

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300176

研究課題名（和文） 細胞表面工学による次世代ナノバイオマテリアルの創製

研究課題名（英文） Development of next generation nano-biomaterials by cell surface engineering

研究代表者

藤本 啓二 (FUJIMOTO KEIJI)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号：70229045

研究成果の概要（和文）：

細胞表面にポリマーからなるシールド層を形成させ、さらに外側に種々のバイオアフィニティを提示させることにより多様な細胞からなる組織体を形成させた。次に組織再生を視野に入れた細胞の構造化に向けた表面改質条件の検討を行った。また、このアフィニティを利用して基板上に細胞を2次元あるいは3次元状に配列し、セルチップなどの技術への展開をはかるための基盤技術の確立を行った。また、リガンド・レセプター間結合を高め、細胞表面改質のために、リガンド固定化部位、光反応性部位、アフィニティ部位および解離性部位からなる多機能性ナノ分子（ポリマーナノツール）を作製した。これにより、細胞の移動性を光によって制御することができた。

研究成果の概要（英文）：

We tried an approach to construct 2- and 3-dimensional tissues using a ligand-immobilized polymer chain as an artificial extracellular matrix. This technique based on the cell-agglomerate engineering allowed the efficient cellular coating of artificial materials with complicated shapes for improvement of biocompatibility and facilitation of tissue reconstruction. Next, we proposed a novel method for enhancing ligand-receptor binding and modifying cell surface as artificial material. So, we prepared a multi-functional polymer (polymer nano-tool) consisted of ligand, photo-reactive group, biotin and disulfide. We found that cells modified with biotin-carrying nano-tools specifically adhered to an avidin-immobilized plate and the formation of cell agglomerates was mediated by adding avidin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：バイオマテリアル

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学

1. 研究開始当初の背景

近年、人工臓器などの医用材料工学、再生医療を目指した組織工学、さらにバイオチッ

プといった生体計測の分野において、生体成分と接触して用いるマテリアルの開発が盛んに行われている。多くの研究はマテリアル

を生体に適合化させるという観点から行われている。一方、われわれは生体に働きかけて機能発現させるという観点からマテリアルの開発を行ってきた。本研究では細胞表面における分子認識とシグナル変換に注目し、これらの情報を生み出している生体分子の階層性をマテリアルデザインのモチーフとしている。このような階層性は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細胞骨格系構造体の動的な変化と関係している。従って、これらの挙動を人為的に操作することにより細胞の認識と応答を制御できるのではないかとこの発想に至った。高次の階層性を持つ構造体はナノレベルでの変動によって情報を伝えるため、マテリアルをナノレベルでデザインすることが有効である。ポリマー鎖はちょうどナノレベルの素材であり、生体システムに作用するようにデザインすることも可能である。

2. 研究の目的

(1) 細胞認識を調節するナノバイオマテリアルの創製

細胞表面にポリマー鎖を導入することにより、細胞-細胞間あるいは細胞-基質間における分子認識を遮蔽することができる。われわれと同じような研究を行っているグループとして、Bertozziらは糖鎖の生合成を利用した細胞表面の改質を行っている。これは細胞表面にケトン基を有する糖鎖を発現させて、化学的な改質の足場をつくり出すものである (Science 276, 1125-1128 (1997))。また、Saltzmanらは複数の細胞接着性ペプチドを結合させたポリマー鎖を用いて細胞に導入している (J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 9, 207-226 (1998))。このような研究から、鎖の末端にバイオアフィニティ、反応性、あるいは活性化因子を結合させることにより細胞表面に別の機能を持たせるという着想を得た。これは単に表面をシールドするものではなく、細胞同士を同種あるいは異種で凝集させることを可能とする。本研究ではさらに発展させて、特定の細胞を捕らえて作用を与える機能を細胞に付与すること、特定の部位に細胞を集積すること、およびデリバリーすることを行う。さらに、細胞に化学反応性を付与して多様な基材に細胞をパターンニングすることも試みる。

(2) 細胞機能を制御するナノバイオマテリアルの創製

細胞は外部からの情報を表面のレセプターで認識して内部に伝達する。このような特異的なシグナル伝達はレセプターの構造変化、会合、および脱離といった分子の階層性が本質である。このとき、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。

