

氏 名	お 尾 ぜき 関 まこと 真
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2537 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 高 分 子 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Preparation and Evaluation of Biodegradable Hydrogel for Controlled Release of Hepatocyte Growth Factor (肝細胞増殖因子の徐放化のための生体吸収性ハイドロゲルの設計とその評価)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 畑 泰 彦 教 授 岩 田 博 夫 教 授 瀧 川 敏 算

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、肝細胞増殖因子（HGF）を徐放するためのキャリアとして生体吸収性のゼラチンハイドロゲルを設計し、HGFの生物活性を生体内で効率よく発現させるための方法を論じた結果をまとめたものであって、緒言、本論2編7章、および総括からなっている。

緒言では、細胞増殖因子の徐放の必要性とこれまでに研究された徐放化キャリア材料について概説し、本研究の目的とその背景、および本論文の概要が述べられている。

第1編では、HGFを徐放するための生体吸収性ゼラチンハイドロゲルの設計と作製について検討した結果をまとめている。

第1章では、異なる種類のゼラチンから様々な架橋方法によりゼラチンハイドロゲルを作製し、それらのハイドロゲルの生体吸収性を調べている。ハイドロゲルの架橋の程度の指標として、含水率ならびに引張試験から求めたハイドロゲル内のゼラチン分子の架橋点の数とハイドロゲルの生体吸収性との関連性を検討している。その結果、ゼラチンの種類、架橋方法にかかわらず、ハイドロゲルの生体残存性の時間変化はゼラチン分子の架橋点数によく相関しており、得られた全てのハイドロゲルの生体吸収性がゼラチン分子の架橋点の数に依存していることを明らかにしている。

第2章では、含水率が高く、柔軟なゼラチンハイドロゲルの架橋点の数を引張試験から求めたヤング率と動的粘弾性試験より求めた貯蔵弾性率から評価したところ、両者はよく相関しており、柔軟なハイドロゲルにおいても、その生体吸収性がゼラチン分子の架橋点の数に依存していることを見出している。

第3章では、等電点が5.0である酸性ゼラチンとHGFとの相互作用について検討している。HGFは酸性ゼラチンと混合することにより複合体を形成した。この複合体形成によりHGFの細胞増殖促進効果、およびそのHGF抗体による被認識能が減少したが、HGFの酵素消化抵抗性は高められたことを示している。これらの結果は、複合体中ではHGF分子がゼラチン分子に取り囲まれ、これによってHGFがその細胞表面レセプターおよび抗HGF抗体との相互作用は弱まる一方で、消化酵素によりHGFが攻撃されにくくなることを明らかにしている。

第4章では、HGFあるいはその5アミノ酸欠如変異体（dHGF）と酸性ゼラチンとの相互作用を比較検討している。さらに、酸性ゼラチンと混合前後のHGF、dHGFの抗体認識能を評価している。放射標識したHGF、dHGFを含浸させた酸性ゼラチンハイドロゲルをマウス背部皮下に埋入して、それぞれの残存放射活性の時間変化を比較している。HGFに比べてdHGFはより速くハイドロゲルから放出され、Scatchard結合実験と抗体認識実験から、dHGFは酸性ゼラチンと弱く相互作用していることを見出した。このdHGFとの弱い相互作用が、生体内において酸性ゼラチンハイドロゲルからdHGFが速く放出される原因であることを明らかにしている。

第5章では、酸性ゼラチンからのHGFの徐放特性を検討している。架橋条件の異なるゼラチンハイドロゲルにHGFを含浸させ、マウス背部皮下に埋入したところ、ハイドロゲルの分解とともにHGFは徐放されていることを見出した。また、

ハイドロゲルに含浸された HGF は、同じ投与量の HGF 水溶液より、有意に高い血管新生の誘導効果が見られ、酸性ゼラチンハイドロゲルを用いることで、生体内で生物活性を維持した HGF が徐放できることを明らかにしている。

第 2 編では、ゼラチンハイドロゲルから徐放された HGF およびその変異体の生体内での生物活性を評価している。

第 6 章では、ハイドロゲルから徐放された HGF、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) がマウス背部の毛髪成長に与える影響を調べている。bFGF、HGF、VEGF を含浸させた生体吸収性ハイドロゲルをマウス背部皮下へ埋入したところ、対応する細胞増殖因子の水溶液投与に比べて、有意な毛包サイズの増大と毛髪伸長の促進が認められ、細胞増殖因子の徐放化が毛髪の成長促進に有効であることを示した。

第 7 章では、血管新生抑制活性をもつ HGF の α 鎖部分のタンパク質である NK4 をアニオン化したゼラチンで作製したハイドロゲルから徐放させ、その血管新生抑制効果を検証している。NK4 の *in vivo* 徐放試験より、NK4 残存とハイドロゲル残存の時間変化との間により相関性が見出された。また、アニオン化ゼラチンハイドロゲルからハイドロゲルの分解とともに徐放された NK4 はその血管新生抑制活性を維持していた。これらの結果から、高いアニオン化率をもつゼラチンからなるハイドロゲルは NK4 の徐放化キャリアとして優れていることが認められた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、肝細胞増殖因子 (HGF) の生物活性を生体内で効率よく発現させるために、HGF 徐放化キャリアとしての生体吸収性のゼラチンハイドロゲルの設計と作製したゼラチンハイドロゲルの生体内での評価に関する研究をまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

- 1) 異なるゼラチン、異なる架橋方法により作製したハイドロゲル中のゼラチン分子の架橋点の数を引張試験および動的粘弾性試験から評価した。算出した架橋点の数とハイドロゲルの生体吸収性との間にはよい相関性が認められ、得られた全てのゼラチンハイドロゲルの生体吸収性がゼラチン分子の架橋点の数に依存していることを示した。
- 2) HGF は等電点が 5.0 である酸性ゼラチンと複合体を形成した。複合体中では、HGF はゼラチン分子に取り囲まれることで、HGF 分子と細胞表面レセプター、あるいは HGF 分子とその抗体との相互作用が弱められ、また、酵素が HGF へ攻撃しにくくなることを見いだした。
- 3) 酸性ゼラチンと HGF および HGF の 5 アミノ酸欠損変異体である dHGF との相互作用、およびそれらのゼラチンハイドロゲルからの徐放性について検討した。その結果、dHGF と酸性ゼラチンとの相互作用は、HGF に比べて弱く、生体内では dHGF はゼラチンハイドロゲルから単純拡散により短期間内に放出されることを明らかにした。
- 4) 酸性ゼラチンに含浸させた HGF は、生体内でハイドロゲルの分解とともに徐放された。また、酸性ゼラチンハイドロゲルを用いることにより、生体内で生物活性を維持した HGF を徐放できることを明らかにした。
- 5) 生体吸収性ハイドロゲルを用いて HGF を含む細胞増殖因子をマウス背部皮下で徐放することにより、毛包サイズの増大と毛髪伸長の促進が認められ、HGF の徐放化が毛髪の成長促進に有効であることを示した。
- 6) HGF の α 鎖部分のタンパク質である NK4 は、アニオン化したゼラチンを用いて作製したハイドロゲルから、ハイドロゲルの分解とともに徐放された。生体内で徐放された NK4 はその血管新生抑制活性を維持していた。

以上、本論文はゼラチンハイドロゲルを用いた細胞増殖因子の効率よい徐放化とその応用に関して重要な知見を得たものであり、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 17 年 2 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項についての試問を行った結果、合格と認めた。