

(論文内容の要旨)

本論文は、中枢神経疾患の治療技術として応用できるバイオマテリアルの創製を目的とし、細胞や組織の高度な機能制御を可能とするタンパク質製バイオマテリアルの設計に関する研究を行ったものであり、序章、本編 2 部 6 章、および概要から構成されている。

序章では、蛋白質が持つ高度な機能を組み込んだ高機能性バイオマテリアルの必要性を述べ、遺伝子工学的手法が、構造や機能を高度に制御したバイオマテリアルの設計において有用であることを論じている。中枢神経疾患治療において有望視されている細胞移植療法が臨床応用されるためには、移植細胞源の確保、および移植細胞の生着率向上並びにその機能制御という 2 つの問題を克服する必要があるが、その問題点を解決するための、遺伝子工学的手法によって設計されたタンパク質製バイオマテリアルの可能性について述べている。

第 1 章から第 3 章を含む第 1 編では、神経幹細胞 (NSC) を高効率に増幅できる生理活性表面の創製のためのキメラ蛋白質の精密設計に関して述べられている。

第 1 章では、NSC を高効率に増幅することのできる培養基材表面の設計について検討している。NSC の自己複製を担う蛋白質である上皮細胞増殖因子 (EGF) を基材表面上に固定し、単層培養により NSC を増幅できる培養基材表面の設計を行った。EGF の基材表面固定法として、オリゴヒスチジン (His) と金属イオンとの相互作用を利用した。遺伝子工学的手法により、EGF の C 末端に His を融合したキメラ蛋白質 (EGF-His) を合成した。基材表面には、Ni イオンを末端に有する自己組織化単分子膜を形成させ、EGF-His を基材表面に配向固定させた。本章では、Ni 表面密度の調節によって、EGF 表面密度を制御することにより、NSC を高効率に増幅できる最適条件を見出した。本章で設計した培養基材を用いることで、従来法に比べ高効率に NSC を増幅できることを示している。

第 2 章では、配向固定した EGF-His の作用機序について検討している。NSC に作用するさいの固定化 EGF の状態について調査し、配向固定化 EGF-His が、固定化された状態で細胞に作用していることを示した。また、表面に固定された EGF の構造について多重全反射赤外分光法により分析し、配向固定化 EGF-His は生理条件下で構造変化を起こすことなく固定されていることを示した。これらの結果は、神経幹細胞の単層での増殖には、固定化 EGF の構造維持、ならびにキレート結合による安定な固定が重要であることを示している。

第 3 章では、NSC をさらに高効率に増幅できる培養基材の開発を目指し、固定化する EGF キメラ蛋白質の改良による高効率化について検討している。EGF が NSC に作用するさいの EGF-EGF レセプター複合体の 2 量化に着目し、予め二量体を形成した EGF の表

面固定による NSC 増幅の高効率化を検討している。遺伝子工学的手法により、EGF-His 二量体を作製した。この EGF-His 二量体を固定した表面上では、より高効率に神経幹細胞を増幅できることが示されたことから、EGF キメラ蛋白質の精密設計により、NSC をさらに高効率に増幅できる基材を作製することができると結論付けている。

第 4 章から第 6 章を含む第 2 編では、脳内に移植した細胞の生存・増殖・分化を制御できる生体材料を創製するためのキメラ蛋白質の分子設計について述べている。

第 4 章では、パーキンソン病治療を目指した細胞移植に用いる、移植細胞保護材料の開発について検討している。ベース材料としてヒアルロン酸 (HAc) を用い、キメラ蛋白質を固定化できるよう、金属イオンを導入した HAc (Zn-HAc) を合成した。また遺伝子工学的手法を用いて、NSC の生存を促す脳由来神経栄養因子 (BDNF) に His を融合させた BDNF-His、および Zn-HAc の架橋剤として両末端に His を有する CLP を合成した。BDNF-His、CLP、および Zn-HAc を混合し、細胞保護能を付与した HAc ハイドロゲルを作製した。このハイドロゲル中では、BDNF を含まないゲルの場合に比べ、細胞の生存率が有意に高いことが示され、BDNF を組み込んだ HAc ハイドロゲルが移植材料として有望であることを明らかにした。

