

天然多糖の高機能化と医用材料への応用

○阿部康次、長幡 操、寺本 彰、八森 章*
信州大学繊維学部 機能高分子学科、高分子工業研究施設*

1. 緒言

より高次の機能を有する人工臓器として、生体成分と人工材料を組み合わせたハイブリッド型人工臓器、および生体自身の治癒能力を生かした組織再生型人工臓器が挙げられる。前者を実用化するためには、*in vitro*で細胞の機能を制御することが必須の要件となり、後者では生体適合性と共に関細胞の分化・機能発現をより積極的に活性化することが必要となる。*in vivo*における実際の細胞は、細胞外マトリックス (ECM) と呼ばれる巨大な水ゲルに取り囲まれており、増殖、分化、機能発現などを制御している。ECM は各種の高分子電解質 (例えばタンパク質、多糖類、脂質など) の複合体から構成されている。さらに、細胞膜表面や体液中には多くの多糖類が存在し、分子認識や反応の制御などに重要な役割を果たしている。

この様な観点から本研究では、骨再生用基材として生体内で安全かつ生分解性を有する機能性バイオ素材として多糖類に着目し、自然界に大量に存在し、そのほとんどが廃棄物となっているキチン・キトサンを機能化し、医用材料としての応用の可能性を検討した。

2. 実験方法

今回ポリアニオンとして、硫酸化キチン(Sx)、カルボキシルメチルキチン(CMx)、硫酸化カルボ

キシルメチルキチン(SCMx)、リン酸化キチン(PCHNx)、ポリカチオンとしてキトサン (CS) を用いた(x はアニオン性官能基の導入率)。これらを荷電基密度にして当量混合し、沈降法にて組織培養用ディッシュ (TCD) をコーティングして試料とした。骨芽細胞はラット頭頂骨より採取し通常の培養法により培養した。

3. 結果と考察

Fig. 1 に骨芽細胞の増殖曲線を示す。TCD およびコラーゲン (COL) 上で細胞はよく伸展し、ほぼ 10 日程で飽和密度に達する。これに対し、PPEC (PCHN-CS) 上では 4 日目程度、CPEC (CM-CS) 上では初期の段階から、細胞の凝集塊が形成されると同時に増殖が停止する。これは、PEC 中のアニオン性官能基が増殖に大きな影響を与えることを示している。Fig. 2 に、骨系細胞への初期分化マーカーである ALPase 活性を示す。対照群では培養 10 日目前後に増殖が停止した時点から活性が上昇し、CPEC、PPEC 上では細胞が凝集する時点で活性が上昇している。これは、細胞凝集が初期分化段階へ移行していることを示唆している。Fig. 3 に培養 3 日目の ALPase 染色と Ca 染色写真を示す。COL 上では両者ともほとんど染色されないが、PEC 上では凝集塊のみが染色され、上記の考え方を支持している。さらに、Fig. 4 に、終末分化段階の分子マーカーであるオステオカルシン (OC) の m

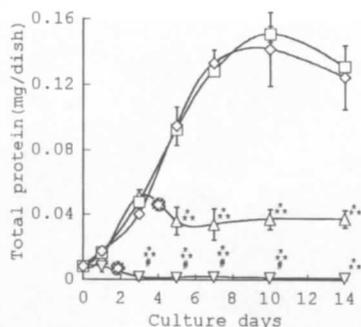


Fig.1 Time-dependently changes of total protein of rOB cultured on several dishes for 14 days; initial points of aggregation

*; P<0.05 (vs. TCD), **; P<0.05 (vs. COL), #; P<0.05 (vs. PPEC)

△ PPEC ▽ CPEC □ TCD ◇ COL

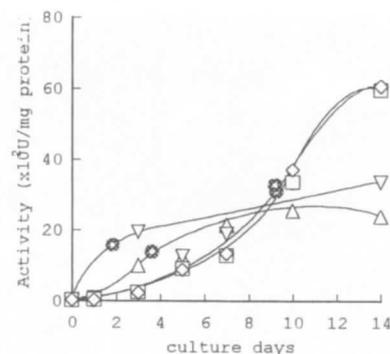


Fig.2 ALPase activity of rOB cultured on several dishes for 14 days; initial points of aggregation

△ PPEC ▽ CPEC □ TCD ◇ COL

RNA を PCR 法により測定した結果を示した。培養1日では OC は発現されていないが、5日目では PEC 上でのみ発現が観測され、骨芽細胞が終末分化段階である石灰化期に誘導されていることが判る。このように、PEC 中のアニオン性官能基の種類や密度を変化させることにより、細胞の増殖や分化を制御できることが明らかになった。この原因についての詳細は不明であるが、PEC と細胞間の非特異的な相互作用の強さ、PEC と血清タンパクの相互作用（硫酸基を含む PEC は接着タンパク質や増殖因子と相互作用しやすい）、細胞と PEC の生理的相互作用、などが関与しているものと考えられる。

