●特集 生体膜と人工膜の接点

精妙な生体膜のはたらきとナノバイオマテリアルの開発

藤本啓二

慶応義塾大学大学院 理工学研究科 生命理工学専修 〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1

Development of Nano-biomaterials Involved in Exquisite Functions of Biomembranes

Keiji Fujimoto

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8522, Japan

Biological and biophysical understanding of cellular functions and machinery will provide a variety of insights into design and synthesis of materials and devices. For instance, shielding of the cell surface can block some of cellular recognition processes and is a useful technique to protect cells and tissues against the harmful substances. By using water-soluble and nonionic polymers having a lipophilic anchor group at one end, polymer chains were attached to a cell surface through the hydrophobic interaction. Alternatively, polymer chains could be chemically linked to membrane proteins or saccharides. Furthermore, cell modification could be carried out using polymer chains with affinities such as RGD-integrin. In all the cases, activation of modified cells was suppressed when they met with relatively large materials such as a tissue culture dish and a micrometer-sized latex particle. Another cell surface engineering is associated with the signal transduction through cell membrane receptors. In signaling process, the signaling appears to emerge from the dynamic motions such as clustering and patterning of distribution of proteins and other molecules in the membrane. Neutrophils were coupled to thermosensitive polymer chains with cell-adhesive RGD peptides. The cells became activated when the temperature was raised. This modification makes it possible to induce the specific activation by clustering of receptors through the polymer association. Nanoparticles can be prepared by the interchain aggregation or the chemical cross-linking of polymer chains. We developed a novel drug delivery system for apoptosis induction by a "smart" polymer vehicle possessing thermo-sensitivity and bioaffinity. The polymeric nanoparticles incorporating an apoptotic inducer, dol-p, were added to a human promonocytic leukemia U937 cell suspension at 37 °C. By lowering temperature to 25 °C, cells underwent apoptosis in the presence of Ca^{2+} . This technique would allow cells to possess the ability to induce apoptosis in response to stimuli such as temperature. Such engineered cells would be expected for the gene therapy, the cytomedical therapy, and the tissue engineering.

Key words : cell surface / thermosensitive / RGD peptide / polymer chain / nanoparticle / apoptosis

1. はじめに

生体は一つの細胞から発生して分裂することにより数が増え、臓器および組織が形成される。さらに組織化が進んで個体が形作られる。その個体には凝固反応や免疫反応などの精妙で多岐にわたるシステムが存在する。そこには細胞間の認識、細胞内へのシグナル伝達、遺伝子発現の活性化、タンパク質の産生および分泌などが起こっている。このような個体（生体）に対して、何十年か前に人工材料を用いて医療的行為の補助とすることが始まった。それ以来、アナロジー的発想で様々な臓器に材料は用いられてきた。医学的な評価はこういった複雑なシステムを内包したまま統計的に行われる。従ってそこから抽出された生体適合性は多義的であり、とらえどころのない特性となってしまう。この生体適合性はバルクの性質に関する力学的適合性と材料表面の性質に関する表面適合性とのふたつに分けて考えることができる。人工血管では周囲の組織と材料との力学的なつり合い（力学的適合性）が重要となってくる。人工物と生体との接合部のマッチングが悪いと力学的なストレスが発生する。その結果、生体が脆弱化して破裂したり、内膜の過形成によって閉塞が起こったりすることが指摘されている。一方、表面適合性という観点からは主として生体システムを活性化させない材料と細胞あるいは組織に対して親和性をもつ材料の開発が行われてきた。なかでも血液適合性に関する研究が数多くなされ、極端に親水性でも疎水性でもない表面には実験的にも理論的にも血液成分が付着してしまうことが明らかとなった^{2,3)}。それでは超親水性あるいは超疎水性表面が優れているかということそんなに単純ではない。ほとんどの材料は短期間の間だけしか使うことができない。少し長く使う場合には必ず抗凝固剤などの薬物の助けが必要となる。一方、組織に対して親和性を与えるために生体に似せた表面をつくるという研究が進められてきた。細胞膜表面は脂質の極性部位によって形成されている。従って、この表面を真似た材料としてリン脂質の極性部位を含有したポリマーが開発さ

