

組織特異的な作用を有する機能性キトサン膜の創製

野水 基義 [北海道大学大学院地球環境科学研究科/助教授]

坂入 信夫 [北海道大学大学院地球環境科学研究科/教授]

大塚 隼人 [北海道三井化学(株)/取締役企画・技術部長]

背景・目的

これまでに我々はカニ殻など廃棄されている資源から得られる高分子多糖・キトサンに細胞特異的に作用する機能を付加することで、再生医学の分野などで幅広い応用が可能な機能性キトサン膜の開発を行ってきた。本研究では、我々が開発したラミニンの生物活性ペプチドを付加した機能性キトサン膜を細胞生物学的及び高分子化学的手法を用いてさらに発展させ、細胞や組織に対し特異的な作用と組織再生に際し最適なキトサン膜の物理化学的機能を付加して実際の医療に応用可能な機能性膜(人工基底膜)を創製することを目的としている。

内容・方法

合成ペプチドをキトサン膜に化学的に結合させるために、キトサンにあらかじめ二価官能性試薬MBSを導入し、MBS-キトサン膜を作成した。ラミニン由来の生物活性を有するペプチドはマニュアルFmoc固相合成法で合成しHPLCで精製した。すべてのペプチドのN末端にはキトサンのMBSとの結合のためのシステインを付加させ、スパーサーとしてグリシンを2残基付加させた。ペプチド-キトサン膜の生物活性は、ヒト皮膚由来の線維芽細胞を用いた細胞接着活性アッセイと、神経系細胞を用いた神経突起伸長アッセイを行って評価した。MBS修飾キトサンをプレートにコートして膜を作成した後、ペプチドを加えアルカリ処理をして化学的にペプチドをキトサン膜に結合させてペプチド-キトサン膜を作成した。そこに線維芽細胞を加えて無血清状態で2時間インキュベートし、細胞の接着活性の評価を行った。神経突起伸長の促進活性の測定は、アッセイの24時間前に神経成長因子NGF(100 ng/ml)を加えることによりあらかじめ活性化させた神経系細胞(PC12細胞)をペプチド-キトサン膜に加え、24時間インキュベートすることにより行った。

結果・成果

細胞接着・創傷治癒・神経突起伸張といった組織再生に必要な生物活性を有する基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンの生物活性部位(A13:RQVFQVAYIIK A, A99:AGTFALRGDNPQG, AG73:RKRLQVQLSIRT, C16:KAFDITYVRLKF)をキトサン膜に付加することでキトサン膜に細胞や組織に対する特異的な作用や組織再生に最適な作用を持たせ、実際に応用可能な機能性膜の創製を目指した。まずペプチド-キトサン膜のヒト線維芽細胞への直接的な作用を確かめた。様々な濃度のペプチドをキトサン膜に固定化させたペプチド-キトサン膜上での細胞の接着活性を検討した

結果、ペプチドを付加していないキトサン膜上では細胞は接着しなかったのに対し、ペプチド-キトサン膜上ではペプチドの濃度に依存して細胞が接着することがわかった。また、ペプチドの種類が異なると細胞の接着形態が異なることがわかった。A99-キトサン膜上では、細胞の伸展が見られた。AG73-キトサン膜上では細胞は、強い接着に加え星状の伸展をした。A13-やC16-キトサン膜上では、細胞はこれらの中間の形態を示した。細胞形態の違いを詳しくみるためにA99とAG73に注目し、A99、AG73-キトサン膜上に接着した細胞の細胞骨格を調べたところ、A99-キトサン膜上では細胞全体にアクチンストレスファイバーが観察された。一方AG73-キトサン膜上では星状のラフリングが見られ、A99-キトサン膜のようなストレスファイバーの形成は見られなかった。また、A99は細胞膜上のレセプターであるインテグリンを介して、AG73はシンデカンを介して細胞に作用し、それによって細胞接着の形態が異なってくることがわかった。これらの結果からキトサン膜上のペプチドが細胞膜上のレセプターに特異的に作用し、細胞の接着及び形態をコントロールしていることが明らかとなった。

そこでA99とAG73を用いて、複数のレセプターを介したより強い細胞接着活性をもつペプチド-キトサン膜の調製を試みた。A99とAG73の比率を変えて同じキトサン膜上に固定化し細胞形態への影響を調べた。結果、異なるレセプターをもつペプチドがキトサン膜上で協調的に細胞に作用することが確認され、細胞が最も強く接着し伸展する比率を明らかにすることができた。このことからペプチドを組み合わせることで強い細胞接着活性をもつペプチド-キトサン膜の調製が可能になった。次に細胞接着だけでなく細胞の分化に対する作用を調べるため、神経系細胞を用いたペプチド-キトサン膜の神経突起伸長活性を調べたところ、強い神経突起伸長活性が確認された。さらに固定化するペプチドによって神経突起の形態が異なることが分かった。このようにペプチドを固定化することによって神経突起伸長を促進するような機能をキトサン膜に持たせることが可能になった。以上の結果から、ペプチド-キトサン膜は直接細胞に働きかけて接着する機能をもち、細胞の分化も促進できることが明らかになった。このような活性ペプチドを固定化したペプチド-キトサン膜は、将来組織工学や再生医学をめざした人工基底膜の創製につながると考えられる。

今後の展望

本研究において、活性ペプチドをキトサン膜に付加した機能性キトサン膜の医用材料への実用化の可能性を示すことができた。本研究の一部は、米国分子生物学生化学誌「The FASEB Journal」に掲載されたとともに、本誌の2003年5月号の表紙を飾ることができた。今後、(1)実際の動物実験に用いることのできるペプチド-キトサン膜の調製、(2)ペプチド-キトサン膜の創傷治癒などに対する効果、などの検討を行い、ペプチド-キトサン膜の再生医学や組織工学分野への応用を検討する予定である。