

学位論文題名

Thiolation of Chitosan. Attachment of Proteins via Thioether Formation

(キトサンのチオール化。チオエーテル結合によるタンパク質の付加)

学位論文内容の要旨

導入：キトサンは 2 番目に多く存在する糖であるキチンより精製され、また一部の生物にも存在する天然多糖である。キトサンは抗菌作用、抗ウイルス作用、抗コレステロール作用、免疫賦活作用が報告されている。

キトサンが有するアミノ基、ヒドロキシル基は種々の化学反応を可能にし、抗腫瘍剤、抗凝固剤などの他、種々のペプチド、コラーゲン、蛍光物質を導入することも可能である。さらに、キトサンはドラックデリバリーシステムの材料としても使用されており、DNA、抗腫瘍剤、タウリン、インシュリンなどの徐放化にも応用されている。キトサンの応用形態としては、フィルム、繊維、スポンジ、ポーラス、ゲル、チューブ、マイクロカプセル、ナノパーティクルなどが挙げられる。

キトサンは biocompatible、biodegradable であり、low toxicity であると報告されており、再生医療用の材料として、肝臓、神経、軟骨、皮膚などの組織への応用が試みられており、皮膚への応用に至っては「Tegasorb」として発売されており、臨床段階にある。

我々はキトサンに 2-イミノチオランを反応させることにより、チオ基を導入し、これをマレイミド基を導入した BSA (bovine serum albumin) と反応させることにより、キトサンに BSA を化学的に導入することに成功した。BSA はタンパク質のモデルとして選択した。この BSA に変わり、細胞増殖因子、細胞接着分子などの生理活性物質をキトサンに導入することが可能である。本報告は、再生医療用の材料として、生理活性物質等を組み込んだ新しい種類の材料の開発に応用可能である。

実験方法：キトサンと 2-イミノチオランの反応の至適化

2-イミノチオランはキトサンのアミノ基と反応することによりキトサンにチオ基を導入することが可能である (Chitosan-SH) (Scheme 1)。この反応の最適 pH、反応時間、反応温度を評価した。

I) pH: キトサン 60mg を 10ml の phosphate バッファーに懸濁させた。バッファーは 3 種類の pH (6.0、7.0、8.0) を使用した。この懸濁液 100 μ l を 25mg の 2-イミノチオラン、200 μ l の 2% ジチオスレイトールを混ぜ、60°C にて 6 時間反応させた。反応結果としてチオ基を「Ellman' method」で評価した。

II) 反応温度: 45~65°C の範囲で反応温度を振り、各々の反応結果を評価した。他の条件は I) と同一である。

III) 反応時間: 6~10 時間の範囲で反応時間を振り、各々の反応結果を評価した。他の条件は I) と同一である。

結果:

反応条件の最適化：初期の反応液は懸濁しているが時間の経過と共に清明になっていった。pH7.0にて最も高い反応効率(19.0%)が確認された。Fig. 1は反応液をゲル濾過にて分離精製し、Ellman's methodにてチオ基を評価した結果である。Fig. 2より最適反応温度は50~55℃である。4時間におけるチオ基の導入効率は17.1%であり、6時間、10時間はそれぞれ18.2%、20.2%であった。4~10時間が最適であると考えられる。さらに0~4時間における反応結果を懸濁度(650nmの吸光度を測定)にて評価した。反応1時間以内に懸濁度は著しく減少し、その懸濁度が4時間まで維持されていた。

最適条件による反応液をゲル濾過し、Ellman's methodにて評価した結果がFig. 3である。反応効率は19.3%である。

次にBSAにマレイミド基を導入するため、BSAとSulfo-EMCSの反応を行った(MalN-BSA)(Scheme 2)。1mgのBSAと0.4、1.0、2.0、4.0mgのSulfo-EMCSを20~22℃にて2時間、遮光下にて反応させた。反応液はゲル濾過にて分離精製した。反応効率は、マレイミド基が300nmを吸収することを利用し評価した(Fig. 4)。0.4、1.0、2.0、4.0mgのSulfo-EMCSを使用した際の反応効率は、各々、12.8、23.6、31.2、36.8%であった(Fig. 5)。

1mlのChitosan-SH(チオ基は244neq)とMalN-BSA(マレイミド基は92.8neq)の反応を20~22℃にて3時間、遮光下にて行った(Chitosan-S-BSA)(Scheme 3)。反応液はゲル濾過にて分離精製(Fig. 6)し、Ellman's methodと280nmにおける吸光度にて評価し、反応効率は97.8%であった。

未反応のチオ基の失活させるため、この反応物質をbromoacetamideと2時間37℃にて反応させた(Scheme 4)。ゲル濾過にて分離精製し、Ellman's methodにて評価した結果、78.8%のチオ基が失活していた。

考察：

本報告では500kDaのキトサンを使用している。より低分子のキトサンはより反応、精製しやすい反面、機械的強度が低下する。再生医療等にこの方法を応用することを考え、我々は500kDaという高い分子量のキトサンを用いて実験を行った。

