

京都大学	博士 (工 学)	氏名	陳 顯
論文題目	Application of polymer materials for development of artificial pancreas (人工膵臓開発における高分子材料の応用)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、糖尿病の治療に用いる人工膵臓を実用化する際に必要となる凝固系の活性化の制御、ハイドロゲルによる半透膜の作製、インスリン分泌細胞の確保といった課題を高分子材料を用いて解決を図ろうとして研究したものである。序論、計 5 章の本編、そして概要からなっている。</p> <p>第 1 章では、肝臓内に移植された膵ランゲルハンス氏島 (膵島) 表面での血液凝固に起因する炎症反応 (IBMIR) を抑制するために、膵島表面に血液凝固を抑制する酵素トロンボモジュリン (TM) と生成されたフィブリンを溶解するウロキナーゼ (UK) を同時に固定することを試みた。Maleimide 基を片末端に持つポリエチレングリコール (PEG) とリン脂質 (lipid) との複合体 (Mal-PEG-lipid) を合成した。UK と TM のアミン基に Traut 試薬を作用させ、Thiol 基に変換した。次にハムスターから分離した膵島を Mal-PEG-lipid で処理し、細胞膜の脂質二重膜に Mal-PEG-lipid を疎水性相互作用により固定し、膵島表面に Maleimide 基を導入した。Maleimide 導入膵島を Thiol 基導入 UK と TM と反応させ、Thiol 基と Maleimide 基との反応により UK と TM とを膵島表面に固定した。プラスミノゲン含有フィブリンゲルプレートの上に UK と TM とを固定化した膵島と未処理の膵島をそれぞれスポットして 14 時間 37°C に保温した後観察を行ったところ、未処理膵島と比べ、UK と TM とを固定化した膵島の周辺のフィブリンゲルは広い範囲にわたり溶解し、UK の活性が示された。また、UK と TM とを固定化した膵島をトロンビンとプロテイン C を含む緩衝液中でインキュベートし、その上清中の活性化プロテイン C 量を定量したところ、膵島表面の TM によりプロテイン C が活性化型へ変換されたことが示された。また、膵島のグルコース濃度変化に応じたインスリン分泌の評価を行ったところ、未処理膵島と変わらない結果が示され、UK と TM との固定化が膵島のインスリン分泌機能に損傷を与えないことが示された。本方法により膵島機能に影響を与えることなく IBMIR を防止するための UK と TM を膵島表面に固定化することができた。また、この方法はアミン基を持つ任意のタンパク質を種々の細胞表面へ固定化するときに応用できる汎用性の高い方法であると考えられる。</p> <p>第 2 章では、低分子量の抗凝固剤アルガトロバンをリポソームに封入し、そのリポソームを膵島表面に固定することによりアルガトロバンを膵島表面に局在化させ、さらに徐放することを試みた。アルガトロバンの溶液を卵由来フォスファチジルコリン (Egg PC) 膜に添加し、12 時間室温で攪拌することによりアルガトロバンをリポソームの内部に封入した。膵島表面への固定には相補的である 2 種類の oligo(ssDNA) (oligo(dA) & oligo(dT)) をそれぞれ末端に持つ PEG-lipid を使用した。最初にモデル実験</p>			

として、蛍光色素でラベルした脂質を Egg PC と 1.0 wt% で混合して蛍光ラベルされたリポソームを作製した。リポソーム懸濁液に oligo(dT)-PEG-lipid を、CCRF-CEM 細胞に oligo(dA)-PEG-lipid をそれぞれ作用させてから、細胞とリポソームを混合した。共焦点型蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞表面に蛍光が観察され、細胞表面にリポソームが固定できることがわかった。また、Balb/c マウス臍島を同様の処理を行ったところ臍島表面のみに蛍光が観察された。同様に oligo(ssDNA)-PEG-lipid を用いてアルガトロバン封入リポソームを臍島表面に固定した。これを緩衝液中 37°C に所定時間保温し上清を採取し、トロンビン非活性化能を評価した。時間の経過に伴い上清に含まれるアルガトロバンの量が増加し、臍島表面に固定化されたリポソームからアルガトロバンが徐放されることが明らかになった。インスリン分泌のグルコース応答試験を行ったところ、第 1 章同様リポソーム固定操作が臍島機能に傷害を与えていないことを確認した。この方法はほとんどの低分子量薬剤の細胞表面への固定化とそこから徐放に応用できる汎用性の高い方法であると考えられる。

第 3 章では oligo(ssDNA) の相補性を利用し特異的な細胞接着を引き起こすことが可能であると考え、数種類の配列を持つ oligo(ssDNA) と PEG-lipid の複合体 (oligo(ssDNA)-PEG-lipid) を合成し、これらを用いて修飾された細胞同士の間での接着また基板への接着制御を試みた。まず相補的な配列である oligo(ssDNA) を 2 組用意し、PEG-lipid との複合体を合成した。CCRF-CEM 細胞の表面を 2 種の oligo(ssDNA)-PEG-lipid で修飾して、それぞれを混合したところ、細胞間での接着は相補的な oligo(ssDNA) で修飾された細胞間のみで観察され、さらに長時間培養した場合は細胞クラスターが形成された。金蒸着ガラス基板上に 5' 末端にチオール基を有する oligo(ssDNA)(HS-oligo(ssDNA)) を固定し、それに相補的な oligo(ssDNA')-PEG-lipid で表面修飾を行った細胞を播種したところ、細胞接着は相補的 oligo(ssDNA) を有する細胞に限定され、そうでない細胞は基板に接着しなかった。2 種の配列を有する HS-oligo(ssDNA) を固定した基板では、oligo(ssDNA) 比と接着細胞数が比例し、細胞の種類だけでなく接着比まで制御が可能であることを示した。また、ガラス基板に複数種の HS-oligo(ssDNA) 溶液を個別に浸けたスタンプで押印し、oligo(ssDNA')-PEG-lipid で修飾した細胞を播種したところ、スタンプの形と一致した細胞接着が観察された。このように、oligo(ssDNA)-PEG-lipid を使用した細胞表面修飾により特定の細胞同士間の接着、また、基板上の所定の位置への接着を制御することができた。

