

## 学位論文の要旨

氏名

仮屋博敬

学位論文題目

カルボキシメチルキチンの生理活性解析

本論文は、高分子化合物カルボキシメチルキチンによる生体への生理活性機能に関してまとめたものである。

Section 1 では、関節へのカルボキシメチルキチンの補填により軟骨様組織の形成が観察されたという事実を基に、マウス腹腔内におけるカルボキシメチルキチン (CM-chitin) の反応性について検討し、CM-chitin の刺激により腹腔内細胞から炎症性サイトカインが誘導され、さらに成長因子である TGF- $\beta$ 1 が誘導される事を明らかにした。

Section 2 では、CM-chitin の刺激により腹腔内細胞から誘導された TGF- $\beta$ 1 が、実際に軟骨形成の促進に寄与するかどうかを調べるため、*in vitro* での軟骨様組織形成について検討した。CM-chitin 刺激を加えた腹腔内細胞の上清を用いて、多分化全能性細胞による micromass culture を行ったところ、*in vitro* での軟骨用組織形成が RNA 発現及びタンパク発現レベルで観察された。それにより、CM-chitin が軟骨用組織形成に寄与していることを明らかにした。

Section 3 では、CM-chitin のマクロファージ活性化による殺菌活性の向上について検討した。ここでは、CM-chitin による免疫細胞の誘導、活性化されたマクロファージによる貪食作用と殺菌性物質の測定、及び実際に殺菌効果が向上するかどうかについての実験を行った。その結果、CM-chitin はマウス腹腔内で多量の貪食細胞を誘導し、マクロファージの貪食作用・殺菌性物質産生を高め、殺菌能力を向上させることを明らかにした。

Section 4 では Section 1-3 総括し、本研究で得られた CM-chitin の生理的特性と今後の展望についてまとめた。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第349号	氏名	仮屋 博敬
審査委員	主査	橋本 雅仁	
	副査	隅田 泰生	門川 淳一
<p>学位論文題目      Analysis of physiological activity of carboxymethyl-chitin. (カルボキシメチルキチンの生理活性解析)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、高分子化合物カルボキシメチルキチンが持つ生理活性機能の解析に関して述べたもので、全5章より構成されている。</p> <p>第一章では、序論として本研究の意義とこれを行う背景について述べた。</p> <p>第二章ではまず、関節へのカルボキシメチルキチンの補填により軟骨様組織の形成が観察されたという以前の研究を基に、マウスの <i>in vivo</i> 細胞に対するカルボキシメチルキチン (CM-chitin) の反応性について検討した。マウス腹腔内滲出細胞を CM-chitin で刺激することにより、細胞から炎症性サイトカインが誘導され、さらに成長因子である TGF-<math>\beta</math>1 が誘導される事を明らかにした。さらに、TGF-<math>\beta</math>1 を誘導するのは特定の単核細胞に属する細胞である事を示した。</p> <p>第三章では、CM-chitin の刺激によって腹腔内滲出細胞から誘導された TGF-<math>\beta</math>1 が、実際に軟骨形成の促進に寄与するかどうかを調べる実験を行った。軟骨形成の判定は、マウス多能性繊維芽細胞である C3H10T1/2 を用いて <i>in vitro</i> micromass culture を行い、その遺伝子発現と軟骨マトリクスの形成を調査することで行った。実験の結果、CM-chitin によって誘導した TGF-<math>\beta</math>1 を含む培地では、市販の精製 TGF-<math>\beta</math>1 を含んだ培地と同様、軟骨形成関連遺伝子の発現が向上し、また軟骨マトリクスが産生される事が確認された。これにより、CM-chitin が軟骨様組織の形成に寄与していることを明らかにした。</p> <p>第四章では、CM-chitin のマクロファージ活性化による殺菌活性の向上について検討した。ここでは、CM-chitin による免疫細胞の誘導、活性化されたマクロファージによる食食作用と殺菌性物質の測定、及び実際に殺菌効果が向上するかどうかについての実験を行った。その結果、CM-chitin を投与したマウスの腹腔内では免疫細胞誘導に関わる2種類のケモカインが増加し、その結果マクロファージ・好中球等の食食細胞が多数誘導される事が分かった。次にマクロファージ・好中球の食食作用を測定することにより、CM-chitin 刺激によって特にマクロファージの食食能力が向上する事が分かった。また、CM-chitin で刺激したマクロファージ中では一酸化窒素・活性酸素等の殺菌性物質の産生が高まる事が分かった。さらに、マクロファージと細菌を共培養する実験を行う事により、CM-chitin 刺激したマクロファージ内では細菌の致死率が増加する事が分かった。これらの実験により、CM-chitin は免疫細胞を活性化することで殺菌作用を高めることが示唆された。</p> <p>第五章では本研究で得られた成果を述べるとともに、バイオマテリアルや免疫刺激因子としての Chitin の生理的特性について述べた。</p> <p>以上本論文は、高分子化合物 CM-chitin が軟骨組織形成に及ぼす効果を検証するとともに、CM-chitin の免疫活性化作用について総合的に検討したものである。これは、再生医療分野におけるバイオマテリアル開発の発展に大きく寄与する。</p> <p>よって、審査委員会は博士 (工学) の学位論文として合格と判定する。</p>			

