

# ソフト材料と生体表界面

山本 雅哉\*

## 1. はじめに

生体は異物を排除する様々な仕組み(異物反応)をもっている。治療のために体内に埋植して使用する材料も例外なく、生体にとって異物である。すなわち、体内に埋植した材料を機能させるためには、この異物反応を考慮する必要がある。異物反応を引き起こす要因は様々であるが、材料そのものに加えて、材料由来の分解物・溶出物などが挙げられる。これらが細胞や生体組織などに直接作用する場合もあれば、材料と生体との界面特性が原因となる場合もある。一方、異物反応の理解に基づいて、体内あるいは体外を区別せず生体に対して機能する材料の開発も進められている。ここで、生体とは、臓器・生体組織・細胞・細菌・ウイルスからタンパク質・核酸・脂質・糖などの生体分子まで、広い意味の生体由来の“モノ”を指す。したがって、生体にとって異物となる材料、あるいは生体に対して機能する材料、いずれもこの生体由来の“モノ”との相互作用を考える必要がある。

ソフト材料は金属やセラミックスなどのハード材料と対比されるが、プラスチックのみを意味するわけではない。すなわち、ソフトマターやソフトマテリアルは、液晶、高分子、ゲル、コロイド、界面活性剤など、やわらかい物質の総称である。ソフト材料の主たる構成単位は分子であり、これらは分子間力を介して凝集あるいは自己組織化している。さらに、生体そのものもソフト材料のひとつと考えることができるため、生体由来の“モノ”とソフト材料との相互作用は、介在する分子やそれぞれを構成する分子間にはたらく。

この介在する分子や生体を構成する分子は、主として、タンパク質であり、タンパク質は、水和水や対イオンに取り囲まれている。したがって分子間の相互作用を考える場合、水和水や対イオンを考慮しなければならない。このようなタン

パク質が材料表面に吸着することによって、細胞接着などを媒介する。近年、材料表面の水和状態に不凍水、自由水に加えて、中間水の存在が見いだされ、中間水の存在が生体親和性に重要であることが明らかにされている<sup>(1)</sup>。例えば、血液適合性が求められるような医療機器では、この中間水の制御により血液中のタンパク質吸着を抑制し、血栓形成を回避する試みがある<sup>(2)</sup>。一方、タンパク質には立体的な高次構造があり、この高次構造が損なわれるとタンパク質の生理活性が失われる、すなわち変性する場合がある。さらに、材料表面への吸着や化学固定によりタンパク質が変性することもある。このように、材料と生体との界面における分子の振るまいを理解することは、異物反応のみならず、生体に対して機能する材料を設計するためにも必要不可欠である。

生体由来の“モノ”であるタンパク質を利用して生体に対して機能する材料を設計する場合、タンパク質の生理活性を損なわない固定化方法が求められる。本稿では、これらを踏まえ、筆者が開発してきた幹細胞培養のためのソフト材料表面に関する研究例について紹介する。

## 2. 高分子表面改質

20世紀の医療機器開発は、血液適合性を有する人工臓器の開発から始まったとする考察がある。すなわち、血液中のタンパク質の吸着を抑制することにより血栓形成を回避する技術開発である。材料そのものの研究に加えて、血液凝固を抑制する生理活性を有するヘパリン、細胞膜の脂質に存在するリン脂質極性基を導入した poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (MPC ポリマー)<sup>(3)</sup>、中間水をもつとされている poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)<sup>(4)</sup> など、抗血栓性を示す分子をコーティングした材料開発が行われて

\* 東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻；教授(〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-02) Soft Materials and Biointerfaces; Masaya Yamamoto(Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai)  
Keywords: *soft materials, hydrogel, protein immobilization, stem cell culture, molecular orientation*  
2024年6月14日受理[doi:10.2320/materia.63.606]