れ、優れた血液適合性を示すことが明らかとなっている⁴⁾。

もともと生体表面と人工材料表面との界面は一つの安定化状態をもつものではないと考えることも大切である。生体側で起こる動的な変化に材料側は追従できないと考えると理解しやすいだろう。生体側と相克するような存在にするためには材料側に動的な因子を導入することが考えられる。例としてはタンパク質および細胞固定化材料があげられる。これは生体成分と材料とのハイブリッド化であり、生体成分が動的因子として材料に盛り込まれたものと考えられる。ここでは生体からもらってきたものが生体系の助けをかりて材料側で再構築される。このような研究の延長として今日の再生医療および組織工学がある。これ以外には材料をナノレベルでデザインすることが考えられる。細胞のシグナル伝達における分子の構造変化や会合・脱会合、あるいは細胞の形態変化や運動の際に見られる、アクチンフィラメント、微小管、中間系フィラメントといった細胞骨格系構造体の形成と破壊はすべてナノレベルである。生体機能の発現では構造体のナノレベルでの変動を伴うことが多い。ポリマー鎖はちょうどナノレベルのマテリアルであり、生体システムに作用するようにデザインすることができる材料である。これは材料の適合化というよりは、材料をナノレベルにすることにより生体をうまくだまして良いことをさせようとするアプローチだと考えられる。以下にわれわれがポリマー鎖から作ったいくつかのナノバイオマテリアルを紹介する。

2. 細胞の顔を変えるナノチェーン

生体は複雑で精妙な認識を行っているが、分子と分子とが接触してはじめてその物語が進行する。細胞膜の外側には糖鎖やタンパク質からなる細胞外皮が存在する。ここでは、糖鎖、タンパク質分子、および脂質膜を介して様々でかつ特異的な認識と応答が起こっている。白血球の遊走ではローリング、強固な接着、遊走のそれぞれのステップにおいて接着に関与する生体ポリマーの種類

Fig. 1 Approaches to immobilization of polymer chains onto a surface of living cells.

が変わり、白血球と内皮細胞間の距離も次第に近づいてくる。ここでの生体ポリマーの役割は細胞間の距離を保つこと、および識別して結合させることである。これは細胞の認識において分子間距離が大切になってくることを示している。従って、細胞表面よりも遠い距離に新たな層を創って遮蔽するか、あるいは表面の認識分子が働かないようにすることができれば、細胞を無個性にも別の個性をもつようにも改質できると考えられる⁹⁾。

素材化に際して、まず大切なことは人工の外層をつくることである。Fig. 1にポリマー鎖からなる層を細胞外につくり出す表面改質の方法を示す。まず、Fig. 1の1に示すように脂質膜内にポリマー鎖を挿入するために、水溶性ポリマーであるポリアクリルアミド鎖の末端の片方だけに疎水性アンカー（octadecyl基）を結合させたものを合成した。このポリマー鎖で処理した細胞は凝集素であるトロンビンを加えても凝集が起らなかった。これは細胞の外部に水溶性ポリマー鎖からなる保護層が形成されてトロンビンがレセプターに結合できなくなったためである。また、ポリマー鎖が細胞間の接触を阻害していることも考えられる。

細胞膜上のタンパク質あるいは糖鎖にポリマー鎖を化学結合（Fig. 1の3）させることによって

Fig. 2 Time-course of platelets aggregation by thrombin. Reactive (PDMAA-CC) and parent (PDMAA-NH₂) polymers were added at the concentration of 0.187mM to a cell suspension. The final concentration of thrombin was 0.15units/ml.

Fig. 3 Ca²⁺ dependent active oxygen release from modified neutrophils upon contacting with a PS dish.

Cells were preincubated with RGDS-carrying polymer chains.

