

論文内容の要旨

博士論文題目 Studies on scaffold for corneal reconstruction using collagen-like polypeptide promoting cell adherence and migration
(細胞接着と細胞移動を促進するコラーゲン様ポリペプチドを用いた角膜再生材料に関する研究)

氏 名 柴崎 賀彰

(論文内容の要旨)

【背景と目的】 難治性角膜疾患の治療には、献眼または羊膜を用いる角膜再建術のみが有効である。しかし、生体由来の材料は、ドナー不足や病原体による移植片の汚染などの問題があり、人工材料の開発が望まれている。羊膜が角膜と同じ I 型コラーゲンを豊富に含むことに着目し、I 型コラーゲンに特徴的な繰り返し配列 Pro-Hyp-Gly を持ち、コラーゲン様 3 重らせん構造を形成する poly(Pro-Hyp-Gly) を選択した。細胞接着・移動促進機能を付与するため、fibronectin 中で相乗効果が発揮されることが報告されているペプチド鎖 Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) と Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) を Hyp 側鎖のヒドロキシル基にコハク酸を介して結合した poly(Pro-Hyp-Gly)-graft-GRGDS+PHSRN を合成し、NIH3T3 細胞を用いた細胞接着試験と細胞移動試験から角膜再生材料としての有用性を検討した。

【結果】 poly(Pro-Hyp-Gly)-graft-GRGDS+PHSRN は無色透明で平滑な表面をもつフィルムとして得た。NIH3T3 細胞に対して、GRGDS の結合はウシ I 型コラーゲン以上の接着細胞数の増加が認められたが、PHSRN の結合による効果はなかった。一方、NIH3T3 細胞の移動試験において、GRGDS の結合は細胞移動を促進し、GRGDS と PHSRN を等モル結合した時に最も高い促進効果を示した。PHSRN 単独では細胞移動を促進しないことから、poly(Pro-Hyp-Gly)-graft-GRGDS+PHSRN が細胞移動を相乗的に促進することが示された。さらに、poly(Pro-Hyp-Gly)-graft-GRGDS+PHSRN は、ウシ I 型コラーゲンと同等の RCE 細胞重層化を示した。

本研究は、人工材料上で GRGDS と PHSRN との相乗作用を示した世界で初めての報告であり、相乗作用の発現には両者のモル比が重要であることを明らかにした。本材料は角膜再生材料のみならず、病原体汚染のない安全な組織再生用足場材料開発に対する大きな貢献が期待される。

(論文審査結果の要旨)

難治性角膜疾患の治療には、献眼または羊膜を用いる角膜再建術のみが有効である。しかし生体由来の材料はドナー不足や病原体による移植片の汚染などの問題があり、人工材料の開発が望まれている。羊膜が角膜と同じⅠ型コラーゲンを豊富に含むことに着目し、Ⅰ型コラーゲンに特徴的な繰り返し配列 Pro-Hyp-Gly を持ち、コラーゲン様 3 重らせん構造を形成する poly(Pro-Hyp-Gly) を選択した。細胞接着・移動促進機能を付与するため、fibronectin 中で相乗作用の発揮が報告されているペプチド鎖 Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) と Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) を Hyp 側鎖のヒドロキシル基にコハク酸を介して結合した poly(Pro-Hyp-Gly)-*graft*-GRGDS+PHSRN を合成し、NIH3T3 細胞を用いた細胞接着試験と移動試験、並びに不死化ウサギ角膜上皮(RCE)細胞を用いた重層化試験から角膜再生材料としての有用性を検討した。

1. Poly(Pro-Hyp-Gly)-*graft*-GRGDS+PHSRN の合成

得られた poly(Pro-Hyp-Gly)-*graft*-GRGDS+PHSR フィルムは無色透明で平滑な表面を持ち、角膜再生材料の基材として必要な性質を保持していた。

2. 細胞接着・移動促進作用

NIH3T3 細胞に対し、Poly(Pro-Hyp-Gly)への GRGDS の結合はウシⅠ型コラーゲン以上の接着細胞数の増加が認められたが、PHSRN による相乗作用は認められなかった。ところが、移動試験において、GRGDS の結合は細胞移動を促進し、さらに GRGDS と PHSRN を等モル結合した時に最も高い促進効果を示した。PHSRN 単独では細胞移動を促進しないことから、poly(Pro-Hyp-Gly)-*graft*-GRGDS+PHSRN が細胞移動を相乗的に促進することが示された。

3. 細胞重層化作用

poly(Pro-Hyp-Gly)-*graft*-GRGDS+PHSRN は、ウシⅠ型コラーゲンと同等の RCE 細胞重層化を示した。

以上のように本論文では、人工材料上で GRGDS と PHSRN との相乗作用を世界で初めて示し、さらに相乗作用の発現には両者のモル比が重要であることも明らかにした。本材料は角膜再生材料に要求される透明性と平滑性を有し、角膜上皮組織の構築に必要な重層化も促進するが、角膜再生材料のみならず、病原体汚染のない安全な組織再生用足場材料開発に対する大きな貢献が期待される。これらは、物質科学の発展に貢献していると認められ、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。