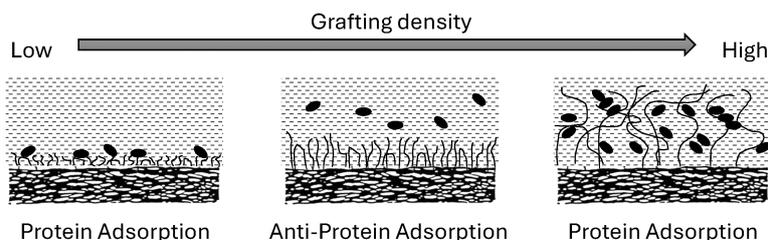
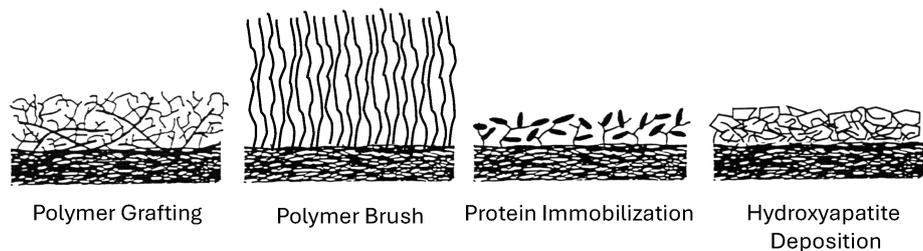


図1 高分子の表面グラフト化.

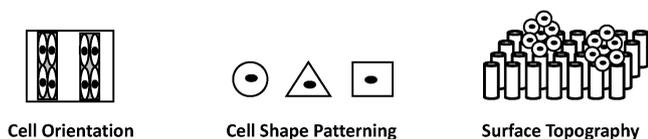


図2 微細加工を利用した細胞機能修飾の例.

きた。一方、材料と生体との界面特性に関する研究の進展とともに、軟組織や硬組織などの生体組織との接着性をもつ高分子を材料表面に導入する高分子グラフト化<sup>(5)</sup>や高分子のグラフト密度を高めることによりタンパク質吸着を抑制する濃厚ポリマーブラシ<sup>(6)</sup>などの表面改質技術の開発も進められてきた(図1)。例えば、筆者は、ポリエステル表面に対してリン酸基を有する2-methacryloyloxyethyl phosphate からなるポリマーをグラフト化することによって、ハイドロキシアパタイトが沈着し、骨結合性を示すことを細胞レベルで明らかにした<sup>(7)</sup>。

このような化学的なアプローチに加えて、表面に凹凸を導入することにより接着した細胞の機能を修飾する試みや微細加工と化学的なアプローチとを組み合わせた方法により細胞の接着形態や機能を修飾する試みも行われてきた(図2)。

### 3. 生理活性タンパク質の配向固定化技術

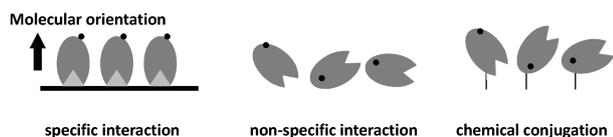
近年、再生医療が注目され、人工多能性幹細胞(iPS細胞)に代表される、幹細胞というポテンシャルの高い細胞を利用するための細胞培養技術が急速に発展している。この細胞培養技術では、幹細胞の機能を制御する生理活性タンパク質を含めた生理活性物質が必要不可欠である。

細胞膜は脂質二分子膜から構成されており、一部の脂溶性の低分子を除いて、イオンや水分子でさえ透過することができない。ここで、生理活性タンパク質は巨大な分子であるこ

とから、細胞膜を透過することができない。このため、細胞外から作用する生理活性タンパク質の多くは、細胞膜に存在する受容体と結合することにより細胞機能を制御する。細胞外から作用する生理活性タンパク質は、溶解して遊離しているタンパク質(細胞外)と細胞膜上(細胞膜内)や細胞外マトリックス上(細胞外)に存在するタンパク質とに大別される。いずれの場合も、細胞膜に存在する受容体を介して細胞内にシグナルが伝達される。細胞との接触を通じて細胞外から作用する生理活性タンパク質のほとんどが、脂溶性のドメインを細胞膜に貫通させて細胞膜内に存在している。細胞膜に存在する生理活性タンパク質は、細胞間の直接的な相互作用に寄与する。特に、細胞膜に存在する生理活性タンパク質を幹細胞の細胞培養に利用するためには、細胞間の直接的な相互作用を模倣した材料表面に対する生理活性タンパク質の固定化技術が必要である。

