細胞接着制御の分子設計と循環系医学への応用

松田 武久*

Molecular Design Leading to Cellular Adhesion Control and its Application to Cardiovascular Engineering

Takehisa MATSUDA*

This article summarizes our several years-effort to realize cell adhesion control *via* biospecific ligand-receptor interaction for enhanced adhesion and physico-chemical surface design for non-cell adhesion. The minimal cell adhesive tripeptidyl sequence of Arg-Gly-Asp (RGD), common to adhesive proteins, was immobilized to polymer surfaces or derivatized to water-soluble and -insoluble polymers, resulting in the molecular architecture of 2-dimensional and 3-dimensional artificial extracellular matrix where cell adhesion and growth were attained. Photochemical surface fixation of cell-adhesive RGD-containing peptide and adhesive proteins or nonionic, hydrophilic polymers, all of which were derivatized with photoreactive groups such as azidophenyl, were successfully attained in the microns-order regional precision. This eventually leads to provide solid bases of biocompatible surface designs for fabricated cardiovascular devices and functional surface designs for micro-sensors and micromachines.

Key words : Cell adhesion; Adhesive proteins; RGD peptide; Artificial extracellular matrix, Photochemical modification.

1. 緒 論

人工臓器は修復不能の実質臓器・組織の機能や構造の代替であり、図1に示したように人工材料のみからなるデバイス、あるいはこれに生体分子(糖や蛋白質)を一部組み込んだデバイスは人工臓器(例:人工心臓, 人工弁, 人工血管)と呼ばれている。一方、あらかじめ生細胞を組み込み、細胞のもつ内分泌機能を利用するデバイスはハイブリッド人工臓器(例:皮膚, 肝臓, 脾臓)と呼ばれ、人工材料は構造マトリックス, 免疫隔離膜や細胞接着床としての役割を課す。人工材料を完全に除くと組織・器官の移植臓器となる。ハイブリッド人工臓器は人工臓器と移植臓器の中間に位置する細胞移植臓器といえる。

これらの臓器が血液, 体液や組織と接触すると, 生体防御機構によって異物とみなされ, 排除するよう種々の

生体系が活性化される。血栓形成, 組織の過増殖, 癒着, カプセル化等が生じるが, これらは血小板, 白血球, マクロファージ等の細胞系防御機構, および凝固系, 補体系等の一連の蛋白質のカスケード反応を特徴とする液性生体防御機構の活性化による。人工臓器, ハイブリッド人工臓器のいずれの場合にも生体適合化を獲得するためには, 以下に述べるように, 人工基材上の蛋白質の吸着制御, および細胞の接着・増殖制御が基本となる。

血液循環系人工臓器(人工心臓, 人工弁, 人工肺, 人工血管等)は血液接触面および組織接触面のいずれの接触面においても, 細胞と材料の相互作用の性質とその強度が人工臓器の生体適合化を支配する。例えば, 短期使用の人工臓器(人工肺, 人工腎臓)の血液接触面においては, 血小板および白血球が粘着しない細胞非粘着表面が必須である。長期使用の人工臓器の組織接触面は逆に高い細胞親和性表面を形成させることが生体適合性材料の開発の有力なる指針となっている。例えば, 人工血管の場合には移植後に血管壁と同様な組織を人工材料上で再構築することが必須となる。すなわち, 生体系を活性化させず, 生物学的に不活性な(Bioinert)受動的材料, お

* 国立循環器病センター研究所生体工学部 ()

* Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute ()

Fig. 1 A wide spectrum of implantable and transplantable organs ranging from totally artificial organ to living organ.

よび逆に活性化を能動的に誘導して創傷治療や組織形成を促進する活性(Bioactive)な能動的材料である^{11, 12, 16)}。理想的には、これらの材料が組み込まれた人工臓器は生体内で異物認識をされず、自己化を獲得することになる。

一方、ハイブリッド型人工臓器では細胞接着の促進化、細胞接着層の安定化および組織化が中心課題である。したがって、生体適合化の理論構築、それに基づく生体適合性材料の分子設計およびデバイスの開発には、細胞と材料の相互作用の本質を解明し、細胞の基本行動形態である接着・増殖、移動、分化および自己分泌による細胞外マトリックスの構築を人工材料表面で制御することが必須である。

本研究は細胞接着・非接着を分子論的に理解するとともに、これを臓器工学的に応用することを目的としたもので、著者のグループによる最近数年間の研究を要約したものである。具体的には、

- 1)人工材料表面における細胞の接着過程のリガンド・レセプター相互作用の生物学的特異性の理解
- 2)接着認識機能を組み込んだバイオマテリアルの分子設計
- 3)デバイス表面生体適合化付与技術
- 4)人工材料の微小領域における接着の0/1制御を可能にする表面微細加工技術の開発と細胞パターン化である。

2. 細胞接着機構とペプチド性材料^{1~16)}

接着依存性細胞がフィブロネクチン、フィブリノーゲン、コラーゲンに代表される接着性蛋白質が吸着した材料表面で接着・増殖することはよく知られた事実である。一方、血小板の粘着および凝集においてもフィブリ

