

京都大学	博士 (医科学)	氏名	FRISCO HEIDIE LAYA
論文題目	Synthetic Molecules that Protect Cells from Anoikis and Their Use in Cell Transplantation (アノイクスから細胞を保護する合成分子と細胞移植への利用)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、細胞治療は革新的再生医療として期待が高まっているが、実用化には依然課題が多い。その大きな課題の一つに、脱接着に起因するアポトーシス、即ち、アノイクスによる移植細胞の生存率の低さがある。生体内では細胞外マトリックスと細胞間の相互作用が細胞生存に働きかけており、中でも細胞表面タンパク質であるインテグリンとシンデカンが重要な役割をしていることが知られている。本研究では、細胞移植効果の改善を狙い、インテグリンとシンデカンを同時に活性化する両レセプターアゴニスト化合物の創生を目的とした。</p> <p>本研究では、インテグリンとシンデカンに対して同時に作用するハイブリッド化合物をデザインした。インテグリン結合分子にはRGDSペプチドを利用し、シンデカンのクラスターリング誘導分子には当該研究室が見出したアドヘサミンを用いた。ハイブリッド化合物は化学合成により、RGDSペプチドとアドヘサミンとをアミノオキシアセチルリンカーを介して共有結合させたものを2種類合成した(mono-RGDS-アドヘサミン、di-RGDS-アドヘサミン)。</p> <p>2種類のハイブリッド化合物のヘパリン結合能は、ITC (Isothermal titration calorimetry) 測定により確認した。両化合物は、アノイクスを誘導したNIH3T3細胞のアポトーシスを抑制した。アポトーシスの検出は、アポトーシス誘発により細胞表面に現れるアネキシンVのフローサイトメーターによる検出とカスパーゼ-8及び-3の活性化を指標とした。また、競合実験等より、化合物の抗アノイクス活性には、RGDSペプチドとアドヘサミンが共有結合されていることが重要であることが示唆された。この結果は、インテグリンとシンデカンに対して同時に作用するようにデザインしたハイブリッド化合物が、両レセプターアゴニスト化合物として機能することを意味する。以上の結果は、今回合成した2種類の化合物が、脱接着により誘導されるアノイクスから直接細胞を保護していることが示唆された。</p> <p>本化合物の抗アノイクス活性について、作用メカニズム解析を行った。両化合物とも、Akt及びRac-1のリン酸化を亢進させ、一方FAK、PI3KやERKのリン酸化は亢進させないこと、更にアポトーシス関連蛋白Bcl-xLの発現を更新させることが明らかとなった。また、NIH3T3細胞を用いた免疫染色により、化合物がインテグリンとシンデカン-4の共局在化を誘導することが示唆された。これらの結果は、化合物がインテグリンとシンデカン-4の共局在化を誘導してRac-1を活性化し、続いてAktの活性化及びBcl-xLの発現を促進させることを示唆している。</p> <p>本化合物の細胞移植の改善効果について検討した。2型糖尿病モデル(db/db)マウスの皮膚に穴をあけ、骨髓由来細胞を化合物と共に皮内注射した結果、治癒効率の改善が認められた。また、ウサギ水疱性角膜症モデルにおいて、培養角膜内皮細胞の懸濁液に化合物を添加し、前房内に投与することで角膜が透明治癒し、注入した培養角膜内皮細胞が生着していることが判明した。本結果は、インテグリンとシンデカンの両レセプターアゴニストである化合物が、細胞治療に利用できる可能性を示唆している。</p> <p>以上の結果から、インテグリンとシンデカンの両レセプターアゴニストである化合物は、インテグリンとシンデカンの共局在化を誘導し、small GTPase Rac-1とAktの活性化を行うことで、アノイクスから細胞を保護することが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
<p>近年、細胞治療への期待が高まっている。しかし、脱接着に起因するアポトーシス、すなわちアノイクスによって、移植細胞の生存率が低下することが実用化における課題である。アノイクスは、細胞表面タンパク質のインテグリンとシンデカン等を介した細胞外マトリックスと細胞間の相互作用により阻害されている。</p> <p>本研究では、細胞外マトリックスを合成化合物で模倣した。すなわち、シンデカンのクラスターリングを誘導する合成化合物アドヘサミンと、インテグリンに結合するRGDペプチドのハイブリッド化合物を化学合成し、インテグリンとシンデカンを同時活性化することにより懸濁培養細胞のアノイクスを阻害した。</p> <p>このハイブリッド化合物存在下ではNIH3T3細胞は3日間浮遊させてもほぼ100%の細胞が生存した。本化合物はインテグリンとシンデカン-4の共局在化を誘導してRac-1を活性化し、続いてAktの活性化及びBcl-xLの発現を促進させた。また、本化合物の細胞移植の改善効果を病態モデル動物実験により検討した。2型糖尿病モデル(db/db)マウスにおける創傷部への骨髓細胞との同時投与により創傷治癒の効率が改善すること、およびウサギ水疱性角膜症モデルにおける前房内への培養角膜内皮細胞との同時投与により角膜が透明治癒することが確認された。これらの結果から、この合成化合物の抗アノイクス活性が細胞移植効率を改善させようと考えられた。</p> <p>以上の研究は、小分子化合物による細胞移植の効率化を通して再生医療の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成26年12月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降