

博士論文（要約）

ポリマーナノ相分離構造によるタンパク質吸着状態
の制御と誘起される細胞接着

Control of adsorbed proteins by nanoscale phase-separated
polymer structures and subsequent induction of cell
adhesion

平口 侑香里

再生医療・組織工学において用いられる材料の設計には、その使用用途に応じて表面への細胞接着を制御することが必要である。細胞は材料表面に吸着したタンパク質を足場として接着するため、細胞接着の理解には吸着タンパク質を含めた議論が重要である。一般的に濡れ性や表面電位、官能基などの材料表面の物性が、吸着するタンパク質量に大きな影響を与えることはよく知られている[1-2]。しかし、近年、上述の物性以外にも表面のナノスケール構造がタンパク質吸着に影響を与えることが報告されている[3-5]。表面のナノ構造によってタンパク質吸着がナノスケールで制御され、結果として細胞接着に影響を与えていると考えられている。例として、25 nm程度のドット状のタンパク質吸着部位を有する構造と、その逆パターン（逆ドット）のナノ構造を相分離構造によって作製した場合、吸着したタンパク質吸着量や密度が等しいにも関わらず細胞の接着性が異なることが報告されている[3]。また、20 – 200 nmのポアサイズの異なるナノ構造体や2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)とstyrene (STY)から成るブロックコポリマーなどの微細なナノ相分離構造表面上では、タンパク質吸着が起こるものの、その後の血小板活性や補体活性が抑制されていたことが報告されている[4-5]。以上のような結果から、吸着するタンパク質の種類やその構造変化や配向といった吸着状態が、ナノ構造体によって制御されているため、引き続いて起こる反応に影響を及ぼしているのではないかと考察されている。そのために、ポリマーの微細構造やトポグラフィーがタンパク質や細胞に与える影響も調べることで、新しい生体適合性材料の開発へとつながることを期待している。しかし、ナノ/マイクロ構造がタンパク質吸着にどのように影響を与えているか、巨視的な解析しか行われておらず、タンパク質のサイズに合わせたナノスケールでの解析が必要である。そこで本研究では、両ナノ構造体がタンパク質吸着、引き続き起こる細胞接着にどのように影響を与えるか解析を行った。

本研究では吸着タンパク質を制御するため両親媒性ブロックコポリマーを用いた。両親媒性ブロックコポリマーは親水性部位と疎水性部位の自己組織化によりナノスケールの相分離構造表面をつくる。タンパク質吸着を抑制することで知られる poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC)を親水性部位として含んだ両親媒性ブロックコポリマーを用い、疎水性ドメインがドット状となるナノ相分離構造表面上では、疎水性ドメインに選択的にタンパク質が吸着することが先行研究により報告されている[6]。そこで本研究では親水性のPMPCと、疎水性の poly(3-(methacryloyloxy)propyltris(trimethylsilyloxy)silane) (PMPTSSi)からなる両親媒性ブロックコポリマーを用い、疎水性部位がマトリックスを形成している表面とドット状ドメインを形成している表面を作製した。前者の表面ではタンパク質はマトリックス上つまり連続的に、後者ではドット状ドメイン上つまり点在して吸着すると考えられる。また、両親媒性ブロックコポリマーの分子量を大きくすることで、疎水性ドット状ドメインのサイズを大きくすることが可能である[7]。そこで、ナノ相分離構造のパターンの違いや疎水性ドット状ドメインのサイズの違いによってタンパク質の吸着状態がどのよ

うに異なるかより詳細に解析し、それによる細胞接着挙動の違いを観察した。

タンパク質吸着や細胞接着は様々な材料の表面物性に影響を受けるため、第二章では作製したナノ相分離表面の構造や物性を評価した。親水性部位にPMPC、疎水性部位にPMPTSSiをほぼ等しい組成比で有する両親媒性ブロックコポリマーpoly(MPTSSi-*block*-MPC)とpoly(MPTSSi-*block*-MPC-*block*-MPTSSi)をそれぞれ可逆的付加開裂連鎖移動重合によって合成した。相分離構造のサイズを変えるため鎖長の異なるpoly(MPTSSi-*block*-MPC-*block*-MPTSSi)を4種類作製した。以下poly(MPTSSi-*block*-MPC)をBP1, poly(MPTSSi-*block*-MPC-*block*-MPTSSi)の鎖長の短いポリマーから順にBP2, BP3, BP4, BP5と表す。相分離構造をTEMで観察した結果、BP1では親水性部位がドット状ドメインを形成していたが、BP2, BP3, BP4, BP5では逆に疎水性部位がドット状ドメインを形成していた。また、BP2, BP3, BP4, BP5では、疎水性ドット状ドメインのサイズが10, 19, 27, 49 nmと大きくなり(Fig. 1), これは鎖長が長くなったことによる変化だと考えられる[7]。