ノーゲン等が介在することが知られているが、その分子レベルでの理解はなされていなかった。1984年 Rouslahti らによって代表的な接着性蛋白質であるフィブロネクチンの接着活性コア部位が同定され、引き続いてフィブリノーゲン、コラーゲン、ラミニン等、接着性蛋白質に共通する最小アミノ酸配列が Arg-Gly-Asp(RGD:アミノ酸一文字表示)トリペプチドであることが見いだされた。一方、接着依存性細胞の接着活性リガンド部位を認識する接着レセプターの相同性が最近見いだされている(インテグリン・スーパーファミリーと呼ばれ、2つの膜蛋白質の複合体である)。この単純な接着機構の発見は細胞生物学の分野にとどまらず、癌研究や発生学にも大きなインパクトを与えている。

我々は上述の知見をもとにして、血液細胞(血小板、白血球)および血管内皮細胞の接着機構が上記の接着性蛋白質を介在するリガンド/レセプター相互作用によって支配されているかを検討し、次の事実を明らかにした。①蛍光ラベル化した RGD ペプチドを添加すると、これらの細胞膜表面に局在化して蛍光発色したので、上記の血液および血管壁細胞は RGD を認識する膜レセプターを有する。②RGD ペプチドを血小板や血管壁細胞の浮遊液に添加すると、濃度依存的に接着性蛋白質コートした表面への接着が阻害された。③粘着した内皮細胞に RGDS を添加すると、濃度依存的に細胞骨格系アクチンの縮退と同時に脱着した。このことは、これらの細胞膜レセプターが RGD トリペプチドを分子認識していることを意味する。

一方、RGD ペプチドがレセプターへ配位すると、細胞膜内に情報が伝達されることが予想される。細胞外から流入した、あるいは細胞内の Ca 貯蔵庫から放出され

た遊離 Ca はセカンド・メッセンジャーと呼ばれ、一連の代謝経路を活性化する前段階である。細胞内への情報伝達を最近開発された細胞内 Ca 指示薬(蛍光物質 Fura-2, および発光蛋白 Aequorin)を用いて詳細に調べると, RGDS のレセプターへの結合数が高くなると細胞内へ Ca が流入するが, この遊離 Ca 濃度はきわめて微弱であった。血小板の場合には, トロンビン刺激による細胞内 Ca 動員量の約百分の一であり, アラキドン酸代謝回路を活性化させない濃度であることがわかった。以上の事実は, RGDS ペプチドが, ①接着レセプターに配位することによる接着性蛋白質が介在する細胞凝集や粘着を阻害する(アンタゴニスト), ②レセプターに配位して細胞膜へ情報を伝達するが, Ca 動員で見る限り微弱であり, 血小板の場合には活性化は事実上惹起しない(アゴニストとして作用しない), ③内皮細胞の基質への接着は RGDS リガンド・レセプター相互作用が支配的であることを示している。これらの基礎的知見は, 以下に示すペプチド性抗血小板剤, 合成フィブリン糊, 人工細胞外マトリックスの分子設計の論理的根拠を与えた。

3. RGD ペプチドを組み込んだバイオマテリアル^{17~26)}

血液中に添加した RGD ペプチドが血小板膜レセプターに配位すれば, 天然基質への結合を阻害して細胞を非接着性にするので抗血小板剤となりうると考えられる。RGD ペプチドを側鎖に含む水溶性高分子の場合には, 逆に血小板凝集剤となりうる。非親水性合成高分子に RGD ペプチドを組み込めば, 細胞培養床としての二次元人工基底膜になり, 一方ゲル化能を付与した水溶性高分子の場合には, 細胞を包埋できる三次元の細胞外マトリックスができると考えられる(図2)。

Fig. 2 Application of cell adhesive peptide RGD (Arg-Gly-Asp) to molecular design of bioactive biomaterials.

3.1. ペプチド性抗血小板剤の分子設計

上述したように, RGD は血小板接着レセプターのアンタゴニストとして作用し, 凝集・粘着を阻害するが, それ自体は血小板を活性化させない。そこで, 人工肺等の体外循環用の抗血小板剤としての可能性を検討した。RGDS(RGD-Ser)を血液中に持続添加すると, 人工肺を用いる体外循環中の凝集・粘着能は完全に阻害され, 血小板の消費とその活性化(放出される β -TG を指標)も完全に抑制された。添加を終了すると 10 分以内に血小板機能が回復したことから, 一時使用の抗血小板剤として“理想的”な性質を有していることが明らかになった。RGDS の場合には約 1 mM が抗血小板作用を保証する投与量であった。この投与量(dose)が高いという欠点を克服するために高活性ペプチド性抗血小板の分子設計を行った。まず, 生理活性とペプチドのコンフォメーションの相関を CD, NMR および Molecular Graphics を用いて調べると, フィブロネクチンの接着活性ペプチド GRGDSP(Gly-RGDS-Pro)は分子内で熱的にきわめて安

Fig. 3 Molecularly designed RGD-containing peptides with high antiplatelet activity.

1: c(RGDG), 2: VVVRGDSVVV, 3: c(GRGDSPA), 4: GRGDSP, 5: RGDS

Fig. 4 Inhibitory effect of RGD peptides on platelet aggregation induced by collagen.