キトサンと2-イミノチオランの反応は、Bernkop-Schnürchらが報告しているが、この報告における反応条件は、0.14%のキトサン溶液(酢酸に溶解)、室温、24時間であり、結果8.2%の反応効率しか得られていない。また、精製のため透析を用い、長時間を要している。我々は約20%の反応効率を得ているが、これは、キトサンの懸濁液を使用、55℃という高い反応温度、より多量の2-イミノチオランを使用していることによると思われる。また、精製法としてゲル濾過法を使用し、短時間で分離精製することは、時間の経過と共に失活していくチオ基に対しては、かなり重要であると思われる。

我々は本論文にて、キトサンにタンパク質を導入する手法を報告した。この方法は細胞増殖因子、細胞接着分子、細胞外マトリックスなど他の生理活性物質の導入にも応用可能であるため、再生医療用のマテリアルを作製する手法にも応用可能であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Thiolation of Chitosan. Attachment of Proteins via Thioether Formation

(キトサンのチオール化。チオエーテル結合によるタンパク質の付加)

軟骨組織は修復能力が低いため、軟骨変性は臨床治療において大きな問題となっている。これに対し、近年、再生医療を応用し、軟骨再生に向けて研究が進められている。われわれは再生医療の triad のうち、scaffold に焦点を当て、これに生理活性物質を導入することを考案した。

基本となる物質にはキトサンを選択し、生理活性物質のモデルとして、BSA (bovine serum albumin) を選択した。キトサンは当科の岩崎らが既に報告しているように、繊維形体にすることが可能であり、また、山根ら、船越らが報告しているように軟骨細胞、線維芽細胞を増殖させることが可能である。また、キトサンはアミノ基を有するため、様々な生理活性物質を化学的に導入することが可能である。これは数多くある多糖のうち、キトサンだけが有する性質である。

キトサンに生理活性物質を導入する手法には、共有結合、ポリイオンコンプレックスを用いる手法、埋入・混入による手法が考えられる。共有結合は反応に専門知識が不可欠であるが、安定性が高く、また徐放化等の制御が可能であることより、大いに発展性が期待されるため、この共有結合を用い、新規の scaffold を作成することとした。

生理活性物質を共有結合により導入された scaffold は、細胞外マトリックスに生理活性物質を保持している生体の軟骨組織と非常に類似しているため、この新規の scaffold は既存の scaffold に比較し、より生理的であり、理想的であると考えられる。

実際の化学反応は以下のようなものである。まず、キトサンと 2-イミノチオランの反応 (chitosan-SH) を至適化するために、最適 pH、反応時間、反応温度を評価した。pH 7.0、7 時間、温度 55°C が至適であった。至適条件における反応効率は 19.3%であった。

次に BSA にマレイミド基を導入した (MalN-BSA)。反応効率は、マレイミ

ド基が 300nm を吸収することを利用し評価した。0.4、1.0、2.0、4.0mg の Sulfo-EMCS を使用した際の反応効率は、各々、12.8、23.6、31.2、36.8%であった。

Chitosan-SH と MalN-BSA の反応を 20~22℃にて 3 時間、遮光下にて行った (Chitosan-S-BSA)。反応効率は 97.8%であった。

未反応のチオ基の失活させるため、この反応物質を bromoacetamide と 2 時間 37℃にて反応させた。78.8%のチオ基が失活していた。

キトサンと 2-イミノチオランの反応は、Bernkop-Schnürch らが報告しているが、この報告における反応効率は 8.2%しか得られていない。また、精製のため透析を用い、長時間を要している。我々は約 20%の反応効率を得ているが、これは、キトサンの懸濁液を使用、55℃という高い反応温度、より多量の 2-イミノチランを使用していることによると思われる。また、精製法としてゲル濾過法を使用し、短時間で分離精製することは、時間の経過と共に失活していくチオ基に対しては、かなり重要であると思われる。

本報告により、キトサンに BSA を共有結合を用いて化学的に導入する手法を確立することができた。今後は BSA にかわり他の生理活性物質(細胞増殖因子、細胞接着分子)に応用していく予定であり、その後、*in vitro*、*in vivo*による評価を行う予定であると報告された。

審査にあたり、三浪明男教授から、BSA 以外の生理活性物質、bFGF などを結合させることが可能かどうかについて、生理活性物質を結合させる際に方向性を与えられるかどうかについて、反応効率の向上について質問があった。清水宏教授からは、キトサンをターゲットにする意義、キトサンとイミノチオランを反応させる際に 10 時間以上を考慮しなかった理由、適正 pH について、bFGF など他の生理活性物質を結合させる際の反応条件の相違について、この scaffold 材料の徐放化について、大量生産にする場合について質問があった。安田和則教授からは、徐放化を考慮した場合の共有結合とポリオンコンプレックスの違いについて、BSA を結合させる利点について、キトサンの生体での分解性について、今後の形体についての質問があり、これらの質問に対して今回行った実験結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

この論文は再生医療における新規の scaffold 作成法を新たに開発したものであり、今後この方法を応用し様々な生理活性物質を有する scaffold の作成が可能になると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。