< 総 説 >

(受理：平成 27 年 5 月 15 日)

デンドリマーの表面改質による細胞・組織接着制御 Control of Cell and Tissue Adhesion by Surface Modification of Dendrimers

児島 千恵*
Chie KOJIMA

1. はじめに

著者は、機能性のバイオマテリアルの創製をメインに行っている研究者である。本誌名である「Adhesion」は、バイオ分野では cell adhesion（細胞接着：細胞が他の細胞や基材に接着すること）、focal adhesion（接着斑：細胞と基材の接着点でみられる蛋白質の集積構造）などで頻繁に使用されている耳なじみの言葉であるが、日本接着学会に所属しておられる多くの方は、非バイオの分野で研究されているであろうと思われる。本稿では、生体分野における接着制御の意義やその手法に関して、著者が行ってきた研究を中心に紹介させていただこうと思う。

2. デンドリマー

著者は、デンドリマーという合成高分子の表面を加工することで様々な機能性バイオマテリアルを作製してきた。デンドリマーは特徴的な高分子化合物であり、機能性材料として様々な研究が行われている。デンドリマー¹⁻³⁾は、核となるコア分子から段階的に世代数を増加させていくことによって分岐鎖を成長させていくため、合成高分子であるにも関わらず分子量が単一である。また、その末端に存在する多数の反応性官能基や内部空間を利用して、様々な機能性物質および生理活性物質を共有結合もしくは非共有結合を介して付与することができる（図 1）。市販されているポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーの世代数と粒径および末端官能基数の関係³⁾を表 1 に示す。世代数が増加するにつれて末端数は二倍に増加する。ま

図 1 デンドリマー

た、分子量も約二倍となり、粒径は 1nm 程度増加する。このように構造やサイズを精密に制御できるデンドリマーはドラッグデリバリーシステム（DDS）やイメージングなどのナノメディシン²⁻⁶⁾に利用することができる。DDS 分野において、用いる材料と細胞や組織との接着制御は極めて重要である。すなわち、標的となる細胞や組織には接着して、取り込まれる必要があるが、それ以外の細胞や組織との接着は副作用の原因となるため、阻害しなければならない。これを実現するためには、標的細胞・標的組織を的確に認識して、応答するシステムを組み込むことが必要である。本稿では、デンドリマーと細胞や組織との

児島 千恵

略歴：修士（工学）（大阪府立大学）と博士（生命科学）（京都大学）を取得。2005年 大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野助手に着任，テニユア・トラック講師を経て，2014年から同准教授
モットーは「好きこそモノの上手なれ」。現在、子育てと研究の両立に奮闘中です。

* 大阪府立大学大学院工学研究科
大阪府堺市中区学園町 1-1 〒599-8531
Department of Applied Chemistry, Graduate School
Engineering, Osaka Prefecture University
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

表1 PAMAM デンドリマーの世代数増加の影響

世代	末端基数	分子量 (Da)	粒径 (nm)
G 0	4	5 1 7	1.5
G 1	8	1, 4 3 0	2.2
G 2	16	3, 2 5 6	2.9
G 3	32	6, 9 0 9	3.6
G 4	64	14, 2 1 5	4.5
G 5	128	28, 8 2 6	5.4
G 6	256	58, 0 4 8	6.7
G 7	512	116, 4 9 3	8.1

相互作用について記載し、その相互作用を制御するためのデンドリマーの表面改質に関する研究成果について紹介する。

3. デンドリマーと細胞・組織との相互作用

細胞の最外層は脂質と蛋白質によって形成される細胞膜である。細胞膜の外側にある脂質や蛋白質には負電荷をもつ糖鎖が結合しているため、細胞は負電荷を帯びている。したがって、正電荷を帯びているナノ粒子は細胞表面に非特異的に吸着する⁷⁾ことが知られている。これは、デンドリマーにおいても同様であり、アミノ末端のデンドリマーは細胞と相互作用しやすいこと⁸⁾が報告されている。しかし、このようなアミノ末端のデンドリマーは細胞と相互作用しやすい一方でその毒性も強い。さらに、非特異的な相互作用であるため、目的の細胞への選択的な取り込みを実現することはできない。また、血中に存在するアルブミンなどの負電荷の蛋白質と凝集体を形成してしまい、単一分子として機能しないことが懸念される。

