

博士論文（要約）

工学的な血管内皮表面の改質と免疫反応の制御
に関する研究

Surface modification of endothelial cells by cell
surface engineering to regulate immune
responses

浅輪 健大

臓器移植において、長期間虚血状態にあった血管に対して、血液を再灌流させた場合には、虚血再灌流傷害と呼ばれる一連の炎症反応が引き起こされることが知られている。この一連の反応は、臓器移植における生着率に関わり、臓器の早期拒絶やレシピエントの死にも繋がる。正常の血管内皮細胞表面では、glycocalyxと呼ばれる糖鎖ネットワークが凝固・補体系の活性化を制御しているが、虚血再灌流傷害時にはこのglycocalyxが欠損することが知られている。そのため、glycocalyxを失った血管内皮表面では、血液に含まれる凝固系・補体系因子が活性化することで血液凝固や免疫反応が進行する。そこで私は、表面改質材料を用いて、血管内皮細胞上の欠損した糖鎖ネットワークを工学的に再構成し、凝固系・補体系因子を制御する生理活性を付与すれば、免疫反応を抑制でき、臓器の生着率の向上に寄与できると考えた。本博士論文では、血管内皮を含む細胞表面の工学的な改質により、血液と細胞表面との相互作用における生体反応を制御することを目的とした。はじめに、血液と細胞表面との相互作用を評価できるモデルを確立した。次に、腎移植をはじめとする臓器移植の生着率改善の観点から、虚血再灌流傷害の制御のための細胞表面改質を行った。また、細胞表面と血液とが相互作用する点において細胞移植と臓器移植とは共通しており、同様の免疫反応が惹起することが分かってきている。このことは、細胞移植の生着率改善に繋がるものと期待できる。そこで、幹細胞移植による脳梗塞治療に着目し、虚血部位への幹細胞デリバリーを目的とし、表面修飾材料の利用を試みた。細胞や血管内皮表面の工学的な修飾は局所的であり、薬物の全身投与と比較すると、出血傾向や他臓器への副作用を回避できる利点があると考えた。

第一章では、細胞移植と臓器移植における概説と問題点について、説明する。血液と移植用細胞および移植用臓器が触れた際の相互作用と、細胞表面改質による血液の活性化制御の重要性について記述する。特に、臓器移植における虚血再灌流傷害による血管内皮の活性化の機構について、血液の活性化に重要な補体系と凝固系の反応機構と関連付けて詳述する。また、血液との接触を伴う人工材料表面における血液の活性化制御手法について記述し、また、細胞表面の工学的な改質の重要性とその方法について述べる。さらに移植用の細胞および臓器表面における改質技術について説明し、血液の活性化制御への応用について述べる。

第二章では、細胞を対象とした血液適合性の評価モデルについて記述する。血管内の血流を模したモデルとしてポリウレタン製チューブをループ状にしたループモデルに取り組んだ。ここではチューブ表面による血液の活性化を防ぐため、poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-*co*-(*n*-butyl methacrylate) (MPCポリマー)およびヘパリン結合材料をコーティング材料として利用した。ここで、ヘパリンコーティングとは多数のヘパリン糖鎖を結合した高分子でコーティングした表面である。ヒト全血をMPCポリマーおよびヘパリン結合材料でコーティングしたチューブに入れてインキュベートし、血液凝固活性並びに補体活性について評価した。MPCポリマーとヘ

パリリン結合材料をコーティングしたポリウレタンチューブでは、血液中の血小板数は維持され、凝固系活性化のパラメーターであるThrombin-Antithrombin complexes (TAT)、補体活性系パラメーターであるC3aとsC5b-9濃度の上昇は抑制された。一方、未処理のポリウレタンチューブでは、血小板数の低下、TAT、C3a、sC5b-9値の上昇がみられた。このことより、血液を活性化せずに血流を再現した血液適合性の評価モデルを作成することができた。ここで確立した評価モデルを以後の細胞表面修飾における血液適合性の評価モデルに使用した。

第三章では、細胞膜表面を修飾できるpolyethylene glycol結合脂質(PEG脂質)に糖鎖の、低分子量化ヘパリン(fHep)を化学結合したヘパリン結合脂質(fHep脂質)を合成し、化学組成及び脂質膜表面修飾時の生理活性を評価した。fHep脂質の凝固系制御因子との相互作用を評価したところ、凝固系制御因子アンチトロンビンの結合が見られた。また、fHep脂質はリポソーム、赤血球などの脂質二分子膜に導入され、抗凝固活性を示すことが分かった。次に、ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)の表面をfHep脂質で修飾し、ループモデルによるhMSCsのヒト全血に対する血液適合性試験を行った。fHep脂質修飾したhMSCsは、未処理のhMSCsと比較して血液に暴露した際の血小板凝集が抑制された。この結果は、hMSCs表面が起因となる血液凝固がfHep脂質の生理活性により抑制されたことを示しており、臓器移植時の虚血再灌流傷害によりglycocalyxを失った血管内皮の保護が期待できる結果である。(K. Asawa, *et al.*, *Advanced Functional Materials*, *in press*, DOI: 10.1002/adfm.202008167)

第四章では、血液と相互作用する表面の改質における更なる戦略とそのfHep-脂質との共用の可能性を議論する。

ヒアルロン酸(HA)はglycocalyxの構成要素の一つであり、CD44との特異的相互作用を介して細胞膜表面上に修飾されているグルコサミノグリカンである。本研究ではがん治療における薬物担体として、血液適合性およびCD44を過剰発現するガンへの標的機能を付与するHAで化学療法として使われているDoxorubicin (Dox)および抗炎症作用を持つDexamethasone (Dex)を内包したナノ粒子(HA-Dex-Dox)を作製した。HA-Dex-Doxのガンへの特異的集積と高効率な治療効果を最終目標とし、本博士論文ではHAの血液適合性に焦点を置き、評価した。HA-Dex-Doxは、HAと結合したDexとDoxとの疎水的相互作用により自己集合した構造を持ち、約250nmの直径を持った球状の粒子であることが分かった。HA-Dex-Doxの血液適合性をループモデル(第二章)により評価した。ここではDexのみを導入した血液をコントロールとした。結果、HA-Dex-Doxを導入した血液では血液凝固を示す血小板凝集および凝固系活性のパラメーターであるTATの産生が起らなかったのに対し、Doxのみを導入した血液では血小板凝集およびTAT産生が確認されたことから、HAコーティングにより化学療法としてのDexに血液適合性が付与されたことが分かった。

また、細胞治療に臨床応用されているhMSCsに着目し、その細胞表面改質について研究した。hMSCsは脳梗塞部位における脳神経機能の回復効果が期待されているが、細胞

から発現している組織因子(TF)が凝固系の活性化を引き起こす。また、疾患部位への選択的な集積が起こらないため、臨床での成績は期待しているよりも良くない。そのため、細胞を保護でき、疾患部位に選択的に集積させることができれば、少ない細胞数で早急の移植が可能になり、また治療効果を高めることが期待できる。ここでは、移植時における効率的な細胞移植の実現を目的とし、脳梗塞部位などで活性化している血管内皮に過剰発現するEセレクトインを標的として、オリゴペプチドを利用したhMSCsのターゲティングを試みた。Eセレクトインに対して高親和性のオリゴペプチドを選択し、PEG脂質との結合体を合成することで、hMSCsの表面を修飾することに成功した。このhMSCsをEセレクトイン固定化基板に反応させたところ、基板表面への特異的な細胞吸着およびその後の接着、伸展が誘導できた。一方、未処理のhMSCsではこれらの相互作用は起こらなかった。また、Eセレクトイン固定化基板へのhMSCsのターゲティングは血液中においても達成された。オリゴペプチド結合PEG脂質による修飾はhMSCsの細胞分裂・分化に影響を与えなかった。これらより、ペプチド結合PEG脂質による修飾はhMSCsの機能に影響を与えることなく脳梗塞患部へデリバリーできることが示唆された。

本博士論文では、血液と細胞表面の相互作用の制御という目的に対して、初めにMPCポリマーを使用した実験系の確立を行った。次に、fHep-脂質により細胞表面を改質することで血液の活性化制御を実現することができた。さらに、fHep-脂質による細胞表面改質と他の戦略との組み合わせとして、細胞表面修飾へのHAの導入による血液適合性の強化およびペプチド結合PEG脂質による特異的な生体分子との結合性能の付与という二種類の方法の、fHep-脂質表面との共用の可能性が示唆された。