保護層をつくることができる。そこでポリマー鎖の片方の末端のみに塩化シアヌルを有する水溶性ポリマーを合成した。塩化シアヌルの部分は細胞外皮に存在する糖鎖の水酸基、あるいは膜タンパク質のアミノ基と化学結合することができる。この素材を用いて血小板の表面改質を行った場合にも、トロンビン添加に対して凝集が抑制されている結果が得られた（Fig. 2）。この反応性ポリマー鎖を顆粒球に導入することを試みた。顆粒球は体内に侵入してきた異物を捕らえて排除する機能をもっている。ポリスチレンの微粒子（直径約

Fig. 4 Cell surface modification by bifunctional polymer chains.

800nm) を顆粒球に加えると、微粒子を貪食して多量の活性酸素を放出した。ポリマー鎖が結合した顆粒球の場合には活性酸素の放出量は低くなる結果となった。このような遮蔽効果を示した濃度域においては、ポリマー鎖による毒性発現および細胞の活性化は認められず、機能低下も起こっていなかった。この活性化の抑制は顆粒球表面の保護層によって微粒子と細胞とが接触できなくなったためだと考えられる。

また、レセプターとリガンドといった細胞の特異的相互作用を用いてもポリマー保護層を形成させることができる (Fig. 1の2)。ポリマー鎖に結合させるリガンドには、フィブロネクチンなど多くの細胞外マトリックスの構成成分で、細胞のインテグリンレセプターと結合するテトラペプチドRGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) を選んだ。まず、片方の末端のみにアミノ基を有するポリマー鎖を合成し、カルボジイミド法でアミノ基を介してRGDSペプチドの結合を行った。Fig. 3に示すようにRGDSペプチドを介してポリマー鎖を結合させた顆粒球では活性酸素の産生量が減少し、異物認識の抑制が示唆される結果となった。RGDSとイ

ンテグリンとの結合はカルシウムイオン存在下で起こることから、系のカルシウムイオン濃度を低下させると再び活性酸素を産生するようになった。レセプターを介した表面改質でもシグナル伝達 (この場合はクラスター化) を引き起こさないものであれば、保護層形成のために用いることができる。この改質細胞では、様々な生体物質間の相互作用が起こらないため異種間での細胞利用 (免疫隔離) に応用できると考えられる。

さらに、ポリマー鎖を結合させることにより細胞に新たな親和性を導入することもできる。それによって細胞をデリバリーあるいは集積化することも可能となる。Fig. 4のようにポリエチレンオキサライドの両末端に細胞接着性ペプチドRGDSを導入したポリマー鎖を細胞表面に導入すると、未改質の細胞との間で凝集塊が形成される。これは細胞凝集を人為的に制御できることを意味している。また、末端に別のリガンドを導入することにより種類の違う別の細胞を捕らえて作用を与えるように細胞を変換することもできる。さらに化学反応性を付与すると人工物への細胞の集積化が可能となる。このような技術により複数の細胞から

組織体を形成させることや、細胞を人工物に集積させることも可能となるだろう。細胞はなんとナノサイズの一皮で騙されるのである。

3. 細胞機能を制御するナノマテリアル

シグナル伝達においては、細胞外皮に存在する糖鎖やタンパク質などを介して特異的な認識と応答が起こる。この際に脂質膜は分子を局在化させ、かつ高い運動性を与える場となる。そこでは様々な形やパターンが生起され、脂質膜はこれらの分子の運動に変調を与えて巧みな調節を行っている。最近、細胞外マトリックスの機能の研究から特異的なシグナル伝達にはレセプターの集合と離散といった機能分子における階層性が本質であることが見えてきた。免疫系でもレセプターの凝集は重要であり、人工リガンドによってレセプターを凝集させて細胞の機能を活性化させる報告がなされている⁶⁾。さらに最近、T細胞の活性化において、抗原提示細胞との接着部位がICAM-1を中央にMHC分子が周りを囲んだパターンを形成し、それが時間とともに変化して最終的にクラスター(免疫シナプス)を形成することがわかってきた⁷⁾。このようなことから、特定の接着分子のクラスター化を人為的に引き起こして、階層性を形作ることにより細胞のもつ特定の機能を誘導できるのではないかと考えられる。モデルとしてインテグリンのクラスター化に注目し、RGDSペプチドリガンドをポリマー鎖およびポリマー微粒子に固定化した。ここではポリマーがレセプターの凝集を引き起こすようにある仕掛けをした。このポリマーはポリN-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAM)といって、温度を変化させると形態が変化する温度応答性を有している。つまり、この素材はレセプターと多点で結合して、温度変化に伴って形態が収縮することによりレセプターの凝集を引き起こすことが期待できる(Fig. 5)。まず、RGDSがいくつも結合した温度応答性ポリマー鎖を合成した。このポリマー鎖を顆粒球と接触させ、系の温度を25℃から37℃へと変化させた。37℃への昇温に伴い細胞から大量の活性酸素が産生された。