培養ディッシュ上で行う細胞レベルの実験 (in vitro 実験) では、デンドリマーと細胞との相互作用について考慮するだけでよいが、モデル動物を用いた実験 (in vivo 実験) では、細胞との接着だけでなく、その体内分布や組織浸透性についても考慮する必要がある。デンドリマーの体内分布はその投与方法によって大きく異なる。投与方法としては、経口投与、経皮投与、静脈投与、皮下投与などがある。経口投与や経皮投与は自宅で簡便に投与できる方法であるが、皮膚や消化器官から血液へと移行し、患部に到達して初めて生理機能を発現する。それぞれの移行段階でロスが生じるため、多量の薬剤を投与する必要がある。抗ガン剤は副作用が極めて強いいため、その多くは直接血液に注入する静脈投与が適用される。静脈投与の場合、薬物運搬体は血管壁を透過して、患部組織の内部にまで浸透する

図2 EPR効果

必要がある。血中滞留性の高い高分子化合物がガン組織に集積する現象が知られており、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果^{7,9)}と呼ばれている。これは、腫瘍が成長する際に形成される新生血管の血管壁が通常の血管壁よりも漏洩しやすいこと (図2)、ガン組織の周辺には物質の排泄機構であるリンパ管が発達しにくいことに起因している。また、最近の研究より、ガン組織の深部にまで到達するには、粒径の小さい50nm程度のナノ粒子が有用であること¹⁰⁾が明らかとなった。また、様々な世代数のデンドリマーを用いた研究から4nm程度以下のデンドリマーは腫瘍部分には集積しないが、それ以上の粒径のデンドリマーは腫瘍部分に集積すること¹¹⁾が報告されている。リポソームやエマルションなどの粒径は一般に100nm程度から数 μm であるが、デンドリマーは数nmの粒子であるため、高い組織浸透性を有し、ガン組織の内部にまで到達することができると考えられる。したがって、分子量が単一であるデンドリマーは、その分子量制御によってガン組織への標的指向性や高い組織浸透性を付与することができるため、ガン治療のための薬物運搬体として有用である。しかし、上記に記載したカチオン性のアミノ末端デンドリマーは、非特異的に細胞と相互作用するため、目的の組織に到達する前に、他の細胞に捕捉されてしまう。したがって、細胞や組織との接着を精密に制御するデンドリマーの設計が不可欠である。

4. ポリエチレングリコール (PEG) 修飾デンドリマー

4.1 PEG修飾による非特異吸着の抑制

ポリエチレングリコール (PEG) は高い水溶性と排除体積効果、そして生体適合性を有する高分子である。ナノ粒子にPEGを修飾することによって、様々な蛋白質や細胞との非特異的な吸着を抑制できること^{7,12)}が知られている。したがって、PEG修飾デンドリマーは薬物運搬体として有用である。そこで、我々はPEGモノメチルエーテル (2kDa) の水酸基にクロロギ酸-4-ニトロフェニルを反応させることでアミノ基に反応するPEGを合成した。続いて、これを第4世代 (G4) のPAMAMデンドリマーの末端アミノ基に反応させた。NMR解析により、デンドリマー

図3 PEG デンドリマーに内包される様々な物質

図4 血中に投与したPEG修飾デンドリマー(A)とPEG未修飾デンドリマー(B)の体内動態

の全ての末端にPEGが結合できたこと¹³⁾がわかった。さらに、図3に示すような様々な生理活性物質を担持したPEG修飾デンドリマー^{13~16)}を作製することができた。また、PEG未修飾デンドリマーを血中に投与すると、腎臓への集積が見られたのに対して、PEG修飾デンドリマーを血中に投与すると、血液に残存する傾向が見られた(図4)。このように、デンドリマーへのPEG導入によって、血中滞留性が著しく向上したこと¹⁷⁾がわかった。上記のとおり、ガン治療においては、血中滞留性が高い高分子化合物はEPR効果によってガン組織への集積が期待されるため、PEG修飾デンドリマーはガン治療のための薬物運搬体として有用である。