定な β -屈曲構造を形成し, Arg および Asp の側鎖はこの β -turn の平面に対して同一方向に配向し相互作用にしている可能性が高いことが示唆された。この知見をもとにして, β -turn 構造を強化して配向をより強固に制御すれば活性が高まるのではないかとこの仮説のもとに次の分子設計を行った。①N および C 末端に疎水性で β -シート構造をとりやすい Val(V) 基を導入して, 分子間水素結合を強化して β -屈曲構造を安定化させる, あるいは②RGD ペプチドの環状化によって Arg と Asp の空間配向を制御するというものである(図 3)。合成したペプチドはいずれも設計どおり β -turn 構造および側鎖の空間配置が強化されていることが分光学的測定により検証できた。コラーゲン刺激による血小板凝集に対する抑制効果の濃度依存性を図 4 に示した。GRGDSP に比べて, 前者の VVVRGDSVVV は約数十倍, 環状ペプチド C (RGDG) は数百倍の高活性を有していることがわかった。したがって, 分子設計の概念が正しく作動し, 結果的には天然の接着フラグメントよりもきわめて高活性の人工アミノ酸シーケンスを有する接着リガンドが合成できたことになった。環状テトラペプチドの場合には μ M オーダーで有効であり, 体外循環用抗血小板剤としてきわめて有用であるといえる。

3.2. 人工フィブリン糊

フィブリン糊は血管が損傷をうけて血液が漏出した時の自然止血(血液凝固)の生物学的機序を人工的に模倣したものであり, 手術の際に止血剤として用いられている。フィブリノーゲン溶液とトロンビン溶液の二液性であり, *in situ* で混合して創傷部位に塗布すると, まずトロ

Thermoresponsible Cell-Adhesive Water-soluble Polymer

N-Isopropyl Acrylamide

Fig. 5 Artificial fibrin glue incorporated with phase transforming and cell adhesive functions.

ピンによってフィブリノーゲンが重合してフィブリンに転換してゲル化し, ついで血小板がフィブリンのガンマ鎖に存在する RGD を介して粘着・凝集して凝血塊を形成する。このような物理的相転移(Sol-Gel)と細胞生物学的接着特異性を人工的に組み込めば, 人工フィブリン糊をつくることができると考えられる。図 5 に分子設計した人工フィブリン糊を示した。Sol-Gel 相転移機能はポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を用いた。このポリマーは室温では水に溶解するが, 生理的温度では脱水和を起こして析出する性質(感温性)を有している。一方, 細胞との接着は RGD ペプチドを側鎖に導入した。血液と混和して 37 度に加温すると直ちにポリマーが析出し, ついで血小板の凝集塊が形成した。また粘稠溶液を皮膚創傷部に塗布すると直ちに白濁化し始め, 2~3 分以内に固定化し, 止血機能を発現した。ここで開発したポリマーは物理的機能性と細胞生物学的特異性を組み

合わせた人工フィブリン糊のプロトタイプといえる。

3.2. 細胞外環境(人工細胞外マトリックス)の分子設計

生体内においては、上皮性細胞は二次元、間質性細胞は三次元の細胞外マトリックスと接着して存在している。この細胞外マトリックスの主要な機構は、1)細胞の接着・増殖床、2)構造マトリックス、3)保水性である。このうち1)の機能は上述した接着性蛋白質によってもたらされる。コラーゲンは1)および2)、ムコ多糖(ヒアルロン酸等)は2)および3)の機能を担っている。接着リガンドRGDSを化学的に合成高分子表面に固定化すれば、二次人工接着性マトリックスが形成できることになる。また、三次元親水性ゲルの中に化学固定できれば、三次元人工細胞外マトリックスとして作用できることになる。前者の二次元“人工基底膜”に対しては、①固/液界面反応によるRGDSペプチドの化学固定化法、および②溶媒からキャストして造膜可能なRGDSペプチド側鎖を有する合成高分子を分子設計した。①の方法では、マトリックスとして細胞非接着性の親水性高分子のポリビニルアルコールを用い、表面水酸基をカルボジイミダゾールで活性化し、これとペプチドのN末端アミノ基と反応させてRGDペプチドを固定した(表1:1)。固定化密度の上昇とともに細胞接着・増殖は促進され、PVA表面は細胞非接着から高接着表面へ転化した。一方、造膜可能な人工基底膜としては、活性エステル基を有する疎水性コポリマーとRGDSペプチドの高分子反応によって、RGDを高分子鎖に導入した。造膜することによって、RGDペプチドが表面に析出した(表1:2)。いずれの場合にも、細胞は血清や接着性蛋白質を加えなくても接着し、また培地にRGDSを添加すると濃度依存的に細胞が附着したことから、RGDSリガンド/レセプター相互作用で接着が起こったものといえる。

一方、細胞を三次元ゲルの中に包埋できる三次元細胞外マトリックスは、少なくとも次の3つの機能を組み込むことが必要である。すなわち、①細胞と混和する前は水溶性であること、②混和した後は細胞に損傷を与えない物理的刺激によりゲル化して構造マトリックスになること、③細胞接着性を有していることである。水可溶性の合成高分子を骨格とし、これに物理的ストレス(熱や光等)を加えることによってゲル化する機能を付与するとともに、側鎖の一部にRGDペプチドを導入することにより実現させた。熱でゲル化する性質は人工フィブリン糊と同じ感温ゲル化能を有するポリ(イソプロピルアクリルアミド)によって付与した(表1:3)。平滑筋細胞と混和して37度に加温すると直ちにゲル化して細胞が包埋できた。光照射によるゲル化は分子間二量化反応を

Table 1 RGD-modified synthetic polymers and naturally occurring biopolymers.