Fig. 5 Control of signal transduction with ligand-carrying polymeric materials.

RGDSペプチドを添加することによりこの産生は抑制された。確かにRGDSとインテグリンの複合体が形成されて活性化が起こっていることがわかる。一方、このような活性化は、RGDSペプチドを片末端にだけ導入させたポリマー鎖では認められなかった。これは一本のポリマー鎖が多数のリガンドを介して多数のレセプターと結合してレセプターとリガンドの複合体を集合化させることが必要であることを示唆している。微粒子でも同じような素材を創ることができる。微粒子のサイズは25℃で600nmであり、ポリマーの鎖と比べて細胞との接触面積が飛躍的に広がる。RGDSを固定化させた微粒子を25℃で細胞に添加すると細胞の周囲に多数の微粒子がしっかりと付着する。この

Fig. 6 Time-course of active oxygen production caused by PMNs contacting NA-RGD or NA-NH₂ particles. The temperature was changed from 25 °C to 37 °C 20 min after incubation.

微粒子は昇温に伴ってサイズが350nm位まで収縮することがわかっている。20分後に37℃まで昇温させて活性酸素の産生を調べたところ、ペプチドを導入していない担体微粒子では産生量が非常に少ないのに対して、RGDS固定化微粒子では過剰な産生が観察された (Fig. 6)。この微粒子は膨潤状態 (25℃) でRGDSペプチドを介してレセプターと多点で接着する。おそらく、この状態から37℃に昇温することにより粒子は収縮し、多数のリガンド-レセプター複合体が集合化されることにより過剰のシグナルが入力されたものと考えている。これにより細胞に疑似シグナル伝達を行うことができるようになる。様々なリガンドを選択することにより、多様な機能の制御へと展開することが期待できる。ナノバイオマテリアルによって細胞機能を人為的に制御することができる日も近い。

4. アポトーシスを制御するナノマテリアル

アポトーシスは高度な制御機能をもった能動的細胞死であり、癌や自己免疫疾患などの多くの疾病の発症に深く関わっていることが明らかになっ

てきている。最近、いくつかの脂質分子がアポトーシスを誘導することがわかってきた。このような化合物にイソプレノイド化合物がある。この化合物を特定の有機溶媒に溶解させてヒト単球性白血病細胞株U937細胞に添加すると、緩衝液中で200nm前後のエマルションを形成していた⁸⁾。アポトーシス誘導にはエマルション形成が必要であり、またエマルションが安定すぎても効率が低下してしまうことがわかった。さらに、溶液中に血清アルブミンを加えることにより、アポトーシス誘導が促進された。溶液中のAlbの二次構造に変化が認められ、誘導物質とアルブミンは複合体を形成していることが示唆された。おそらく溶液中でアルブミンは誘導物質を細胞まで運ぶキャリアのような働きをして誘導活性を高めていると考えられる。

そこで、エマルションとアルブミンの代わりにポリマー鎖を用いて、誘導物質であるドリコールリン酸 (Dol-p) を封入したアポトーシス誘導ナノキャリアの作製を試みた (Fig. 7)。まず、反応性基をもつ温度応答性のPNIPAM鎖を作製した。このポリマー鎖に細胞接着性ペプチドRGDSを導入して、細胞接着性と温度応答性を合わせもつポリマー鎖とした。Dol-pの封入はこのポリマー鎖が溶解している温度 (31℃) でDol-pと共存させ、次に収縮する温度 (37℃) まで昇温することにより行った。このDol-pを内封したポリマー鎖は37℃では200nm以下の単一サイズの凝集体となり、細胞に添加して温度を25℃まで下げて1時間作用させることにより、DNAの断片化が見られるようになった⁹⁾。一方、温度を変化させずDol-pを会体内に封入したままの場合にはアポトーシスは誘導されなかった。このナノキャリアは内側に薬剤のためのキャビティをもち、外側の細胞接着ペプチドを介して細胞近傍に集積し、温度変化によってキャリアの形態が変化して内封物質を細胞膜に効率よく移行させることができるものと考えられる。これは温度変化により人為的に細胞を死に至らしめる技術であり、細胞性製剤や組織工学にも利用可能だと考えている。

Fig. 7 Schematics of the drug delivery system for apoptosis induction using the smart polymeric vehicle. Targeting sites (e.g. RGDS) can be given to the copolymer chain by immobilizing various ligands. Above their lower critical solution temperature (LCST), the association of the copolymer leads to stable aggregates formed mainly through the packing of individual collapsed chains. The nanoscale delivery vehicle possesses the hydrophobic cavity for the incorporation of lipid inducers of apoptosis. The release of lipid inducers of apoptosis from the cavity is triggered by the disruption of vehicles by lowering temperature. The released inducers are transferred to the cell membrane, leading to apoptosis induction.

5. 最後に

細胞をはじめとする生体系での新しい知見が次々と明らかとなり、我々のような高分子研究者からもそこをターゲットとした研究が可能となってきた。生体系に対して様々な働きかけをする素材を合成することによって、生体機能を制御できる

可能性を示唆しているように思われる。これから、材料を生体系に融合させるように設計し実際に作製することがますます重要になってくると思われる。しかし、単に生物を真似ただけでは組織再生、さらに医療への貢献などおぼつかないだろう。現段階では生物の不思議さからマテリアルづくりを考えさせていただいているというところであろう。ここで紹介した研究はひとつの例である。当然これ以外にもモデル化は存在する。重要なことは形にすることを思いつくかどうかということであるように思う。

謝 辞

アポトーシスに関する研究は国立国際医療センター研究所の大島美恵子先生と八杉悦子先生との共同研究であり、ここに感謝申し上げます。

文 献

- 1) 筏 義人:「高分子新素材One Point 20, 医用高分子材料」, 高分子学会編, pp.58-79, 共立出版(1989)
- 2) 筏 義人:「バイオマテリアル」, pp.209-224, 日刊工業新聞社(1988)
- 3) 松田武久:「生体コロイドI, 基礎と実際」, 嶋林三郎, 寺田 弘, 岡林博文編, pp.777-818, 廣川書店(1990)
- 4) 中林宣男, 石原一彦, 岩崎泰彦:「バイオマテリアル」, 日本エム・イー学会編, pp.82-86, コロナ社(1999)
- 5) Fujimoto K: "Supramolecular Design for Biological Applications", Yui N ed., Chap. 17, CRC Press, New York (2002)
- 6) Spencer D M, Wandless T J, Schreiber S L and Crabtree G R: *Science*, **262** 1019-1024 (1993)
- 7) Grakoui A, Bromley S K, Sumen C, Davis M M, Shaw A S, Allen P M and Dustin M L, : *Science*, **285** 221-227 (1999)
- 8) Fujimoto K, Iwasaki C, Kawaguchi H, Yasugi E, and Oshima M: *FEBS Letters*, **446** 113-116 (1999)
- 9) Fujimoto K, Iwasaki C, Arai C, Kuwako M, Yasugi E: *Biomacromolecules*, **1** 515-518 (2000)

(受付 2002年9月5日 掲載決定 9月14日)