

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 伊佐治 寿彦

本研究は再生医療への応用を目的として、細胞外基質を模倣したアルギン酸アテロコラーゲンゲルを作製し、血管新生誘導する足場材料としての至適条件を検討したものであり、下記の結果が得られている。

1. アルギン酸を N-ヒドロキシスクシニミド(以下 HOSu)で活性化したスクシニミド活性化アルギン酸(以下 Su アルギン酸)溶液とアテロコラーゲン溶液とを混合し、両者の間の共有結合により架橋体を形成させ、アルギン酸アテロコラーゲンゲルが得られた。本研究では、アテロコラーゲンの最終濃度を 1%とし、Su アルギン酸の最終濃度(以下 Su アルギン酸濃度)と、アルギン酸 100 糖ユニット当たりの HOSu 活性化カルボキシル基の数(以下 Su 数)が異なるゲルを多種類作製し、その特性を評価した。ゲル化してからの生理条件下での形態変化を評価するため、ゲルの重量を 2 日間内皮細胞用の培地に浸漬する前後で測定し、その比を求め、膨潤収縮率と定義した。Su 数や Su アルギン酸濃度が高いゲルほど培養液を吸収して膨潤する傾向を認めた。膨潤収縮率 80%以上 180%以下のゲルは、Su 数が 2 と 4 のゲルは全て、Su 数が 15 のうち Su アルギン酸濃度が 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 の計 16 種類であった。
2. 実際の操作においては、Su 数や Su アルギン酸濃度が低いゲルほど、二溶液を混合した後ゲル化に長時間を要する傾向があった。なかでも Su アルギン酸濃度が 0.05%で Su 数が 2 のゲルは、長時間が経過してもゲルの硬度が不十分であった。以上より、細胞移植の足場材料として適した物性を有するゲルの組成の範囲を特定した。
3. ゲルの血管新生誘導能を生体外で評価した。具体的には、内皮細胞フィブリン塊をゲルに包埋し、6 日間培養し、内皮細胞の成長距離を測定した。成長距離は時間とともに延長し、Su 数や Su アルギン酸濃度が低いほど、成長距離が長くなる傾向を示した。
4. 生体内でゲルの血管新生能を評価した。具体的には 16 種類の組成からなるアルギン酸アテロコラーゲンゲルを、それぞれ厚さ 1mm 内径 3mm の ePTFE 製人工血管片に充填ののち、ラットの腹直筋筋膜下に埋植し、5 日目に採取した。採取したサンプルの H.E.染色による組織標本作製し、サンプル中の新生血管を含む領域の割合を示す血管新生占有率、血管新生を含む領域中の新生血管そのものの密度を示す総血管密度、また新生血管の内腔面積の割合を示す総血管面積率を算出した。また、抗 α SMA 抗体を用いた免疫染色を行い、 α SMA 染色陽性新生血管の密度を示す、成熟血管密度を算出した。すべてのゲルに関して血管新生占有

率を比較すると、全体として、Su アルギン酸濃度が低くなるほど、また Su 数が低くなるほど血管新生占有率が高くなる傾向が認められた。

5. 総血管密度、総血管面積率、成熟血管密度の各項目に関して、Su アルギン酸濃度、また Su 数の異なるゲル間で比較検討したが、いずれも有意差を認めなかった
6. Su アルギン酸濃度と Su 数を固定し、アテロコラーゲン濃度 0.5%と 1%のゲルとで比較したが、いずれの項目にも差を認めなかったが、アテロコラーゲン濃度 0.5%のゲルは機械的強度が弱く、細胞移植の足場材料として不適であると考えた。
7. bFGF の添加による血管新生に対する効果を検討するため、Su アルギン酸濃度のみが異なる 2 種類のゲルに 1000ng/ml の bFGF を加えたものを作製し、先述と同様の埋植実験を行った。血管新生占有率は、Su アルギン酸濃度が 0.2 の群では bFGF 添加ゲルが無添加ゲルに対して有意に高値であったが、Su アルギン酸濃度が 0.05 の各ゲル間では有意差を認めなかった。総血管密度、総血管面積率は、Su アルギン酸濃度 0.2 と 0.05 のいずれの各ゲル間でも有意差を認めなかった。成熟血管密度は Su アルギン酸濃度 0.2 と 0.05 のいずれの群間においても、bFGF 添加ゲルが無添加ゲルに対して有意に高値であった。

以上、アルギン酸アテロコラーゲン化学架橋ゲルは、その立体構造が維持される範囲において、よりネットワーク構造の疎なものが、優れた血管新生誘導能を示した。また、bFGF を添加することで、angiogenesis と arteriogenesis を含めた血管新生誘導能はより向上した。本研究で示された至適な条件を有するアルギン酸アテロコラーゲンゲルは、足場材料に応用することで大型再生臓器の創生に大きく貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。