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第349号	氏名	仮屋 博敬
審査委員	主査	橋本 雅仁	
	副査	隅田 泰生	門川 淳一
<p>平成 23年 2月 7日 13:00 から行われた学位論文発表会において、審査委員を含む参加者の前で学位論文の内容が説明された後、以下に示すような質疑応答が行われ、的確な回答がなされた。</p> <p>[質問1] 使用している CM-chitin 中で CM 基の位置が 6-O 部位であるとしているが、その根拠は？  [回答1] 13C-NMR の結果から、GlcNAc の2位、3位、6位にそれぞれCM 基が付加したピークが認められるが、相対的に6位の割合が多いため、6-O-CM を主成分とする CM-chitin と考えた。</p> <p>[質問2] soluble-type CM-chitin と gel-type CM-chitin の主な違いは何か？また、細胞に対する soluble-type と gel-type の作用効率の違いはどこで判断したのか？  [回答2] 脱水縮合によって soluble-type の分子間が架橋されたものが gel-type で、soluble-type と比較すると溶けにくく、遅効性である。作用効率の違いは、実験1で単核球細胞に対する効果を調べた際、gel-type が5倍程度反応性が高い事が分かった。そのため、以降では gel-type のみを使用した。</p> <p>[質問3] その分子間架橋の程度は操作によって調節可能なのか？  [回答3] 真空減圧高温 (140°C) 下で長時間加熱する事によって分子間架橋を形成させるため、この温度や時間を変化させる事で調節可能であり、すでにデータも得られている。</p> <p>[質問4] soluble-type と gel-type では後者の方が反応性が高く、また加工しやすいため応用化に適していると考えられるが、その2つの作用機構は同一と言えるのか？  [回答4] soluble-type ・ gel-type はともに、生体内で初期の炎症反応と、それに続く成長因子の増加を誘導した。gel-type は難溶性であるが、時間とともに溶出する soluble-type と類似の成分が反応誘導の引き金になっていると考えており、基本的に細胞上のレセプターは同じではないかと考えている。ただ、gel-type では貪食細胞の phagocytosis を介した刺激も起こると考えられ、これが反応性の違いに起因している可能性が考えられる。</p> <p>[質問5] 実験2・実験3では gel-type のみを使用して実験を行っているが、これを soluble-type で行うとまた異なる結果になるのではないのか？  [回答5] soluble-type では phagocytosis による刺激が期待されないため、その可能性は高いと考えられる。</p> <p>[質問6] マウス腹腔内に gel-type CM-chitin を投与した際、細胞を誘導するケモカインの産生はどの細胞によって行われているのか？  [質問6] CM-chitin 刺激時、マクロファージを誘導する MCP1 と好中球を誘導する KC の2つのケモカインが産生されることが分かったが、これらはオートクリンとともにパラクリンによっても分泌され、産生する細胞が複数存在することから、今回の実験では特定できなかった。</p> <p>[質問7] 生体内での CM-chitin の主な分解機構は何か？また gel-type の架橋は分解に影響するか？  [回答7] CM-chitin は主に体内の lysozyme で分解される。gel-type も体内投与から 72 h 後には分解されて概ね溶けているため、脱水縮合による分子間架橋は lysozyme 感受性に影響しにくいと考えられる。</p> <p>[質問8] CM-chitin の食用による免疫活性効果は期待できるか？また、今回述べられている再生医療への応用以外に、CM-chitin はどのようなマテリアルとして応用できると考えられるか？  [回答8] <math>\beta</math>-グルカンのように小腸のパイエル板を介した免疫活性効果については、現時点では不明である。また、CM-chitin は GlcNAc を主成分とする糖鎖高分子であるため、細菌やウイルス表面上の糖鎖結合部位を利用して、これらの病原体をトラップする担体として使用できる可能性がある。</p> <p>以上から審査委員会では、申請者が博士課程の修了者としての学力並びに見識を有するものと認め、博士 (工学) の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。</p>			