘導体は factor Xa とトロンビンに対する阻害が強かったことから、ESA 誘導体の抗凝固活性の発現には、負電荷の密度が影響していることが示唆された。また、高分子量の SucESA はトロンビンに対する阻害活性が高かった。
4. ESA 誘導体をエチレンジアミンで架橋したハイドロゲルを bFGF とともにラット背部皮下へ埋植するとゲル内への活発な細胞浸潤と血管新生が認められ、再生医療用担体としての可能性が示された。

本論文で得られた知見は、生体材料分野の材料開発に大きく貢献するものと認められ、審査員一同は本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。