(1) RGD-derivatize PVA surface

(2) Solution-castable ECM

(3) 3-D ECM

Photocurable ECM

Thermoresponsive ECM

(4) RGD-Biomolecule Conjugate

(5) RGD-Polysaccharide Conjugate

起こすクマリン、珪皮酸およびチミン誘導体を親水性のポリ(ジメチルアクリルアミド)共重合体の側鎖に導入して達成した(表1:3)。紫外光を照射すると細胞が捕捉された透明ゲルが得られた。いずれの場合にも、細胞は人工細胞外マトリックス中で増殖した。これらの二次元および三次元細胞外マトリックスは接着ペプチド・リガンドと機能性高分子を融合させたハイブリッド・バイオマテリアルといえる。一方、生体高分子にRGDペプチドを導入することにより、生体由来の細胞外マトリックスにより近づけることが可能である。細胞非接着性のアルブミンのカルボキシル基を水溶性カルボジイミドで活

Fig. 6 Cellular responses of artificial cell adhesive protein relative to fibronectin (RGD-albumin : RGD-modified albumin, FN : fibronectin, VN : vitronectin).

性化させ、ついで RGD 配列を含むペプチドと反応させて、RGD-アルブミン・コンジュゲートを合成した(表 1 : 4)。細胞接着性、伸展性、移動性、増殖性を定量的に調べると、フィブロネクチンと同等であった(図 6)。一方、ヒアルロン酸やデルマタン硫酸の多糖に RGD ペプチドを導入すると、細胞接着性の人工細胞外マトリックスが合成できた(表 1 : 4)。低温ゲル化能を有するアガロースに導入すると、40 度で混和した細胞混和液を常温で放置すると、不透明ゲルが生成し、細胞を三次元的に包埋することができた(表 1 : 5)。このように、細胞-細胞外マトリックス相互作用は RGD リガンド・レセプター相互作用というきわめて簡単な機構を自然が利用しているが、これを人工材料に組み込むことによってバイオアクティブなバイオマテリアルが創製できることになる。

4. デバイス表面生体適合化付与技術^{27~56)}

デバイス(人工臓器)は少なくとも複数のパーツよりなり、それぞれは異なる材料より作られている。これらの材料は、まず目的とする医用機能性より選択されるので、必ずしも生体適合性表面を示すとは限らない。人工心臓を例にとると、血液ポンプ、空気駆動室、人工弁および人工管の各パーツより構成されているが、これらのパーツを組み合わせて成型した後で任意の部位に望む生体適合性を付与できる表面加工技術の開発が強く要求される。すなわち、複雑なる形状の一部分に、あるいは人工心臓の内面と外面にそれぞれ細胞非接着性と接着性を付与できる表面加工技術である。通常の溶液から造膜する

コーティング法では、経時的に剥離する。一方、グローやコロナ放電処理は複雑なる形状のデバイス表面を均一に表面加工できない。まず、細胞の非接着性を具体化する原理について説明し、ついで光反応を用いて成型加工した表面を修飾する光表面化学を示す。

4.1. 細胞非接着の原理

人工基材が血液に接触すると、まず血液に大量に含まれている蛋白質が吸着する。ついで、血小板等の細胞が粘着する。一方、細胞を血清中で適当な表面物性を有する人工基材上で培養すると、細胞は接着・増殖する。これらは血液や血清中に含まれる接着性蛋白質(フィブリノーゲン、フィブロネクチンやビトロネクチン)が人工基材上に吸着し、蛋白質の細胞接着リガンド部位を細胞膜レセプターが分子認識して細胞が接着・増殖することによる。人工基材に細胞接着性を付与する方法として、1)血清中から比較的微量の接着性蛋白質を選択的に吸着させる、2)これらの接着性蛋白質をあらかじめ吸着させておく、3)あるいは接着性蛋白質や接着活性リガンド RGD 含有ペプチドを化学固定すれば良いことになる。特に、3)の化学固定化法は最も信頼できる接着表面が形成できる。

1)および2)の物理吸着を用いる方法は、極性や疎水性基材を用いると吸着しやすく、かつ脱着し難い性質を利用するものであり、細胞非接着性は接着性蛋白質を吸着させないようにすれば達成できる。蛋白質吸・脱着挙動の材料表面依存性は実験的にも理論的にも明らかにされている。吸着の熱力学的推進力は系の自由エネルギーを減少させ、かつ基材/水界面の自由エネルギー(界面

張力)を減少させることによる。熱力学的には、吸着に伴う系の安定化は熱力学的接着仕事 $W(=\gamma_{ps}-\gamma_{pw}-\gamma_{sw})$;ここで γ は界面自由エネルギーであり、 p, s, w は蛋白質、基材および水)が大きい表面(すなわち、疎水性表面)では蛋白質の吸着が大きいのに対し、 W が小さい非イオン性親水性表面では、熱力学的吸着は抑制されることになる。一方、蛋白質を吸着し難く、かつ脱着しやすい表面は蛋白質と相互作用し難い非イオン性の親水性表面であり、これは前述の界面自由エネルギーが小さいことに起因する。この熱力学的な非吸着過程に加えて、溶解高分子鎖の散漫構造を有する界面構造(Diffuse Layer)や溶解高分子鎖の易動性(Chain Mobility)の効果が重畳されれば、より吸着が抑制される。具体的には、親水性非イオン高分子鎖(ポリアクリルアミドやポリエチレングリコールのグラフト鎖)を界面に組み込めば達成される。以上が人工基材表面における細胞接着・非接着を具体化する原理である。