4. 結論

上記の結果に加え、

(1) 骨分化能を有する歯根膜細胞 (HPLF) を用いた場合も、同様な結果を得られ、人工歯根の骨への接着を促すことが動物実験により認められている事、

(2) ヒト高分化型と低分化型の口腔扁平上皮ガン由来細胞株を用いた *in vitro* 培養結果より、PEC は細胞間接着に関与する接着タンパク質であるカドヘリンの発現を調節することにより、細胞の凝集を制御すること、などを明らかにしている。いずれの場合も細胞の凝集形成と増殖は相反する現象であり、凝集

が起きることにより、機能分化が起こりやすくなることが明らかとなった。特に、PEC 中のアニオン性官能基の種類や密度が重要な要素の一つとなっている。しかし、細胞も PEC も均一な物質としてとらえることは困難であり、タンパク質の介在を考え併せると、未だ理論的にこれらの現象が解明されたとは考えられず、その著についたばかりである。しかし、*in vivo* の実験も含め、PEC は機能培養用素材としては有用なものであり、さらなる研究を推進していく予定である。

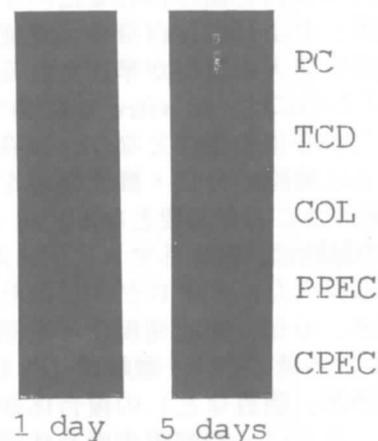


Fig.4 Expression of rat osteocalcin mRNA in rOB cultured for 1day and 5days on several dishes.

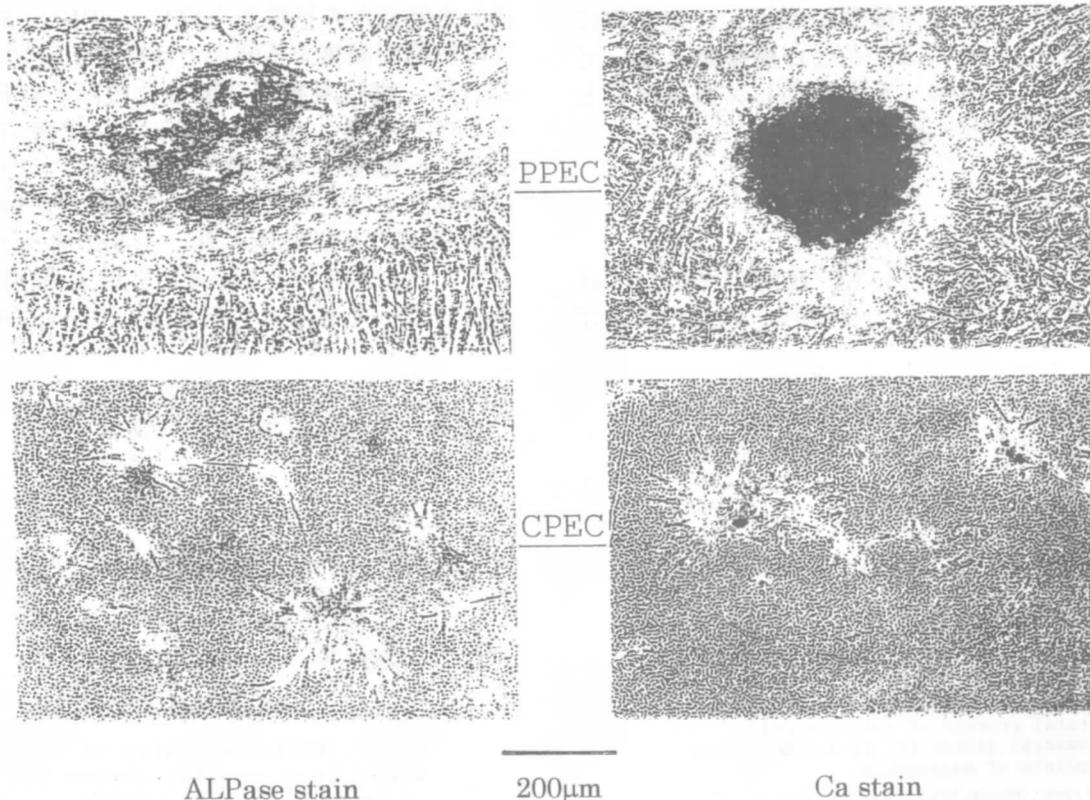


Fig.3 Cell morphologies and stain of ALPase and calcium of rOB cultured for 3days