チオール基が導入された酵素の臍島表面への固定化、また側鎖にチオール基を有する水溶性高分子を用いジスルフィド架橋反応により臍島をハイドロゲル内に封入することが行われてきた。チオール基の酸化によるジスルフィドの形成速度についての知見を持つことは、上記の反応を制御するのに役立つ。第 4 章では、この反応を速度論的に解析するため、チオール基を持つ高分子鎖 Poly(acrylamide-co-N-acrylcysteamine)

を合成し、空気酸化によるまたは酸化グルタチオンを添加したときのジスルフィド形成速度の評価を行った。空気酸化では、低温ではジスルフィド形成速度はさほど速くはないが、**37°C**ではジスルフィド形成が進み、しかし、反応が進むにつれジスルフィド形成速度が低下した。また、反応進行とともに酸素濃度が低下し膵島細胞に障害を与える。一方、酸化グルタチオンを添加した反応系では反応速度が大きく、膵島細胞の生存を維持したままカプセル化を行える速度であった。このように、低酸素でかつ低温であればチオール基の自然酸化を防止でき、膵島細胞の生存にもさほど影響を与えない。また、ジスルフィド架橋を高速で形成させたい場合には、チオールジスルフィド交換反応が自然酸化よりも適していることがわかった。

人工膵臓を医療として定着されるためには、十分量のインスリン分泌細胞を確保しなければならない。**ES**細胞と**IPS**細胞に代表されるような幹細胞からインスリン分泌細胞を分化させる手法が有望とされている。幹細胞からインスリン分泌細胞を分化誘導した場合、種々の細胞の中にインスリン分泌細胞が存在する。このような状態からインスリン分泌細胞を生きたまま分離する手法が必要である。第**5**章では、様々な細胞が混在する環境の中からイムノブロッティングの手法によりインスリン分泌細胞の位置を特定し、さらにその細胞を生きたままピックアップする手法の確立を試みた。具体的には**MIN6**(インスリン分泌)細胞と**Hep-G2**(α -フェトプロテイン分泌)とをスポット状に播種した培養皿にメチルセルロースを溶解した培地を少量添加した。液面が平らになってからニトロセルロース膜を乗せ**1**時間**37°C**で保温した。膜を取り出して洗浄し、 α -フェトプロテインとインスリンのイムノブロッティングを行ったところ、それぞれの細胞と一致した箇所に発色が見られ、発色の度合いは播種細胞の密度に比例した。培養皿からメチルセルロース溶解培地を洗浄により除去し、クローニングリングを使ってインスリンを分泌している細胞を限定的にトリプシンで剥離し、回収した細胞を他の培養皿に再播種した。所定期間培養後に細胞をインスリン免疫染色したところ、インスリンを有する細胞が観察された。一連のタンパク質吸着操作が細胞の生存に影響を与えることなく細胞の位置を特定で、さらにその細胞を生きたまま回収しさらに再培養する方法を確立した。

概括では、本論文で得られた成果について要約している。

(論文審査結果の要旨)

本論文は、腓ランゲルハンス氏島（腓島）移植の際に問題点として挙げられる血栓生成の抑制、インスリン分泌細胞源の樹立、ハイドロゲル形成の解析などを目標に研究した成果について5章にまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. Maleimide 基と Thiol 基との反応を利用し、腓島表面に血栓生成を抑制する酵素ウロキナーゼとトロンボモジュリンを固定した。固定されたウロキナーゼはフィブリン溶解作用、トロンボモジュリンはプロテイン C 活性化作用をそれぞれ維持し、腓島も操作により大きな損傷を受けることなかった。
2. oligo(ssDNA)のハイブリダイゼーションを利用し、腓島表面に低分子抗凝固剤アルガトロバンを封入したリポソームを固定した。時間経過によりリポソームからアルガトロバンが徐放され、およそ 24 時間前後ですべての放出が終了した。この固定化操作においても腓島のインスリン分泌能に障害は観察されなかった。
3. oligo(ssDNA)のハイブリダイゼーションを利用し、細胞接着の制御を試みた。その結果、浮遊している細胞同士の接着、oligo(ssDNA)固定化基板と細胞の接着、oligo(ssDNA)固定量に対する接着細胞数、播種密度、接着領域の形状を制御することに成功した。
4. 高分子側鎖のチオール基のジスルフィド形成反応を速度論的に解析するため、側鎖にチオール基を持つ高分子鎖 Poly(acrylamide-co-N-acrylcysteamine)を合成し、種々の条件下でジスルフィド形成速度を調べた。その結果、低酸素でかつ低温であればチオール基の空気酸化を防止でき、腓島細胞の生存にもさほど影響を与えないこと、また、ジスルフィド架橋を高速で形成させたい場合には、酸化グルタチオン添加によるチオール-ジスルフィド交換反応が空気酸化よりも適していることがわかった。
5. 幹細胞からインスリン分泌細胞を分化誘導した場合、種々の細胞の中にインスリン分泌細胞が存在する。様々な細胞が混在する環境の中から免疫ブロッテイングの手法によりインスリン分泌細胞の位置を特定し、さらにその細胞を生きたまま分離する手法を確立できた。

以上のように、本論文は、高分子材料を用いた人工腓島開発の課題解決に基礎的知見を与え、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 23 年 8 月 24 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。