第 5 章では、複数の増殖因子を組み合わせ、それらの増殖因子の細胞への作用を時間的に制御することのできるキメラ蛋白質の合成を行い、その有用性について調べている。NSC の自己複製を担う EGF、アストロサイトへの分化を促す毛様体由来神経栄養因子 (CNTF)、CNTF の阻害ドメイン、トロンビンによって切断されるアミノ酸配列、基材表面に固定するための His の 5 つの要素を融合した多機能キメラ蛋白質 (MCP) を合成した。MCP 固定化基材上では、NSC が選択的に増殖し、その後のトロンビン処理により、選択的にアストロサイトへ分化した。この結果は、細胞の増殖と分化を高度に制御できるバイオマテリアルの設計が可能であることを示している。

第 6 章では、毛髪の主成分であるケラチンをベースとする移植細胞保護材料の設計に取り組んでいる。遺伝子工学的手法により、細胞接着性ドメインを融合したケラチンキメラ蛋白質を合成し、そのケラチンキメラ蛋白質とヒト毛髪より変性・抽出したケラチンを混合することにより、細胞接着性を有するケラチンハイドロゲルを作製した。そのハイドロゲル上では、NSC が接着・増殖することが示された。変性剤の必要性や生成ゲルの力学的性質など解決すべき課題がみられたものの、移植材料としての細胞接着性ハイドロゲルの設計法に関して重要な基礎的知見が得られた。

概要では、本編において得られた成果を要約している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、中枢神経疾患の再生治療の実現に向けて行われた、高機能性バイオマテリアルの設計に関する研究を2部6章にまとめたものである。

第1部では、神経幹細胞(NSC)を高効率に増幅できる生理活性表面の作製のためのキメラ蛋白質について研究を行った。遺伝子工学的手法を利用して、C末端にオリゴヒスチジン(His)を融合した上皮細胞増殖因子(EGF-His)を合成し、基材表面に導入されたNiイオンとのキレート形成反応を利用して、表面にEGF-Hisを配向固定した培養基材を得た。第1部で明らかになったことを以下にまとめる。

- [1] Niイオンの表面密度を調節することによってEGFの固定量を制御することが可能であった。またNSCを高効率に増幅できる最適なEGF固定量を明らかにした。
- [2] 基材上に配向固定したEGF-Hisの構造および作用機序について検討し、配向固定されたEGF-Hisが活性を保ったまま安定に固定され、固定化状態で細胞と作用していることを見出した。
- [3] 自己二量化能を有するEGFキメラ蛋白質を配向固定することによって、NSCの増幅効率をさらに高めることができることを明らかにした。

第2部では、脳内に移植される細胞の生存・増殖・分化を制御できる高機能性バイオマテリアルの構築を目的として、その構成要素となるキメラ蛋白質の分子設計を行った。第2部で明らかになった点を以下にまとめる。

- [1] 移植細胞の生存率向上のために、神経系細胞の生存を助ける脳由来神経栄養因子含有キメラ蛋白質を組み込んだヒアルロン酸ヒドロゲルを設計し、細胞の生存率を向上させる材料としての可能性を示した。
- [2] NSCの増殖と分化を時空間的に制御できる多機能キメラ蛋白質を設計し、NSCの自己複製とグリア細胞への分化を段階的に制御できることを示した。
- [3] ケラチンに細胞接着性ドメインを融合したキメラ蛋白質を設計し、ケラチンの自己組織化能を利用して、細胞接着性ヒドロゲルを構築した。作製したゲルは、NSCの足場として有効であった。

本論文は、生物学的知見をもとに合理的に設計されたキメラ蛋白質が、中枢神経の再生医療に必要な培養基材ならびに細胞移植材料として有用な生理活性材料を与える構成要素となり得ることを示すものであり、学術的な面だけでなく応用面でも極めて有意義な知見を与える。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20年11月26日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。