生理活性タンパク質を材料表面に固定化する方法として、吸着法と化学固定化法の2種類が知られている<sup>(8)</sup>。前者では、生理活性タンパク質を材料表面に吸着させる。一方、後者では、材料表面に導入した反応基を介して生理活性タンパク質を化学固定する。しかし、いずれの方法でも、固定化された生理活性タンパク質の生理活性が損なわれる場合が少なくない。この問題を解決する方法のひとつとして、タンパク質の特異的相互作用を利用した生理活性タンパク質の固定化方法が研究されている<sup>(8)</sup>(図3)。さらに、細胞間相互作用を介した細胞シグナルでは、細胞膜上の受容体分子に結合する生理活性タンパク質の配向性が重要であり、両者が相互作用するように配置されて初めて細胞間の特異的相互作用が達成される。したがって、材料表面に生理活性タンパク質を配向固定化することができれば、細胞シグナルを効率よく活性化することができると考えられる(図3)。そこで、筆者らは、免疫グロブリンの一つであるIgGがもつFcドメインとproteinAとの特異的相互作用を利用した生理活性タンパク質の

### (a) Protein immobilization



### (b) Cell Membrane Protein

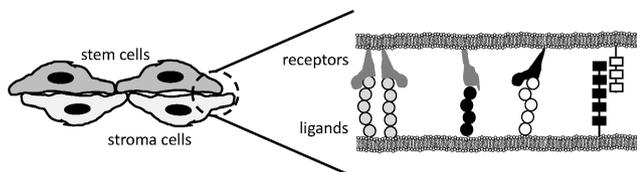


図3 生理活性タンパク質の固定化.

配向固定化について検討した<sup>(9)</sup>. FcドメインはIgG抗体のC末端側にある結晶化できる性質をもつ領域であり, N末端側にある抗原タンパク質を認識する部位(Fabドメイン)とは異なる. 一方, proteinAは黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在するタンパク質であり, Fcドメインと特異的に結合することが知られている. そこで, Fcドメインと生理活性タンパク質とをタンデムにつないだキメラタンパク質を用いて, ガラス表面に化学導入した proteinA を介して生理活性タンパク質を配向固定化した. proteinA を化学導入するために用いたリンカーの鎖長や proteinA 導入率を最適化することによって, 生理活性タンパク質を単層吸着させることができた. 一方, proteinA 導入率が低い場合, 非特異的な吸着が起り, 逆に proteinA 導入率が高い場合, 生理活性タンパク質の固定化量は減少した. この結果は, 生理活性タンパク質間の立体反発と Fcドメインと proteinA とが特異的に相互作用できる導入率とのバランスで配向固定化が可能となることを示している.

次に, 実際に配向固定化した生理活性タンパク質の生理活性について, Notch シグナルのリガンド分子の一つである Jagged1 を利用して検討した. Jagged1 は, 血液細胞のもとになる造血幹細胞を体外で増幅させるために重要な生理活性をもつことが知られている<sup>(9)</sup>. そこで, Jagged1 と Fcドメインとからなるキメラタンパク質(Jagged1-Fc)を, proteinA を固定化したガラス表面に配向固定化した. マウスの骨髄から単離した造血幹細胞を含む細胞画分を培養したところ, Jagged1 が配向固定化されたガラス表面でのみ造血幹細胞が増幅されていることがわかった(図4). この結果は, 配向固定化された Jagged1 が, 造血幹細胞を増殖する活性をもっていることを示している.