4.2. 表面修飾技術に利用する光反応性物質

光反応を使えば、光照射部のみに表面化学修飾できる。光反応を利用する表面パターン化技術としては、半導体微細加工の中核技術となっているマイクロリソグラフィや写真製版が著名であるが、基材に吸着材(剤)を化学固定化する、あるいは表面物性を微細に付与する技術としては用いられていなかった。高分子表面を改質するために、我々が開発した光修飾技術は光反応性基を利用するものである。用いた光反応性基はフェニルアジド基、ジチオカーバメート基、ベンゾフェノン基および o -ニトロベンジルエステル基である。前三者の官能基はUV照射により高反応性の活性種を生成し、これを用いて基材に化学固定する。例えば、フェニルアジド基はUV照射により高反応性のナイトレンに直ちに転化し、これが近傍の炭化水素より水素を引き抜いて共有結合を形成する。したがって、基材と吸着材との間に上記の反応が有効に起これば吸着材が基材に化学固定化されることになる。ジチオカーバメート基およびベンゾフェノン基はラジカルを発生し、基材表面からの水素引き抜きによる新しいラジカル生成および吸着高分子のラジカルとの再結合に固定されることになる。一方、 o -ニトロベンジルエステル基はUV照射によって容易にカルボキシル基を形成することが古くから知られている。したがって、上記のエステル基を導入した高分子表面では、UV照射部分のみに表面カルボキシル基が生成することになり、これと蛋白質アミノ基の縮合反応によって細胞接着促進あるいは抑制表面が創製できることになる。

光固定化は、(1)材料表面に光反応性基を導入し、合

成高分子、蛋白質、ペプチドを吸着させて光固定させる方法、および(2)光反応性基を導入した吸着材を吸着させ、光固定化する方法が考えられる。我々の経験では、いずれも有効であった。以下に我々が利用した光反応性基および高分子や蛋白質に導入する方法を述べる(表2に合成した光反応性物質の代表例を列記)。フェニルアジド基を有するモノマーと o -アジドスチレンおよび p -アジド安息香酸エチルアクリレートを合成し、これと種々のモノマーのラジカル共重合体を合成した。親水性表面を得たい場合には、コモノマーとしてジメチルアクリルアミド(表2:1)、疎水性の場合にはスチレン(表2:13)、正荷電を導入したい場合にはビニルピリジン(表2:15)、負荷電の場合には、スルホン化スチレンやアクリル酸を用いた。 p -アジド安息香酸が出発物質として利用できるため、アミノ化ポリマーに高分子反応でアジド安息香酸を容易に導入できる。ポリジメチルアクリルアミドとポリビニルアミンの共重合体(アクリルアミドとジメチルアクリルアミドの共重合体をホフマン分解によりアクリルアミド単位をアミノ化)およびポリアリルアミンとの高分子反応により、フェニルアジド基を側鎖に導入した(表2:2および14)。一方、吸着材が蛋白質の場合には、 p -アジド安息香酸と目的とする蛋白質を水溶性カルボジイミドでカップリングさせると光反応性蛋白質が容易に合成できた。光反応性フィブロネクチン、ゼラチンおよびアルブミン(表2:5, 8)である。また、細胞接着活性 RGD 配列含有ペプチドのN末端に p -アジド安息香酸を縮合させると、光感応性の接着活性ペプチド(表2:7)が合成できた。ポリエチレングリコール(表2:3)、長鎖アルキル基(表2:11)およびフッ素化アルキル基(表2:12)の末端にフェニルアジドを化学導入し、低分子型の光反応性修飾剤を合成した(表2:8~10)。ヒアルロン酸の尿酸基と p -アジド安息香酸を縮合すると、光反応性ヒアルロン酸(表2:10)が合成できた。これらの光反応性吸着材をコーティングし、紫外光照射すると、基材表面に化学固定化された。細胞接着性表面を与えるのは、疎水性、極性および適度の帯電を有するイオン性共重合体、ゼラチン、フィブロネクチン、接着性ペプチド、疎水性低分子化合物であった。一方非接着性は非イオン性の親水性共重合体、アルブミン、ヒアルロン酸、およびポリエチレングリコールであった。上記(2)の方法では、ポリ(o -アジドスチレン)あるいはポリ(p -アジド安息香酸エチルアクリレート)の薄膜をコーティングすると、吸着材と基材の同時接合が可能であった(表2:17, 18)。また、アミノ基を表面に有する高分子やガラスと p -アジド安息香酸の化学反応によ

Table 2 Phenylazide-modified photoreactive materials for surface modifications.

(A) Blood-Contacting Surface Layering

(B) Tissue-Contacting Surface Layering

(C) Bioerodable Surface Layering

(D) Others

(E) Adhesive Layer (Bonding between substrate and hydrogel)

Fig. 7 Photochemical surface modification at the artificial valve-installed portion of fabricated artificial heart.

Fig. 8 Platelet adhesional responses of polyurethane (PU) surface (right) and photochemically modified hydrophilic PU surface (left).

て光反応性基を表面に導入でき、これと吸着剤の光反応によって固定できた。実際に成型加工したデバイスにコーティングし、水晶オブティカル・ファイバで紫外光を誘導すると、複雑なるデバイスが表面加工できる。図7には、人工心臓の血栓が好発する部位である人工弁周辺の親水性高分子のグラフト反応を示し、処理前後の血小板粘着の差を図8に示した。

5. 細胞微細パターンの表面化学

細胞はそれ自体で生命活動を維持できる最小単位であり、生体内では集合して組織・器官を形成している。上皮性細胞は二次元組織、間質系細胞は三次元組織を形成するが、これらの組織化過程を生体外で任意に操作できれば、一次元～三次元ハイブリッド組織体が構築できることになる。接着依存性細胞は二次元平面(シャーレ)や三次元曲面(マイクロフェア)上で培養される。通常これらの表面で部分的に細胞を接着・増殖させることはできず、培養期間とともに細胞は増殖して全表面を覆ってしまう。細胞の接着・増殖および移動等の基本的な細胞行動を、細胞サイズのレベルで基材によって制御できれば、二次元および三次元表面で部分的に培養できることになり、細胞集団の人工的な組織化(パターン形成)を行うことができると考えられる。

発生や器官形成を研究している細胞生物学研究者は古くから細胞の接着や移動性を制御する試みを行ってきた。例えば、古くにはガラス表面にパラジウムあるいは金を微細蒸着した表面で、あるいは接着性蛋白質をあらかじめ吸着させた表面から蛋白質を物理的に部分的に

除去した表面で細胞パターン化が試みられている。最近では、マイクロマシニングやリソグラフィの技術を利用してガラスや金属酸化物表面を三次元的にエッチングして神経細胞の接着および神経突起の制御が試みられている。これらは細胞の接着性が、①表面性状や②形状(トポグラフィ)によって異なることを利用したもので、前者は細胞接着の表面選択性(Differential Adhesiveness)と呼ぶことができる。後者は接触誘導(Contact Guidance)と呼ばれ、細胞が鋭角の基材に好んで接着・増殖する性質を利用するものである。しかしながら、これらの表面では細胞接着初期ではパターン化できるものの、経時的にその形態は失われるのが普通であり、表面接着選択性の厳密なる設計が必要である。したがって、二次元平面で細胞接着性領域と非接着性領域を作製すれば、細胞の接着・移動・増殖の場を制限できることになる。任意のパターンを形成する第一段階は細胞接着領域の位置決め(Micropositioning)である。ここで紹介する細胞の微細パターン化技術は細胞の接着性の表面依存性を明確に意図して設計したものである。

5.1. 表面微細加工技術の原理

材料表面上で細胞サイズのレベルでこれらの相反する性質を部分的に形成できれば細胞接着・非接着の0/1(All or None)制御ができ、目的とするパターン培養できることになる。これを実現するために、(1)細胞接着性基材に非接着性表面を部分的に形成させるか、(2)逆に非接着性基材に接着性表面を部分形成させればよいことになる。このような微細表面加工を具体化するには、通常の溶液反応を利用する方法やコーティング法では細

胞レベルでの微細加工は至難である。原理は簡単であり、表2の光反応を用いればよいことになる。

5.2. 細胞の微細パターン形成

上記の(1), (2)いずれの方法によっても、吸着薄膜を溶媒キャストによって形成させてから、写真製版やIC回路に用いられるフォトマスクを被せUV照射すると吸着材が化学固定化されることになる(図9)。化学固定化されたことをX線光電子解析および接触角測定から確認した。血清中でも脱離することなく固定層は安定であった。基材と固定化吸着材の性質を大きく変えることによって、原理的には細胞のパターン化はフォトマスクに対してネガ型とポジ型の二種類が可能である。すなわち、基材が細胞付着性で吸着材が細胞非付着性であれば、細胞は未露光部のみに接着・増殖する。逆に、基材が非付着性で吸着材が細胞接着性であれば、上とは逆のパターン培養になる。

パターン培養の実例を示すと、基材に組織培養用ポリスチレンシャーレ、光修飾化材に非イオン性の親水性高分子(表2:1)をコーティングして光固定した後に血管内皮細胞を播種すると、図10中段(細胞はトリパンブルーで染色)に示した二次元パターン化組織が形成した(上段:用いたフォトマスクで、そのスペース幅は200ミクロン)。一方、細胞非接着性のポリビニルアルコール(PVA)表面に疎水性の光反応性共重合体(表2:13)で修飾すると、図10下段のパターン化が得られた(中段・下段の二次元パターンはフォトマスクに対してネガおよ

びポジ型である)。同様な方法により形成したパターンをホフマン分解位相差顕微鏡で拡大観察すると、細胞は非接着面には接着・増殖せず、接着性表面のみに増殖して二次元組織が形成されており、血管内皮細胞では1カ月以上にわたってパターンは維持された(図11)。一方、細胞サイズの25ミクロン幅のフォトマスクで表面微細加工すると、細胞が二列に配向し、線幅を15ミクロンにすると、細胞の一次元配列が実現した(図12)。上記の帯状のフォトマスクではなく、円型のフォトマスクにより修飾した表面では、直径数十ミクロンでは3~4個の細胞よりなる無配向のコロニーが形成した。光反応性接着活性ペプチド(表2:7)をPVA表面に光固定する、あるいは組織培養シャーレに光反応性ポリエチレングリコール(表2:3)を化学固定すると、細胞は接着性表面のみに接着・増殖しパターン形成が同様にできた。

接着性あるいは非接着性の蛋白質を表面微細領域に化学固定して細胞パターンを形成させることができる。活性エステル基を側鎖に有する光反応性共重合体(表2:6)を用いると、光照射部に細胞接着性あるいは非接着性の蛋白質を化学固定できた。また、光反応性アルブミン

Fig. 9 Surface modification process leading to cellular patterning via photochemical reaction.

