

審査の結果の要旨

氏名 服部理恵子

本研究は、再生組織に血流を供給する血管網形成の手法として、アルギン酸修飾アテロコラーゲンをカルシウムでイオン架橋したマテリアルを創製し、その物性を評価するとともに、ラット移植モデルにおける血管を含んだ肉芽組織誘導についても検討し、下記の結果を得ている。

1. アテロコラーゲンとカップリング反応（共有結合）させる官能基をアルギン酸に付与する為、アルギン酸のスクシンイミドエステル化を実施した。その後合成された HOSu 活性化アルギン酸はアテロコラーゲンの PBS 溶液に添加してカップリング反応させ、アルギン酸修飾アテロコラーゲン溶液を作製した。溶液状態を保った各アルギン酸修飾アテロコラーゲン溶液に最低値 0.05% の塩化カルシウム溶液を添加していずれの溶液もゲル化する事を確認し、これをアルギン酸修飾アテロコラーゲングルと呼称する。
2. アルギン酸修飾アテロコラーゲングル及び、これと同濃度のアルギン酸/アテロコラーゲン混合物（アルギン酸とアテロコラーゲンの間に共有結合のないもの）を培養液に浸漬し、経過時間によるそれぞれの重量の増加/減少を測定したところ、アルギン酸/アテロコラーゲン混合物は重量減少が 50% まで低下したのに対し、アルギン酸修飾アテロコラーゲングルは溶媒に浸漬してからの重量減少が 20% にとどまり、アルギン酸-アテロコラーゲン間に共有結合を加える事がゲルの安定に有効である事を示した。
3. アルギン酸修飾アテロコラーゲングル及び、これと同濃度のアルギン酸/アテロコラーゲン混合物上で、ヒト臍帯静脈内皮細胞（以下 HUVEC と略す）を培養し、HUVEC のゲルへの接着性を観察したところ、アルギン酸修飾アテロコラーゲングルの方が、アルギン酸/アテロコラーゲン混合物よりも有意に高い接着性を示し、アルギン酸が含まれても細胞接着性が失われない事を示唆している。
4. アルギン酸修飾アテロコラーゲングル及び、アルギン酸を含まない化学架橋アテロコラーゲングルに塩基性線維芽細胞成長因子（以下 bFGF と略す）を含有させコラゲナーゼ水溶液に浸漬したところ、化学架橋アテロコラーゲングルではコラゲナーゼ水溶液に浸漬すると時間と共にゲルが分解し bFGF の放出が見られたが、アルギン酸修飾アテロコラーゲングルでは bFGF の放出量は低値にとどまり、ゲルの bFGF に対する優れた結合性が示されている。
5. HUVEC とフィブリンのクラスター（以下 HUVEC クラスターと表記）をアルギン酸修飾アテロコラーゲングルにより被覆し経時的に観察したところ、クラスター表面から樹枝状 HUVEC の伸長が認められた。また、bFGF を複合化させたアルギン酸修飾アテロコラーゲングルで被覆したところ、bFGF を複合化させない場合と比べてより活発な HUVEC の伸長が認められ、複合化した bFGF の活性が失われていない事が明らかになった。また、

2種類の条件の異なるアルギン酸修飾アテロコラーゲンゲル間で HUVEC の伸長に有意差が認められ、HOSu 活性化アルギン酸の濃度やスクシンイミド数がゲルの性能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

6. スクシンイミド数が同じ3種のゲル間で HUVEC の伸長を比較したところ、アルギン酸密度の低いゲルの方が HUVEC の伸長が強く、優れた足場機能を有することが示唆された。一方、スクシンイミド数による影響を評価する為、HOSu 活性化アルギン酸濃度が同じの3種のゲル間で同様の検討を実施したところ、スクシンイミド数が低いゲルの方が HUVEC の伸長が強く、優れた足場機能を有する事を示している。
7. 様々な条件で作成したアルギン酸修飾アテロコラーゲンゲルをラットの腹直筋下に移植し、5日後に採取して肉芽組織形成能と血管誘導能の評価を行った。採取サンプルの切片を Hematoxylin-Eosin で染色され肉芽組織の形成を定性及び定量的に評価し、また von Willebrand 因子に対する免疫染色で血管誘導能を定性及び定量的に評価したところ、HOSu 活性化アルギン酸密度の低いゲルの方が肉芽組織形成能、血管誘導能ともに優れていることが示され、*in vitro* 評価の結果と同様の傾向であった。
8. 均一なアルギン酸修飾アテロコラーゲンゲルを作製する為に、グルコン酸カルシウムを用いて緩徐なゲル化を行う代替プロトコールを開発した。濃度の異なるグルコン酸カルシウム溶液でゲル化したアルギン酸修飾アテロコラーゲンゲルと、塩化カルシウムでゲル化した同成分のアルギン酸修飾アテロコラーゲンゲルを、7と同様の方法にて *in vivo* 評価を行ったところ、0.013%のグルコン酸カルシウム溶液でゲル化したアルギン酸修飾アテロコラーゲンゲルが、塩化カルシウムでのゲル化よりも有意に優れた肉芽組織形成能、血管誘導能を示し、グルコン酸カルシウムによるゲル化の有用性が実証された。
9. 様々な量の bFGF をアルギン酸修飾アテロコラーゲン溶液に添加し、0.013%グルコン酸カルシウム溶液でゲル化させたものを7と同様の方法にて *in vivo* 評価したところ、1000ng/mL の濃度で bFGF を複合化させたゲルにおいて、bFGF を複合化させていない同成分のゲルと比べ有意に優れた肉芽組織形成能、血管誘導能が示された。bFGF がゲルのアルギン酸部分に静電的に結合し、ゲル内への肉芽や血管の発達に寄与する事が示唆された。

以上、本論文では血管新生や肉芽形成のための足場材料として、アルギン酸修飾アテロコラーゲンを基本とする様々なゲルを作製し、*in vitro* での物性評価を経てラットへの移植実験を実施した。移植されたアルギン酸修飾アテロコラーゲンゲルは、移植後5日目に豊富な新生血管を含む肉芽に置き換わる事が確認された。また、ゲル化にカルシウムイオンの解離性が低いグルコン酸カルシウムを用いることや、bFGF を複合化させることにより、ゲルの肉芽組織形成能、血管誘導能が強化されることも示した。これらの研究は今後の再生医療に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと思われる。