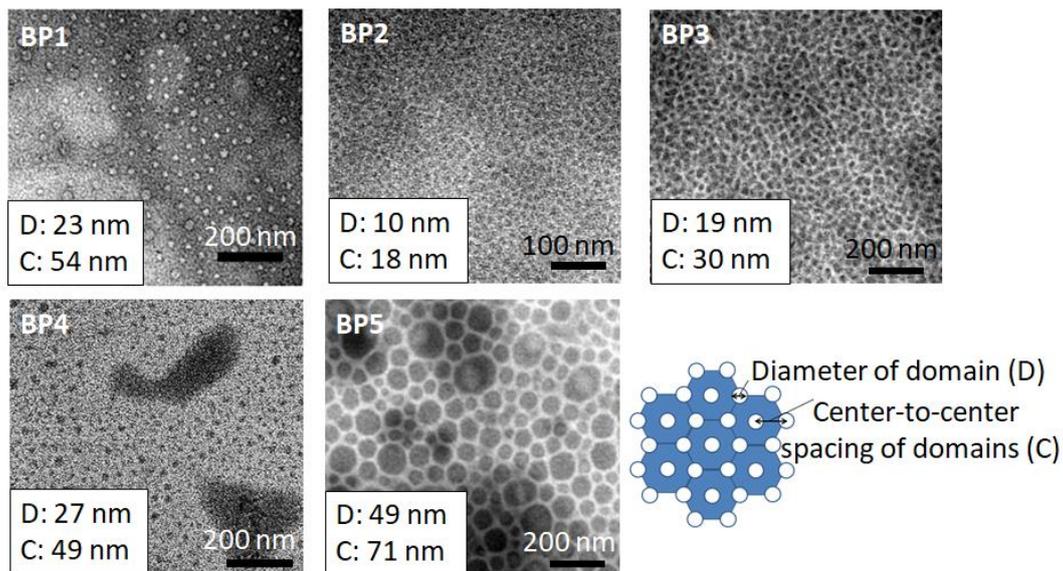


Fig. 1. TEMによる相分離構造観察結果。黒が疎水性、白が親水性部位を示している。

第三章では、ナノ相分離構造が細胞接着に与える影響を明らかにすることを目的とした。各ポリマーをスピコートした基板へのフィブロネクチン吸着量 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を水晶振動子マイクロバランス (QCM-D)を用いて測定した。その結果、フィブロネクチン分子のサイズ(15.5 nm [8])よりも十分に大きな疎水性ドット状ドメインを有するBP4, BP5では吸着が見られたが、小さな疎水性ドメインを有する表面では吸着が抑えられたことがわかった。また、タンパク質吸着量に有意差がなく、ナノ相分離構造のサイズがほぼ等しいBP1, BP4を用いて、タンパク質の吸着状態が異なる表面での、細胞接着を評