Fig. 10 Photomask's pattern (upper) and cellular patterns on resultant modified surfaces (middle and lower).

Fig. 11 Hofman-modulated contrast microscopic picture of cellular pattern (width : 200 microns).

Fig. 12 One-dimensional cellular array (width : 15 microns).

Fig. 13 Three-dimensional cellular aggregates on modified surfaces which were grooved by an excimer laser irradiation and modified by photochemical graft polymerization.

Fig. 14 Growing two-dimensional tissue (Glia cells under Hofman-modulated microscope).

Fig. 15 Neural network prepared on the photochemically processed surface (neuron cells, scanning electron microscope).

(表2:5)を吸着・光固定すると、光照射部のみがアルブミン固定された。これは、抗体染色法による視覚化より確認した。原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy) で観察すると、光照射部と未照射部は明瞭なる境界を有しており、本技術が高精度の微細加工技術であることがわかった。o-ニトロベンジルエステルを側鎖に有するポリマーをコーティングし、光照射すると、表面にカルボキシル基が生成し、縮合剤を用いるとアルブミンが固定できた。いずれも基材と蛋白質の組み合わせを選択することにより、パターン形成は可能である。

固定化吸着材の膜厚が細胞サイズよりも大きくなると、三次元レベルでのパターン培養が原理的に可能である。固定化膜厚を約10ミクロンにすると、基材表面に凸凹の溝と土手を有する三次元構造ができ、この場合に

も表面の選択的接着性によって、土手の上のみ、あるいは溝だけに細胞は接着・増殖をすることができるようになった。より簡便には、上述の光反応による表面化学修飾とエキシマ・レーザ (KrF: 248 nm) によるアブレーションを組み合わせると、容易に表面接着性・非接着性を持った三次元パターン化ができた (図13)。

一方、神経細胞を用いると、神経の人工回路網ができることが容易に予想される。株化神経グリア細胞 (C6) を播種すると、細胞は微細な接着部分のみを確認して回路を構築していく過程がわかる (図14)。神経ニューロ細胞は血管内皮細胞等とは異なり、神経細胞成長因子 (NGF) の添加により分化して増殖が抑制されると同時に、軸索 (axon) が成長して細胞間を連結する。任意の回路網 (Neural Network) を形成するためには、細胞接着の位置決めが必須である。親水性高分子 (表2:1) を光固定し、未露光部にコラーゲンを吸着させ、神経細胞の機能を有する PC-12 細胞を播種した後に NGF を添加すると、図15に示したようにニューラル・ネットワークが形成した。

6. 結 語

細胞接着は細胞と接着性蛋白質のレセプター・リガンドの相互作用によるが、この接着活性リガンド (Arg-Gly-Asp ペプチド) をバイオマテリアルに組み込むことによって人工的な細胞外マトリックスを分子設計できた。非イオン性の親水性表面物性による細胞非接着の場と接着の場を微細に表面加工する光化学によって人為的に細胞の基本行動 (接着・伸展・移動・増殖) を制御できるといえる。

(平成5年9月16日受理)

文 献

引用文献は筆者らの研究のみに限定した。1)~16)は細胞接着機構、17)~26)はバイオアクティブ・バイオポリマーの分子設計、27)~56)は光反応による表面改質化学に関する報告である。

- 1) 巽 英介, 松田武久, 岩田博夫, 高野久輝, 阿久津哲造, 人工臓器, 17, 504 (1988)
- 2) 巽 英介, 松田武久, 岩田博夫, 妙中義之, 野田裕幸, 木下正之, 関井浩義, 矢倉明彦, 高野久輝, 阿久津哲造, 人工臓器, 17, 1354 (1988)
- 3) 巽 英介, 松田武久, 妙中義之, 野田裕幸, 木下正之, 高野久輝, 阿久津哲造, 日心外会誌, 18(1), 99 (1988)
- 4) E. Tatsumi, T. Matsuda, H. Iwata, H. Takano, T. Akutsu, Trans. Am. Soc. Intern. Organs, 36, 813 (1989)
- 5) T. Matsuda, Nephrology Dialys Transplantation, 4,