この例では, 末端にアミノ基との反応性をもつ *N*-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)活性エステル基を有するシランカップリング剤を用いており, シラノール基と反応する金属であれば, 同様の方法によりタンパク質を材料表面に配向固定化することも可能であろう.

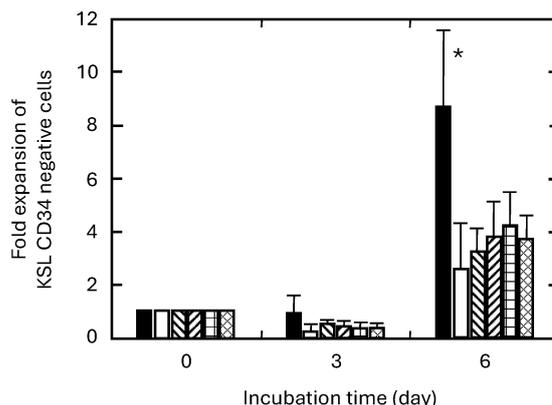


図4 造血幹細胞を含む細胞画分(KSL CD34 negative)の増幅.  
Jagged1 配向固定化(■), Jagged1 配向固定化+Notch シグナル阻害剤(□), Jagged1 コーティング(▨), フィブロネクチンコート+Jagged1 添加(▧), フィブロネクチンコート(▩), 未処理(▤). \* $p < 0.05$ ; 有意差あり.

## 4. ハイドロゲルへの生理活性タンパク質の配向固定化

ゲルは, 「あらゆる溶媒に不溶の三次元網目構造をもつ高分子およびその膨潤体」と定義される. 溶媒が水であれば, 接頭辞として水を意味する「ハイドロ」をつけてハイドロゲルとよぶ. 近年, ハイドロゲルの硬さが幹細胞から体を構成する機能をもつ細胞への変化(分化)<sup>(10)</sup>や幹細胞からのミニ臓器(オルガノイド)形成<sup>(11)</sup>に影響を及ぼすことが報告されている. ここで, ハイドロゲルの硬さは, 架橋密度を変化させることによって, 容易に制御することができる. 例えば, Englerらは, 間葉系幹細胞(MSC)を用いて, 硬いハイドロゲル上では骨を造る骨芽細胞へ, 軟らかいハイドロゲル上では神経細胞へ, それぞれ分化しやすくなることを示した<sup>(10)</sup>. 一方, Lutolfらは, ハイドロゲルに固定化する細胞接着ペプチドの濃度やハイドロゲルの硬さが, 小腸上皮細胞からのオルガノイド形成に対して影響を及ぼすことを示した<sup>(11)</sup>. さらに, 筆者らも, ハイドロゲルの機械的特性が人工多能性幹細胞(iPS細胞)の心筋細胞への分化を修飾することを見いだしている<sup>(12)</sup>. これらの知見は, 細胞の周辺環境の機械的特性が, 幹細胞の運命決定に対して重要な役割をもつことを示唆している.

これらを踏まえ, 生理活性タンパク質の配向固定化とハイドロゲルの機械的特性とを考慮した三次元細胞培養法として, 筆者らは生理活性タンパク質を配向固定化したハイドロゲルを用いたサンドイッチ培養法を開発した. すなわち, 異なる機械的特性をもつハイドロゲルに対して生理活性タンパク質を配向固定化した生体機能性ハイドロゲルを用いて, 幹細胞を上下から挟み込む方法である.

