

博士論文 (要約)

細胞との相互作用制御に向けた双性イオン型ポリ
マーブラシの設計と精密合成

Design and fabrication of zwitterionic polymer
brush to control cell-material interaction

東 倫之

第1章 緒言

表面修飾技術は、医学・工学様々な分野において重要である。本研究では、特にポリマーブラシ技術に注目した。表面開始型のラジカル重合法とリビングラジカル重合法を組み合わせることで、構造の制御されたこれまでにない高密度なポリマーからなる表面修飾が可能となる。リビングラジカル重合法が適応可能なモノマー種からなる様々な表面物性の実現できる点も魅力的である。表面から直接重合することで、これまでのコーティング法などでは実現不可能であった高密度が実現可能となった。ポリマーブラシ技術は、膜厚を含む構造、表面化学物性さらには高密度に由来する機械的特性が制御できるため、医用応用を含めた新たな材料設計指針を与えることが可能な表面技術と考えられる。

医用材料と生体との相互作用は複雑であるが、大きく分けて、タンパク質の医用材料への吸着、タンパク質層への細胞の接着、接着した細胞による生体反応の惹起というステップに分けられる。タンパク質の吸着を抑制することで、その後の細胞接着・生体反応の惹起は抑制できる。しかしながら、人工血管などでは細胞の接着を誘起することで生体と適合する、というアプローチも有効であることから、細胞接着挙動を制御することが重要であると考えた。そこで、タンパク質の吸着・細胞接着挙動の制御が可能な材料設計指針をポリマーブラシ技術を用いることで探索した。

第2章 双性イオン型ポリマーブラシの構造と細胞接着

生体物質と表面修飾膜の相互作用には、膜の構造が深く関係している。そこで、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)およびpolyethylene glycol (PEG)を基盤としたコーティング・単分子膜・ポリマーブラシの作製を行い、それぞれの構造をX線反射率測定法にて解析した。ポリマーコート膜は、低密度であり膜厚も薄かった。単分子膜は、高密度であるが膜厚は薄かった。ポリマーブラシは、高密度であり膜厚も厚かった。タンパク質吸着量を評価したところ、PEGを基盤とした単分子膜のみにタンパク質吸着が認められた。単分子ではPEGに由来する排除体積効果が弱いためと考えられる。また、細胞接着挙動を評価した。ポリマーブラシでは、細胞接着が大きく抑制された。表面が高密度であることおよび排除体積効果(高分子効果)が十分である場合に、タンパク質吸着ならびに細胞接着が効果的に抑制されることが示された。

第3章 双性イオン型ポリマーブラシの機械的特性と細胞接着

材料の機械的特性が幹細胞の分化に影響を与えることが知られている。特異な機械的特性を有する低タンパク質吸着・低細胞接着表面に細胞を接着させることで、細胞-材料間相互作用の制御を試みた。MPCからなるポリマーブラシの表面からカチオン性ポリマーブラシ(2-Aminoethyl methacrylate, AEMA)を構築し、二層型ポリマーブラシ表面を作製した。細胞接着を抑制するMPCポリマーブラシの表面に構築したカチオン性ポリマーブラシによる細胞接着を期待した。表層のカチオン層を15量体(PMbA15)・50量体(PMbA50)と変化させ、それぞれの表面物性を評価した。表層の重合度・下層(MPC層)の有無、にかかわらず表面物性に違いは見られなかった。また、タンパク質吸着量にも変化は見られなかった。そこで、細胞接着

挙動を評価したところ、表層のカチオン性ポリマーブラシが1 nm以下の十分に薄い層の場合には、接着した細胞の進展が大きく抑制されることが分かった。AFMおよびQCM-Dにて二層型ポリマーブラシの機械的特性を評価したところ、表層の膜厚により粘弾性が大きく変化していた。細胞が下層のMPCポリマーブラシの機械的特性を認識し、進展が大きく抑制されたと考えられる。

第4章 双性イオン型ポリマーブラシの表面特性と細胞接着

細胞非接着性を有する表面に細胞接着を誘導することは容易ではない。細胞接着層を表面に導入する必要がある。本章では、まず、MPCからなるポリマーブラシ表面にカルシウムイオンを介してDNAを物理的に固定化し、細胞接着の誘導を試みた。MPCの側鎖であるホスホリルコリン基はカルシウムイオン存在下において正に帯電し、ポリアニオンであるDNAと相互作用する。そこで、MPCからなる単分子膜とポリマーブラシ表面を作製し、カルシウムイオン存在下でのDNAとの相互作用を評価した。DNAの固定化量をQCM-Dにより評価したところ、MPCからなる単分子膜とポリマーブラシではほとんど違いがみられなかった。EDTAによりカルシウムイオンをキレートし、DNAの剥離を行ったところ、MPCからなる単分子膜では50%程度、ポリマーブラシでは100%の剥離がみられた。このことから、膜中のホスホリルコリン基密度が高いポリマーブラシの方が強く相互作用することが分かった。また、DNAをカルシウムイオンを介して固定化したMPCポリマーブラシは、血清成分の吸着および細胞の接着を誘起した。接着した細胞は、EDTAにてカルシウムイオンをキレートすることで、剥離できることが分かった。しかしながら、DNAの固定化量や細胞接着数の増加は困難であり、化学的に固定化することでより制御性が上がるのではないかと考えた。従来の技術では、細胞接着層の導入は非常に困難であることから、拡張性の高い新規双性イオン性ポリマーブラシを設計した。一級アミンからなるカチオン性ポリマーブラシにカルボキシル基を導入することで、新たな双性イオン型ポリマーブラシの作製を試みた。AEMAからなるカチオン性のポリマーブラシを作製し、無水コハク酸を用いて一級アミンをカルボキシル基に変換することで、一級アミン/カルボン酸の比率に応じて表面電位やタンパク質吸着挙動が変化することが分かった。特に、その比率がおよそ50/50の場合に、細胞接着並びにタンパク質吸着を抑制することが分かった。また、医用材料への展開に向けてヒト全血を用いた血液適合性試験を行ったところ、血液適合性材料として知られるpoly(MPC)と同程度の血栓形成抑制能を有することが示された。

第5章 まとめ

本研究では双性イオン型ポリマーブラシに注目し、細胞との相互作用を制御する材料設計の探索を行った。第2章では膜の構造に着目し、双性イオン性の材料をポリマーブラシにすることで、高密度・強い高分子効果により細胞接着が抑制されることが分かった。第3章では、双性イオン型ポリマーブラシの表層にカチオン性ポリマーブラシを作製することで、細胞接着を誘導した。表層が1 nm以下になると、下層の双性イオン型ポリマーブラシの機械的特性により、接着した細胞の進展が抑制されることが分かった。第4章では、まず双性イオン性を

示すホスホリルコリン基がカルシウムイオン存在下においてDNAと相互作用することを利用し、MPCからなるポリマーブラシ上にカルシウムイオンを介してDNAを固定化した。DNAを固定化することで、細胞非接着性を示すMPCポリマーブラシ上に細胞接着が誘導され、EDTAによりカルシウムイオンをキレートすることで細胞を回収した。また、カチオン性ポリマーブラシを基盤とした、生理活性物質が高密度に固定化可能な双性イオン型ポリマーブラシの作製を行った。ベースとなる無水コハク酸処理を行った材料では、poly(MPC)と同程度のタンパク質吸着抑制能・細胞接着抑制能を有していた。さらにヒト全血を用いた血液適合性試験においても、同等の結果が得られた。本材料は、無水マレイン酸を用いた場合表面にアルケンが導入できるため、チオール-エン反応により種々の生理活性物質が導入できるため、さらなる展開が可能である。ブロック化し、機械的特性を組み合わせることで、形状や機能まで制御可能なデザインとなると期待できる。