

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 栗原 宏征

足場依存性細胞の生存にとって細胞接着は不可欠であることから、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリクス分子は細胞培養工学や組織工学など種々の分野で利用されている。現在、これらの細胞外マトリクス分子は牛、豚などの家畜動物に由来する原料から分離精製されたものが主に用いられている。しかし、ウイルス汚染や、最近ではプリオン汚染の危険性から、家畜動物由来の細胞外マトリクスに替わる人工的な細胞外マトリクス分子の安定供給が望まれている。このような背景から、人工的な細胞外マトリクス分子の設計とその生産に関する研究が、90年代初頭から現在まで行われてきた。本研究では、天然の細胞外マトリクス分子の接着モチーフ配列、架橋モチーフ配列、金属プロテアーゼ切断モチーフ配列などを含む繰り返しアミノ酸配列からなる人工的な細胞外マトリクスを大腸菌で作製することを目的として、その為の繰り返しDNA配列作製のための新規な手法を提案し、実際に本手法を用い種々の人工細胞外マトリクス分子を設計・生産し、その細胞接着活性、プロテアーゼによる分解性などの機能性を評価している。

第1章は本研究の目的と意義、研究背景、既往の研究について述べている。

第2章では、繰り返しDNA配列を作製する手法としてOverlap elongation PCRを提案し、本手法の有用性に関して述べている。従来のライゲーション反応を用いた繰り返しDNA配列調製法では、数十塩基から百塩基長の比較的長いオリゴヌクレオチドを出発材料として用意する必要があった。本手法を用いると、自分が望む繰り返しアミノ酸配列をコードする10塩基長から20塩基長の比較的短いセンス鎖、そしてセンス鎖に対し数塩基だけ5'側にずらしたアンチセンス鎖を用意し、PCRを行うだけで様々な長さの繰り返しDNA鎖が作製可能である。ここではOverlap elongation PCRの有用性を示すために、6塩基長、9塩基長、さらに長い塩基配列を繰り返し単位とするDNA鎖が本手法を用い伸長可能であること確認している。また得られたDNA産物を発現ベクターにクローニングし、大腸菌を宿主として発現可能であることも示している。

第3章では、Overlap elongation PCRを用い細胞接着に関与する受容体であるインテグリンのリガンド配列、RGD配列を繰り返した人工細胞外マトリクスを設計し、その細胞接着性などの機能評価を行っている。RGD配列の繰り返し数が2回(RGD2)、21回(RGD21)、43回(RGD43)のものを大腸菌発現系で作製している。特にRGD43は、その長い繰り返し配列中のRとDの静電的相互作用により自己組織化した構造を形成することを見出している。またRGDの繰り返し数が細胞接着に与える影響を検討し、RGDの繰り返し

返し数が増加するのに伴い細胞接着活性が増大すること、RGD43 は幅広い細胞種に関して高い細胞接着活性を示し、天然の細胞外マトリックス分子と比較しても同等、あるいはそれ以上の接着活性を有することを明らかにしている。このような RGD43 を加工することでプロテインシート、3次元ヒドロゲルを作製し、これらの上で細胞が接着・伸展可能であることを示している。また、RGD43 を直径 200 μm 程度のスポットとしてアレイしたスライドガラスを用い、細胞マイクロアレイを作製することにも成功している。このように本章では、作製した RGD43 が天然の細胞外マトリックス代替物として利用可能であることを述べている。

第4章では、生体内で徐々に生分解される人工細胞外マトリックス分子の創製を試みている。すなわち、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 切断配列、トランスグルタミナーゼ (TG) 架橋化配列および RGD 配列を直列に連結した繰り返し単位を有し、これを 1 2 回繰り返し配列を有している人工細胞外マトリックス分子の作製とその機能評価の結果について述べている。作製した分子を TG で架橋することにより、コラーゲン繊維束とほぼ同直径の繊維状構造体を形成できることを示している。また、未架橋の人工細胞外マトリックス分子が MMP を産生する細胞の初期接着過程において比較的容易に分解されるため接着活性が低いのに対して、TG 架橋化産物は MMP 分解に対する耐性が向上し、MMP 産生細胞の初期接着過程にほとんど分解を受けないため細胞接着活性が 3 倍以上増加することを見出している。このような生分解性が制御された人工細胞外マトリックスはこれまでに例が無く、生体内に移植した後に徐々に生分解されることが期待される新規人工細胞外マトリックスとして有望であると述べている。

第5章では本論文の総括および今後の展望を述べている。

以上、本論文は種々の長さの繰り返し DNA 配列を、Overlap elongation PCR を用いて非常に短いオリゴヌクレオチドを出発材料として作製する新規な手法を提案し、本手法を利用して天然の細胞外マトリックス分子に匹敵する高い細胞接着活性を有する人工細胞外マトリックス分子や生分解性の制御が可能な架橋化人工細胞外マトリックス分子を作製し、その優れた性能を実証したものである。それらの成果は細胞培養工学や組織工学の分野ならびに化学生命工学分野の発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。