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ある (D.M.Spencer, et al., Science, 262, 1019-1024 (1993))。T細胞の活性化においても抗原提示細胞との接着部位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いる (A.Grakoui, et al., Science, 285, 221-227 (1999))。これらの生物学的なアプローチに対して工学的な観点から、レセプターのクラスター化を通して生体分子の階層を組み上げるといったコンセプトへと発展させることができる。すなわち、ナノスケールのマテリアルを用いて特定のレセプターのクラスター化を引き起こすことにより機能を発現できるのではないかと考えた。われわれはこれまでにリガンド固定化粒子を用いてアフィニティ分離を行ってきた (Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 27, 23-31, 2003)。これを踏まえて、本研究ではポリマー鎖あるいは粒子を用いて細胞のレセプターを操作する (マニピュレーション) ことを行う。このマテリアルは多数のリガンドとレセプターの複合体の集合化を引き起こすことができるため、細胞に人工的な刺激を入力可能であり、機能発現を制御することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 細胞操作ツールとして、細胞膜に存在するインテグリンレセプターと特異的に結合する細胞接着性ペプチド Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) を固定化したリガンド固定化ポリマーを作製し、これを人工細胞外マトリックスとして細胞接着を操作して3次元組織構築を試みた。反応性モノマーである *N*-methacryloxysuccinimide (SuMA) に GRGDS ペプチドを反応させて GRGDS 固定化モノマーを作製し、*N,N*-dimethyl acrylamide (DMAA) と共重合することによりマルチリガンド型ポリマーを作製した。さらに Poly(ethylene oxide) (PEO) の両末端に GRGDS を固定化したダブルリガンド型ポリマーを作製した。これらのポリマーを正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に添加し、U型マイクロプレートを用いて細胞凝集体を作製した。

(2) リガンド固定化部位、光反応性部位、アフィニティ部位および解離性部位からなる多機能性ナノ分子 (ポリマーナノツール) を作製した。骨格分子としてビオチン部位を有するラベル化試薬 (Sulfo-SBED, Pierce) を用いて、この活性エステルと GRGDS を反応させてナノツール (SBED-GRGDS) を作製した。これをヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) へ添加し、キセノン光源 (MAX-301, 朝日分光) を用

いて照射(365 nm, 5 min)することで、細胞へのナノツールの光固定化により改質細胞を作製した。

(3)組織工学的な応用を目指し、細胞表面の改質を行うことで細胞接着挙動や集積化の制御を可能にする新規光反応性ポリマーツールの合成と評価を行った。その基本骨格となる高分子材料として、生体親和性が高いタンパク質である牛血清アルブミン(BSA)を選択した。次に、特定の細胞だけを操作するために、細胞接着性ペプチド GRGDS を BSA に固定化した。さらに、この結合を強固なものとするために、レセプターに結合した BSA と細胞表面との間に光反応によって共有結合を生じさせるデザインを施した。具体的には、BSA 上のアミノ基に光反応性部位である *N*-5-azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide (ANB-NOS)、蛍光物質である fluorescein isothiocyanate (FITC)、さらに GRGDS を導入した。

4. 研究成果

(1)リガンド固定化ポリマーを用いて細胞凝集体の形成過程を観察したところ、マルチリガンド型およびダブルリガンド型のどちらのポリマー鎖を用いた場合も、ポリマー鎖を用いない場合と比較して凝集体の形成が促進された。さらに、これらの凝集体を基板に播種すると、ダブルリガンド型ポリマーでは伸展性・増殖性が向上したのに対し、マルチリガンド型ポリマーにおいては伸展が抑制され、凝集体の形状が保持される傾向が見られた。ただし、マルチリガンド型ポリマーを用いた細胞凝集体においても溶媒中に共存したポリマーを除去することにより伸展性を向上させられることがわかった。これは、ダブルリガンド型ポリマーにおいては細胞を点で結び付けるが、マルチリガンド型ポリマーにおいては細胞同士を多点でかつ近距離で連結させるため、細胞間接着が増強されたものと考えている。細胞組織の再構築プロセスを制御することができ、分散状態の細胞にはない性質を付与できる可能性を見出した。

(2)ポリマーを用いることにより形成させた細胞凝集体の崩壊過程について詳細に検討を行った。凝集体をコラーゲンコートした基板に播種すると、ポリマーを作用させていない凝集体は端からゆっくりと崩壊が起り、個々の細胞は伸展して移動したのに対し、ポリマーを作用させた凝集体の崩壊は速く、細胞は丸い形状で移動する様子が観察された。これはポリマーによって細胞表面が覆われることにより、細胞-細胞間および細胞-基板間の接着性が低下したことによると考えられる。さらに培養を続けると、ポリマーの脱離と共に細胞は徐々に伸展するようにな

った。また、ポリマーを作用させることにより凝集体を形成する細胞の増殖性は抑制された。

次に、凝集体を適切な環境(足場、液性因子など)下で培養することにより、細胞の3次元超構造体の構築を試みた。複数の凝集体を隣接して配置すると、凝集体どうしが相互作用することによって、分散状態で播種した際には見られない細胞の伸展が観察された。ファイバー、チューブ、球体といった複雑な形状の基材上で培養を試みたところ、凝集体の崩壊および細胞の伸展に伴って基材表面を3次元的に被覆する様子が観察された。このことは、複雑な形状を有した人工材料(ステントや人工血管など)を効率的に細胞で被覆可能であることを示唆しており、基材の生体適合性の向上や生体内での組織再構築の促進など、組織工学的応用が期待できる。