価した。次に、L929マウス線維芽細胞を無血清培地で播種し、播種後2 hと1 dayの接着形態を観察した。播種2 h後ではBP1, BP4で細胞の接着形態に違いが観察された。BP1では異方的な伸展が見られたが、BP2では等方的に接着していた。さらに、細胞接着の違いを解析するため、吸着によるタンパク質分子の構造変化を見積もった。フィブロネクチン分子は材料表面に吸着し構造変化を起こすことで、RGDモチーフが露出するとされている[9]。そこで、表面に露出したRGDモチーフの量をELISA法により測定した。レファレンスとして、一様に表面が疎水性であるPMPTSSiとCH₃-SAMについても同様に測定を行った。疎水性部位に存在するRGDモチーフの密度がBP4 > BP1 > PMPTSSi > CH₃-SAMとなり、相分離構造上で高密度にRGDモチーフが存在していることがわかった。細胞接着の結果とあわせて考察すると、疎水性部位が支配的な表面では、露出したRGDモチーフの密度が高いほど接着初期の真円度が低い傾向にあった。以上のことから、相分離構造によって構造変化が誘起されRGDの密度が上がったことで、細胞の伸展が速くなったと考えられる。一方、BP4ではRGDモチーフが高密度に存在しているにも関わらず、真円度が高かった、インテグリンの凝集が阻害され、強い焦点接着が形成できなかったと考えられるため、次に焦点接着の形成を蛍光染色にて観察した。アクチンフィラメントとパキシリン に蛍光を固定化し、それらの発現位置を確認したところ、接着3 h後にはBP4以外のBP1, PMPTSSi, CH₃-SAMで焦点接着が確認された。しかし播種1 day後にはすべての表面で接着斑の形成が確認された。以上のことから、BP4では接着初期で焦点接着の形成が遅れていることがわかった。BP4ではタンパク質非吸着エリアであるPMPC相が、疎水性ドット状ドメインの間に存在していることが要因で、インテグリンの凝集が遅れていたと考えられる。一方、BP1ではナノ構造が存在することによりフィブロネクチンの構造変化が誘起され、PMPTSSiに比べて露出したRGDモチーフ密度が高かったため、伸展が早かったと考えられる。

第四章では、タンパク質吸着における、ナノ構造体のサイズとタンパク質分子のサイズの関係性について解析を行った。第三章にて、疎水性部位のサイズが異なるナノ相分離上でのフィブロネクチンの吸着量を測定したところ、フィブロネクチン分子のサイズよりも十分に大きな疎水性ドット状ドメインを有する表面では吸着が見られたが、小さな疎水性ドメインを有する表面では吸着が抑えられたことを報告した。そこで、サイズの異なる数種類のタンパク質分子を用いて、サイズとの相関について解析を行った。まずはフィブロネクチン分子よりもサイズの大きなフィブリノーゲン分子(47.5 × 6.5 × 5.0 nm [10])を用いた。フィブリノーゲン分子は作製した相分離構造よりも大きな分子であったため、BP2 ~ BP5の全ての表面で吸着が確認できなかった。さらに、小さなサイズのタンパク質分子としてリゾチウム(7.7 × 7.7 × 3.7 nm [11])を用いた。リゾチウム分子は作製した全ての相分離構造上で吸着が確認された。以上の3種のタンパク質分子の吸着から、タンパク質分子のサイズよりも十分大きな吸着サイトを有するナノ構造体上にはタンパク質は吸着可能だが、分子サイズよりも小さな吸着サイトのナノ構造体上には

吸着できないことが示唆された。さらに、リゾチウムにおける吸着等温線を測定すると、疎水性部位の総面積が小さな表面において、リゾチウムが高密度に吸着していることがわかった。フィブロネクチン分子についても同様の傾向が確認された。以上のことから、タンパク質分子は吸着サイトが狭い表面では、凝集して吸着することが示唆された。

第五章では、第二章から第四章の総括を行った。ナノ相分離構造が誘起するタンパク質吸着状態と、それに応じた細胞接着の影響をまとめることで、タンパク質吸着と細胞接着における材料の新たなパラメータを提示した。以上の実験結果から微細な親疎水性部位を有する材料とタンパク質間相互作用の理解につながったと言える。また、作製したナノ相分離構造が、抗血栓性材料や擬似細胞膜などの新たなバイオマテリアルにつながることを報告した。

参考文献

- [1] Y Arima, *et al.*, *J Mater Chem.*, 2007.
- [2] Y Arima *et al.*, *Biomaterials*, 2007.
- [3] Y Hiraguchi, *et al.*, *Acta Biomater.*, 2014.
- [4] C Nojiri, *et al.*, *J Biomed Mater Res.*, 1990.
- [5] N Ferraz, *et al.*, *J Biomed Mater Res A.*, 2008.
- [6] JH Seo, *et al.*, *Biomaterials*, 2009.
- [7] Y Hiraguchi, *et al.*, *Polymer*, 2016.
- [8] VE Koteliansky, *et al.*, *Eur J Biochem.*, 1981.
- [9] T Hoshiba, *et al.*, *Adv Healthcare Mater.*, 2014.
- [10] M Cieřła, *et al.*, *Langmuir*, 2013.
- [11] MS Weiss, *et al.*, *Acta Crystallogr D*, 2000.