- 60 (1989)
- 6) Y. Takemoto, T. Matsuda, E. Ozeki, T. Kishimoto, M. Maekawa, T. Akutsu, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 35, 325 (1989)
- 7) Y. Takemoto, T. Matsuda, T. Kishimoto, M. Maekawa, T. Akutsu, *Trans. A. Soc. Artif. Intern. Organs*, 35, 354 (1989)
- 8) 武本佳昭, 松田武久, 阿久津哲造, 人工臓器, 18, 381 (1989)
- 9) 武本佳昭, 松田武久, 阿久津哲造, 人工臓器, 18, 1179 (1989)
- 10) 北村たかね, 松田武久, 阿久津哲造, 人工臓器, 18, 54 (1989)
- 11) 松田武久, 人工臓器, 19, 1034 (1990)
- 12) 松田武久, 細胞を活性化する高分子材料, 医療のための新しい材料—生体機能性材料の新展開—(クバプロ), p.65 (1991)
- 13) T. Matsuda, Biological Responses at Artificial Surfaces and Recent Progress in Extracorporeal Circulation. Hemostasis and Circulation, Springer-Verlag, p.169 (1992)
- 14) S. Ito, T. Matsuda, Y. Takemoto, K. Yamamoto, T. Kishimoto, M. Maekawa, *Intern. J. Artif. Organs*, 15, 737 (1992)
- 15) 伊藤 聡, 松田武久, 武本佳昭, 前川正信, 岸本武利, 人工臓器, 22, 947 (1993)
- 16) 松田武久, バイオアクチベーター, 高分子機能材料シリーズ8「生命工学材料」第1章“タンパク質工学と材料”第5節, 共立出版(1992)
- 17) T. Matsuda, A. Kondo, H. Iwata, K. Makino, T. Akutsu, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 35, 677 (1989)
- 18) T. Matsuda, E. Ozeki, T. Akutsu, *Artif. Organs*, 14, 110 (1990)
- 19) E. Ozeki, T. Matsuda, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 36, 195 (1990)
- 20) E. Ozeki, T. Matsuda, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 36, 195 (1990)
- 21) 小関英一, 松田武久, 阿久津哲造, 人工臓器, 19, 1078 (1990)
- 22) T. Matsuda, M.J. Moghaddam, *ASAIO Trans.*, 37, 196 (1991)
- 23) M.J. Moghaddam, T. Matsuda, *ASAIO Trans.*, 37, 437 (1991).
- 24) M. Takatsuka, A. Kishida, T. Matsuda, *ASAIO Journal*, 38, M 275 (1992)
- 25) 高塚旨寛, 松田武久, 人工臓器, 22, 412 (1993)
- 26) T. Matsuda, M.J. Moghaddam, *Biomimetic Materials, Sensors and Systems*, 1, 37 (1993)
- 27) T. Matsuda, K. Inoue, E. Ozeki, T. Akutsu, *Artif. Organs*, 14, 193 (1990)
- 28) T. Matsuda, K. Inoue, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 36, 161 (1990)
- 29) T. Matsuda, K. Inoue, T. Sugawara, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 36, 195 (1990)
- 30) 松田武久, 井上和彦, 阿久津哲造, 人工臓器, 19, 1177 (1990)
- 31) 松田武久, 井上和彦, 阿久津哲造, 人工臓器, 19, 1143 (1990)
- 32) 松田武久, 高分子, 39, 873 (1990)
- 33) 松田武久, 精密工学会誌, 56, 2197 (1990)
- 34) 松田武久, マイクロマシン研究会雑誌, 3, 2 (1990)
- 35) 松田武久, 井上和彦, 阿久津哲造, 人工臓器, 19, 1143 (1990)
- 36) T. Matsuda, K. Inoue, T. Sugawara, T. Akutsu, Novel Photoreactive Surface Process Technology for Fabricated Devices, Artificial. Heart-3, Springer-Verlag, p.69 (1991)
- 37) 高塚旨寛, 松田武久, 人工臓器, 20, 493 (1991)
- 38) Y. Nakayama, T. Matsuda, *ASAIO Journal*, 38, M 421 (1992)
- 39) T. Matsuda, T. Sugawara, *ASAIO Journal*, 38, M 243 (1992)
- 40) T. Matsuda, M.J. Moghaddam, H. Miwa, K. Sakurai, F. Iida, *ASAIO Journal*, 38, M 154 (1992)
- 41) Y. Nakayama, T. Matsuda, *J. Polymer Science*, 30, 2451 (1992)
- 42) A. Kishida, M. Takatsuka, T. Matsuda, *Biomaterials*, 13, 924 (1992)
- 43) 松田武久, 生体材料, 10, 18 (1992)
- 44) 高塚旨寛, 岸田晶夫, 松田武久, 人工臓器, 21, 191 (1992)
- 45) 菅原 隆, 松田武久, 人工臓器, 21, 186 (1992)
- 46) 菅原隆, 松田武久, 人工臓器, 21, 234 (1992)
- 47) 岸田晶夫, 高塚旨寛, 松田武久, 人工臓器, 21, 196 (1992)
- 48) 阿久津哲造, 松田武久, 人工生体材料, 新外科学大系11, 中山書店, p.319 (1992)
- 49) 松田武久, 耐生体内環境技術またはマイクロマシンの表面機能化, マイクロマシン技術による製品小型化知能化事典, 産業調査会事典出版センター, p.579 (1992)
- 50) 松田武久, 高分子, 41, 714 (1992)
- 51) 松田武久, マイクロマシンの表面微細加工技術とパターン化細胞培養技術, マイクロメカニカルシステム(樋口俊郎, 生田幸士編, フジテクノシステム) IV編 3章 7節, p.682 (1992)
- 52) Y. Nakayama, T. Matsuda, *J Polym Sci. Polym. Chem.*, 31, 977 (1993)
- 53) 菅原 隆, 松田武久, 人工臓器, 22, 407 (1993)
- 54) 中山泰秀, 松田武久, 人工臓器, 22, 394 (1993)
- 55) 高塚旨寛, 松田武久, 人工臓器, 22, 403 (1993)
- 56) T. Matsuda, Photoinduced Surface Microprocessing for Fabricated Devices, ed. by T. Akutsu, Artificial Heart-4, Springer-Verlag, Tokyo, p.47 (1993)