(3)リガンド・レセプター間結合を高めた細胞の表層改質を行った。この固定化により細胞表層にビオチンが導入されたことから、ビオチン-アビジン結合を利用することにより、アビジン固定化基板への細胞の集積化および細胞凝集体の形成が可能であった。次にタイムラプス顕微鏡観察によって改質細胞の移動性と伸展性について検討したところ、改質細胞の移動性に有意な低下が見られた。これは、細胞側のインテグリンレセプターとナノツールのペプチドリガンドとの結合が強固であるため、細胞周囲をナノツールが細胞外マトリックスのように取り囲んでいるためだと考えている。このように細胞の移動性を光によって制御し、かつ低下させることはガン細胞の転移・進行を抑制することにもつながると考えられる。リガンド・レセプターの組み合わせによって、ナノツールを幅広く医療分野へ応用することが期待できる。

(4)光反応により細胞接着挙動や集積化の制御を可能にするために、BSA に ANB-NOS と FITC を導入したポリマーツールをポリスチレン基板上に滴下して紫外光を照射したところ、光を照射した部分のみにポリマーツールを固定化することができた。これにより光反応性を確認することができた。次に、ポリマーツールに GRGDS を導入して細胞接着性かつ光反応性を有するポリマーナノツール(Photo-reactive BSA-GRGDS)を作製し、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)と混合した後に蛍光観察した。レセプターを GRGDS によってブロックした細胞の結果と GRGDS を持たないポリマーナノツール(Photo-reactive BSA)を用いた結果と比較して、前者がより多く細胞表面に結合していることを見出した。また、U型マイクロプレート中で細胞凝集体を作製した後に紫外光を照射したところ、Photo-reactive BSA-GRGDS を添加した場合に

凝集体がより速く崩壊する傾向が見られた。これはBSAが個々の細胞に強固に結合することで細胞間の立体反発がより強く働いたためであると考えている。以上、細胞接着挙動や集積化の制御を可能にする新規光反応性ポリマーツールのプロトタイプを合成することができた。

生体物質間の相互作用が抑制するように改質された細胞は、免疫隔離作用により異種間での細胞利用に応用できると考えられる。細胞移植にも利用でき、細胞デリバリーを通じた細胞療法および細胞性製剤への応用も考えられる。この技術を用いた細胞の集積化はセルチップおよびセンサーの作製、さらには組織工学・再生医療へも利用することができる。物質を提示させる場として細胞表層をとらえると、抗原-抗体反応など生体特異的相互作用を解析するための技術として発展させることも考えられる。さらに、癌細胞など特定の細胞にアポトーシスを誘導するなど新規の薬理効果をもつポリマードラッグとしても位置付けて研究を行うことができる。

本研究は細胞とマテリアル間のサイズと作用する力のスケールを合致させたデザインによって、機能発現を制御する技術、あるいは全く新しい機能を発現させる技術を開発しようとするものである。また、学術的には生体の“ありかた”をナノバイオサイエンスとして学んで、“ものづくり”に活用しようという取り組みである。さらに、この研究により、医用材料をはじめとする生医学分野の研究にデザイン機軸と基盤技術を提供できるといった波及効果が期待できる。また、再生医療の新しい可能性を提示するものであり、生活の質の向上など社会への波及効果も大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- (1)S.Kaihara, Y.Suzuki and K.Fujimoto, “In situ synthesis of polysaccharide nanoparticles via polyion complex of carboxymethyl cellulose and chitosan”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有り 85, 343-348 (2011).
- (2)Y.Fukui and K.Fujimoto, The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome, Langmuir, 査読有り 25, 10020-10025 (2009).
- (3)M.Miura and K.Fujimoto, Formation and recovery of a cell sheet by a particle monolayer with the surface roughness, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有り 66, 125-133 (2008).
- (4)K.Fujimoto, Y.Fukui and T.Toyoda, Preparation of bionanocapsules by the layer-by-

layer deposition of polypeptides onto a liposome, Macromolecules, 査読有り 40, 5122-5128 (2007).

〔学会発表〕(計19件)

- (1)K.Fujimoto, “Simple Designs of Nanobio-Materials by Learning from Bio-Interfaces”, NIMS Week 2009, 2009年7月22日, Tsukuba.
- (2)M.Miura and K.Fujimoto, Effect of nano-scale roughness on detachment of a cell sheet from a particle monolayer, The 8th World Biomaterials Congress, 2008年5月28日, Amsterdam, The Netherlands

〔図書〕(計7件)

- (1) 藤本啓二, 貝原祥子, 東京医学館, バイオマテリアルの基礎, 2010, 242-245.
- (2)藤本啓二, 化学工業社, 生体に学ぶ微粒子材料の創製, 2008, 13-18.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.applc.keio.ac.jp/~fujimoto/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 啓二 (FUJIMOTO KEIJI)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：70229045

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし