

博士論文（要約）

オリゴ糖酸化物を用いて架橋した
アテロコラーゲンゲルによる血管網誘導機能の検討

望月 康晃

博士論文の要約

論文題目 オリゴ糖酸化物を用いて架橋したアテロコラーゲンゲルによる
 血管網誘導機能の検討

氏名 望月 康晃

要旨

・序文

大型再生組織の構築にむけて、個々の細胞を培養技術により増殖させることは可能となっているが、三次元培養の技術はいまだ十分に確立されていない。受動拡散による酸素や栄養物質の取り込みは数百マイクロメートルが限界とされており、それ以上の大きさになると、中心壊死を起こすことが知られている。内部に血管系が無ければ中心壊死を起こしてしまうため、組織内部から栄養を供給するための血管網を構築する必要がある。組織工学的に血管系を含んだ再生組織を作成する手法も検討されているが、実用化には至っていない。別の方法として、ホストの移植母床より血管新生を誘導することにより、再生組織に栄養血管を引き込む手法が考えられている。栄養血管を移植母床から誘導するには、血管構造を維持するための足場材料（スキャフォールド）が必要であり、スキャフォールドに求められる条件としては、三次元で適度な隙間のあるマイクロネットワーク構造であること、血管壁構成細胞との接着性がよいこと、生体内で安定した構造であること、十分な強度がありつつ血管新生を促すマトリックスメタプロテアーゼ等のプロテアーゼによって適切に分解されること、臨床現場でのハンドリングが良いことが求められる。また、生体に対する毒性が低いことは最低限の条件として必要である。さらに、血管新生を促す増殖因子を内部に搭載することができれば、内部への血管誘導に有利に働くことが期待される。こうした三次元マイクロネットワーク構造を満たすものとして、コラーゲンを主成分としたハイドロゲルが良いと考えられている。特に、コラーゲン分子両端のテロペプチドを酵素処理により取り除いたアテロコラーゲンは、コラーゲンの抗原性を低減したものであり、安全性が高いと考えられている。アテロコラーゲンは生理条件下で自然に凝集、線維化してしまうため、三次元での密度を一定に保つことが難しく、凝集を起こしにくい低濃度では柔らかすぎて足場としては不向きである。したがって、生体内で足場として十分な密度を実現させるためには、架橋剤を使用してアテロコラーゲンを安定させる必要がある。このための架橋剤として開発されたものが、オリゴ糖を過ヨウ素酸酸化し、ビシナルジオール基が酸化されて形成されたアルデヒド基を有するオリゴ糖酸化物である。この架橋剤は、アテロコラーゲンのアミノ基と共有結合することにより、アテロコラーゲンを架橋しゲル化する。また、この架橋剤は、培養液の添加により、培養液中のアミノ酸、血清等が反応してゲル化反応を制御することが可能である。

本研究では、肝臓、心臓等の大型再生臓器構築への足掛かりとして、オリゴ糖酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンのゲル化技術を最適化するとともに、その有用性について検討する。

・オリゴ糖酸化物で架橋したゲルの生成と機能に関する検討

オリゴ糖酸化物を架橋剤としてアテロコラーゲンをゲル化させるにあたって、大型再生臓器の構築に適したオリゴ糖を探すことを目的とした。単糖類から環状オリゴ糖までを用いて、各オリゴ糖に対して過ヨウ素酸酸化反応を行い、アルデヒド基を形成した。過ヨウ素酸酸化が行われた時点でのアルデヒド含有量と、減圧乾燥後のアルデヒド含有量について測定したところ、乾燥後のアルデヒド量はラフィノースが最も高く、乾燥前後の残存割合は、ラフィノース、環状オリゴ糖といった非還元糖で高く、グルコース等の還元糖で低いことが明らかとなった。また、各種糖を使用して作成した架橋剤ごとに、アテロコラーゲンのゲル化に必要な時間を測定したところ、環状オリゴ糖が1から1.5時間と最も短く、直鎖の糖類ではラフィノースが5時間ほどと最も短かった。架橋剤として使用するオリゴ糖酸化物の毒性について、ラフィノース酸化物をモデルとして、一般的に架橋剤として知られているグルタルアルデヒド、水溶性カルボジイミドと比較したところ、ラフィノース酸化物は他の架橋剤よりも高濃度で投与しても細胞毒性が低く、ゲル化に有利と考えられた。そのため、反応に必要なアルデヒドの含有量が最も多く、直鎖の糖類で最もゲル化時間が短く、毒性試験でも良好な結果が得られたラフィノース酸化物と、最もゲル化時間が短かった環状オリゴ糖のうち、 β -シクロデキストリン酸化物を用いて以後の検討を行った

・ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したゲルの機能

ラフィノース酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲル (Raf ゲル) につき、細胞増殖や、生体内での血管誘導に最適な架橋度について、ゲル化時間を調整することにより検討した。ゲルとヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を混和し形態変化を観察する実験では、ゲル化反応開始から、細胞混和までの時間と、細胞混和からゲル化停止までの時間について検討した。細胞混和からゲル化停止までの時間が1時間までのものではHUVECの三次元ネットワーク形成は良好であったが、細胞混和からゲル化停止まで2時間あけると、以後5日間にわたる観察で、細胞の三次元ネットワークは形成されなかった。ゲル化開始から細胞混和までの時間の検討では、ゲル化開始後5時間で有意に良好なHUVECのネットワーク形成を認めた。ゲルを移植マテリアルに流し込んだ後でゲル化反応を停止させ、翌日にラット筋膜下へ移植する実験では、5日後に摘出し、組織像を観察すると、ゲル化時間にかかわらず、ゲル内に移植母床から新生血管が入り込む様子が観察され、ゲル化時間の違いによる差は見られなかった。これらの実験の際に、血管新生因子である塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) を添加すると、ゲルとHUVECを混和する実験では、HUVECの形態変化によりゲルが著明に収縮する様子が観察された。ラット筋膜下への移植実験ではbFGF 100ng/ml

の濃度で添加すると、bFGF 非添加のものと比較して、移植したゲル内における血管新生の拡がり有意に良いことが示された。

- ・ β シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用したゲルの機能

β シクロデキストリン酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲル (β CD ゲル) につき、細胞増殖や、生体内での血管誘導に最適な架橋度について、ゲル化時間を調整することにより検討した。ゲルと HUVEC を混和し、形態変化を観察する実験では、ゲル化反応開始から 20 分ほどで細胞混和後に細胞が沈まない固さになり、細胞混和後 20 分でゲル化を停止させた場合、ゲル内の培養により HUVEC が最も良好なネットワーク形成を示した。細胞混和後、ゲル化停止までの時間が長くなるほど、ゲル内培養による HUVEC のネットワーク形成は悪くなることが示された。また、ラット筋膜下への移植実験では、移植マテリアルにゲルを入れた段階から架橋反応停止まで 20 分では一部のゲルが固まらなかったが、固まったゲルに関しては、ゲル化時間を変化させてもゲルへの血管誘導能は変わらないことが分かった。HUVEC を最適な架橋度のゲル内で培養して、血管網様ネットワークを形成させた後にヌードラット筋膜下へ移植した実験では、移植母床からゲル内に発達した血管網に混じって、HUVEC により構築された血管構造が認められ、HUVEC により構築された血管構造の内部に赤血球を認めた。

- ・ 考察

Raf ゲル、 β CD ゲルともに、架橋度を最適化すると、HUVEC を埋め込む実験では HUVEC の三次元ネットワークが構築され、ラット筋膜下へ移植する実験では移植母床から新生血管が誘導された。また、ゲルが血管新生因子である bFGF を担持できることが示された。前述の三次元スキャフォールドとして求められる条件についてそれぞれ考察すると、今回使用したオリゴ糖酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルは、それらの条件を十分に満たしていることが分かった。しかし、移植母床からの血管誘導が良好であったとしても、血管新生の進行速度が遅いため、大型再生臓器を構築した際には、中心壊死を起こさないように中心部まで栄養供給するための構造が必要である。今回検討した 2 種類のゲルのうち、ゲル化時間が短く、良好な結果が得られた β CD ゲルを用いて、ゲル内で HUVEC を培養し、三次元の血管網様ネットワークを構築した後に、ラット筋膜下へ移植した結果、移植母床由来の血管内だけでなく、HUVEC 由来の血管内にも赤血球が確認できた。これは、HUVEC で構築された血管網様ネットワークの中に、移植母床からの血流が入り込んだことを示しており、幼弱な段階で移植母床由来の血管と HUVEC 由来の血管が連結したことを示唆するものである。今回の実験では他の HUVEC を埋めない実験と同様に 5 日間の埋植後に取り出している。これまで、HUVEC を混和せずに筋膜下に植えた実験では、多くの場合、辺縁に血管形成が見られ、血管新生が良好なものでは、内部に向かって伸びていく様子が観察できたのに対して、本実験における HUVEC 由来の血管はゲルの中心付近で内腔に

赤血球が詰まっている。このことから、HUVECのネットワークを先に作成して移植することで、辺縁だけでなく、内部まで栄養が到達することが期待され、HUVECとともに構築したい臓器の細胞を埋めることで、これまでよりも大きな三次元組織が形成できる可能性がある。

・ 結語

本研究により、オリゴ糖酸化物を架橋剤として使用したアテロコラーゲンゲルは、ゲルの架橋度を調節することにより、血管網誘導能に加えて、大型再生組織の構築に必要な三次元のスキヤフォールドとして求められる条件を十分に満たしていることが分かった。また、ゲル内に HUVEC で構築された血管網様ネットワークを構築してから移植することにより、中心壊死を起こすことなく三次元組織を形成するための基盤を作ることができたと考えている。