4.2 PEG修飾デンドリマーの標的細胞への接着

上記のとおり、PEG修飾デンドリマーは細胞や蛋白質との非特異的な吸着を抑制することができるため、その血中滞留性を向上させることができる。しかし、同時に標的細胞との吸着も抑制されてしまうため、細胞の取り込みも低下してしまう。この現象はPEGジレンマ¹⁸⁾と言われている。これを解決するためには、標的分子と特異的に結合するリガンドの導入が有効である。例えば、ガン細胞はトランスフェリンという蛋白質を取り込むことができるトランスフェリンレセプター(受容体)を多く発現している。したがって、トランスフェリンを結合したPEG修飾デンドリマーはガン細胞に効果的に取り込まれることが期待される。Huangら¹⁹⁾はこのようなデンドリマーを作製し、ガン細胞への高効率なデリバリー効果を示した。トランスフェリンの分子量は80kDaであり、一般的なデンドリマーの分子量と同程度かそれよりも大きい(表1)。したがって、デンドリマーの表面に結合するには低分子リガンドの方が適している。そこで、Hanら²⁰⁾はトランスフェリンレセプターに結合するペプチドを結合したPEG修飾デンドリマーを作製し、トランスフェリンを高発現しているガン細胞への選択的なデリバリーを示した。一方、葉酸と結合する葉酸レセプターもある種のガン細胞で高発現していることが知られており、葉酸もガン細胞のリガンドとして用いることができる。Singhら²¹⁾は葉酸を結合したPEG修飾デンドリマーを作製し、葉酸レセプターを高発現しているMCF7細胞に対する選択的なデリバリーに成功した。以上のように、PEG修飾デンドリマーに適切なリガンドを付与することで、非特異的な吸着を抑制し、標的細胞に対する選択的なデリバリーを実現することができる。

5. 温度応答性デンドリマー

何らかの刺激に応答する刺激応答性材料は、患部に運搬

図5 様々な温度応答性デンドリマー

体を集積させたり、患部において選択的に薬物を放出するシステムの構築に利用することができる。ヒトの体温は37℃程度の定温であるため、ハイパーサーミアと呼ばれる装置を用いて局所的に加温することで、体内での温度分布を生じさせることができる。このため、DDS分野では様々な温度応答性ナノ粒子に関する研究^{7, 22)}が行われている。本節では、温度応答性デンドリマーの設計とそのバイオ応用について紹介する。

5.1 温度応答性デンドリマーの設計

温度応答性高分子の代表例としてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (poly(NIPAM)) が知られている。木村ら²³⁾はデンドリマーの末端を開始点として重合により poly(NIPAM) を導入することにより、温度応答性デンドリマーの作製を行った。一方、河野らのグループでは poly(NIPAM) の部分構造である NIPAM 基をデンドリマーの末端に導入するだけで温度応答性デンドリマーを作製できる²⁴⁾ことを明らかにした。温度応答性高分子はポリマー鎖に結合した水分子の脱水和が駆動力として作用することが知られているが、興味深いことに、上記の NIPAM 化デンドリマーでは相転移温度付近での大きな脱水和は観察されなかった。また、デンドリマーに結合させる温度応答性部位の構造を変化させることで、温度応答性デンドリマーの相転移温度を変化させることができた²⁵⁾。これは、末端に結合する化合物によって、デンドリマーの親疎水性のバランスが変化したためであると考えられる。さらに、デンドリマーの化学構造だけでなく、デンドリマーへの内包物によっても相転移温度を変化させることができた²⁶⁾。

バイオ応用をするためには、生体由来物質を末端に有す

る温度応答性デンドリマーの作製が有用である。側鎖にフェニル基を有するアミノ酸であるフェニルアラニンを結合させたデンドリマーも温度応答性を示すことがわかった。イソロイシンやロイシンを結合したデンドリマーでは温度応答性は見られなかったことから、フェニルアラニンが適切な疎水性を持っている分子であることが示唆された²⁷⁾。以上のように、デンドリマーに温度応答性高分子やその部分構造を結合させたり、もしくは、適切な疎水性を有する化合物を結合させることで、温度応答性デンドリマーを作製できることが明らかとなった (図5)。

5.2 温度応答性エラスチンデンドリマーによる細胞への取り込み制御

著者らは温度応答性蛋白質であるエラスチンに着目し、これを模倣したエラスチンデンドリマーの作製も行った。エラスチンにはバリナープロリン-グリシン-バリナーグリシン (VPGVG) の繰り返し配列がみられ、このペプチドはエラスチン様ペプチド (ELP)²⁸⁾として利用されている。しかし、短鎖 ELP は相転移挙動を示さないため、高分子量化が必要である。そこで、ELP をデンドリマーの末端に結合させたエラスチンデンドリマー²⁹⁾を作製した (図6)。そして、ペプチドの鎖長やデンドリマーの世代数

図6 エラスチンデンドリマー. Ac はアセチル基

表2 鎖長や世代数の異なるエラスチンデンドリマーの相転移温度

化合物名	世代数 (末端数)	ペプチド	分子量 (kDa)	相転移温度 (℃)
ELP1-G4	G4(64)	Ac-VPGVG	43	48
ELP2-G3	G3(32)	Ac-(VPGVG) ₂	34	39
ELP2-G4	G4(64)	Ac-(VPGVG) ₂	69	38
ELP2-G5	G5(128)	Ac-(VPGVG) ₂	139	30

がその温度応答性に与える影響について検討するため、G3からG5のPAMAMデンドリマーにVPGVG (ELP1) および(VPGVG)₂ (ELP2)を結合させた様々なエラスチンデンドリマーを合成した(ELP1-G4, ELP2-G3, ELP2-G4, ELP2-G5)。これらのデンドリマーについて円二色性(CD)スペクトル測定を行ったところ、加温によりランダムコイル構造から β ターン構造へ変化することが示唆された。対応するELPでは同様のCDパターンが見られたことから、デンドリマーへの結合はエラスチンペプチドの性質に影響を与えないことが示唆された。次に、温度変化濁度測定によって相転移挙動を検討した。それぞれのデンドリマーの相転移温度を表2に示す。ペプチド単独では相転移挙動は見られなかったが、エラスチンデンドリマーでは加温によって相転移挙動が見られた。以上より、エラスチンデンドリマーではデンドリマー表面のペプチドの二次構造変化によって疎水性が増加し、デンドリマーが凝集する相転移が生じたと考えられる。そして、エラスチンデンドリマーのペプチド鎖長の伸長や世代数の増加によって、相転移温度を低下させることができた。また、ELP2-G3及びELP2-G4はバイオ応用に適する体温付近で相転移することがわかった。

そこで、このエラスチンデンドリマーを金ナノ粒子の運搬体として用いることにした。金ナノ粒子は光照射により発熱する性質を示し、光温熱療法に应用されている³⁰⁾。図3に示すとおりPEG修飾PAMAMデンドリマーには金ナノ粒子を内包させることができるので¹⁶⁾、この手法をエラスチンデンドリマーに展開することで、金ナノ粒子を担持したエラスチンデンドリマー³¹⁾を作製した。そして、このデンドリマーが温度応答性と光応答性を併せ持つ二重刺激応答性ナノ粒子として機能することを明らかにした。金は位相差像で黒色物として観察することができる。図7に示すように、PEG修飾デンドリマーでは金ナノ粒子は細胞にはほとんど取り込まれなかったが、エラスチンデンドリマーでは多くの金ナノ粒子を細胞に取り込まれさせることができた。そして、エラスチンデンドリマーを用いるこ

図7 金ナノ粒子を担持したエラスチンデンドリマー(37℃ (A)と25℃ (B))とPEG修飾デンドリマー(C)の細胞への取り込みと光細胞毒性実験の比較。矢印は光照射した細胞を示しており、カルセイン-AMとヨウ化プロピジウムを用い、生細胞を緑色に、死細胞を赤色に染色した

とで、効果的な光細胞毒性を発現させることができた。また、エラスチンデンドリマーでは、低温にすると金ナノ粒子の細胞への取り込みを抑制することができ、温度によって細胞への取り込みをスイッチングできることが明らかとなった。

6. おわりに

本稿では、DDS分野におけるデンドリマーの有用性や細胞や組織への接着を制御するための表面修飾に関して記載した。バイオ材料は、DDS分野以外にも様々な分野で利用されており、その用途によって細胞や蛋白質との接着を①抑制したいもの、②促進したいもの、③スイッチングしたいものに分類される。したがって、目的の用途、標的となる細胞や組織の特性をよく理解して、それに適した材料を設計・作製することが必要である。本稿が「Adhesion」研究における異分野融合を促進し、新規マテリアルの創製につながる足がかりになれば幸いである。

文 献

- 1) D. A. Tomalia, A. M. Naylor, and W. A. Goddard, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **29**, 138 (1990).
- 2) D. Astruc, E. Boisselier, and C. Ornelas, *Chem. Rev.*, **110**, 1857 (2010).
- 3) S. Svenson, and D. A. Tomalia, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **57**, 2106 (2005).
- 4) 児島千恵, 高分子, **62**, 325 (2013).
- 5) C. Kojima, "Design of Stimuli-Responsive Dendrimers for Biomedical Purposes" Dendrimer-Based Drug Delivery System: From Theory to Practice, Wiley, p. 307 (2012).
- 6) C. Kojima, "Smart Dendrimers", Smart Materials for Drug Delivery, Royal Society of Chemistry, p. 94 (2013).
- 7) "絵で見てわかるナノ DDS—マテリアルから見た治療・診断・予後・予防, ヘルスケア技術の最先端—", メディカルドゥ (2007).
- 8) L. Albertazzi, M. Serresi, A. Albanese, and F. Beltram, *Mol. Pharm.*, **7**, 680 (2010).
- 9) H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, *J. Control. Release*, **122**, 39 (2007).
- 10) F. Alexis, E. Bridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, *Mol. Pharm.*, **5**, 505 (2008).
- 11) S. Sadekar, A. Ray, M. Janat-Amsbury, C. M. Peterson, and H. Ghandehari, *Biomacromolecules*, **12**, 88 (2011).
- 12) R. B. Greenwald, C. D. Conover, and Y. H. Choe, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, **17**, 101 (2000).
- 13) C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, and T. Takagishi, *Bioconjug. Chem.*, **11**, 910 (2000).
- 14) C. Kojima, Y. Toi, A. Harada, and K. Kono, *Bioconjug. Chem.*, **18**, 663 (2007).
- 15) C. Kojima, Y. Toi, A. Harada, and K. Kono, *Bioconjug. Chem.*, **19**, 2280 (2008).
- 16) Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, T. Ura, H. Horinaka, and K. Kono, *Langmuir*, **23**, 5243 (2007).
- 17) C. Kojima, C. Regino, Y. Umeda, H. Kobayashi, and K. Kono, *Int. J. Pharm.*, **383**, 293 (2010).
- 18) H. Hatakeyama, H. Akita, and H. Harashima, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 152 (2011).
- 19) R. Q. Huang, Y. H. Qu, W. L. Ke, J. H. Zhu, Y. Y. Pei, and C. Jiang, *FASEB J.*, **21**, 1117 (2007).
- 20) L. Han, R. Huang, S. Liu, S. Huang, and C. Jiang, *Mol. Pharm.*, **7**, 2156 (2010).
- 21) P. Singh, U. Gupta, A. Asthana, and N. K. Jain, *Bioconjug. Chem.*, **19**, 2239 (2008).
- 22) D. Schmaljohann, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1655 (2006).
- 23) M. Kimura, M. Kato, T. Muto, K. Hanabusa, and H. Shirai, *Macromolecules*, **33**, 1117 (2000).
- 24) Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, and K. Kono, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 234 (2007).
- 25) Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, and K. Kono, *Macromolecules*, **39**, 7451 (2006).
- 26) K. Kono, T. Miyoshi, Y. Haba, E. Murakami, C. Kojima, and A. Harada, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 7222 (2007).
- 27) Y. Tono, C. Kojima, Y. Haba, T. Takahashi, A. Harada, S. Yagi, and K. Kono, *Langmuir*, **22**, 4920 (2006).
- 28) D. W. Urry, K. D. Urry, W. Szaflarski, and W. Nowicki, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 1404 (2010).
- 29) C. Kojima, K. Irie, T. Tada, and N. Tanaka, *Biopolymers*, **101**, 603 (2014).
- 30) M.-C. Daniel and D. Astruc, *Chem. Rev.*, **104**, 2913 (2014).
- 31) D. Fukushima, U. H. Sk, Y. Sakamoto, I. Nakase, and C. Kojima, *Coll. Surf B*, **132**, 155 (2015).