生体不活性な polyacrylamide (PAAm) からなるハイドロゲルを異なる架橋密度になるように調製することによって, せん断弾性率が 0.7 kPa (soft-PAAm), 3.5 kPa (mid-

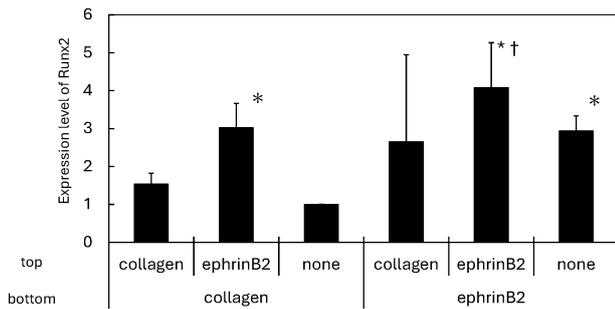


図5 MSCのサンドイッチ培養によるRunx2遺伝子発現。上部ならびに下部にephrinB2配向固定化ハイドロゲル(mid-PAAm)ならびにコラーゲン固定化ハイドロゲル(mid-PAAm)を組み合わせた場合、あるいは下部のみにephrinB2配向固定化ハイドロゲル(mid-PAAm)ならびにコラーゲン固定化ハイドロゲル(mid-PAAm)を用いた場合。  
\* p<0.05; コラーゲン固定化ハイドロゲルに対する有意差。  
† p<0.05; 上部ならびに下部両方にコラーゲン固定化ハイドロゲルを用いた場合に対する有意差。

PAAm), ならびに 68 kPa (stiff-PAAm) のハイドロゲルを作製した。次に、幹細胞としてMSCを用いて、その骨分化を指標として、開発した三次元細胞培養法について検討した。生理活性タンパク質として、骨分化を誘導するEphシグナルのリガンドの一つであるephrinB2<sup>(13)</sup>を用いた。ephrinB2をハイドロゲル表面に配向固定化するために、ephrinB2とFcドメインとからなるキメラタンパク質であるephrinB2-Fcをハイドロゲル表面に固定化したproteinAと特異的に相互作用させた。

骨を作る骨芽細胞に特異的なRunx2遺伝子を調べたところ、貯蔵弾性率3.5 kPaのハイドロゲル上にephrinB2を配向固定化した場合、ephrinB2ランダム固定化ハイドロゲルと比較して、有意にRunx2遺伝子の発現量が増加した。一方、Ephシグナルの活性化により発現が低下するRhoA活性は減少していた。これらの結果は、ephrinB2を配向固定化したハイドロゲル上では、Ephシグナルの下流にあるRhoAシグナルが関与して、Runx2遺伝子の発現が誘導されたことを示している。すなわち、ハイドロゲルの貯蔵弾性率と固定化ephrinB2の配向性との両方がMSCのRunx2遺伝子の発現量に対して影響をおよぼしていることを示している<sup>(13)</sup>。

最後にephrinB2配向固定化PAAmハイドロゲル(mid-PAAm)を用いてサンドイッチ培養を行った。その結果、MSCの下部、あるいは上部にPAAmハイドロゲルがあることによりMSCの骨分化が促進された(図5)。生体機能性ハイドロゲルを用いたサンドイッチ培養により、細胞接着面だけでなく細胞上部からも細胞シグナルが作用することがわかった。

## 5. 生体表界面に対する考察を環境問題へ

近年、環境問題として、ヒトを含めた生きものが、直径5 mm以下のプラスチック片と定義されるマイクロプラスチック(MP)に非意図的に脅かされていることが懸念されている。例えば、ヒトの動脈硬化疾患で患部におけるMPの存在とその人体への影響について研究が進められている<sup>(14)</sup>。さらに、MPのサイズや形状に加えて、汚染物質や生体分子などの表面吸着が、MPと生体との相互作用に対して影響を及ぼすことは、上述の異物反応に対する研究から明白である。一方、自然環境に放出されたプラスチックは、紫外線(UV)による光酸化分解、微生物による生分解、物理的衝撃による機械的破壊などにより細片化されたMPとなる。このMPの特徴として、不規則な形状であること、表面が酸化されていることなどが挙げられる。筆者らは、光酸化分解と機械的破壊とのプロセスに着目し、UV照射および超音波(US)処理を組み合わせることにより分解・劣化MPモデルを作製した。得られた分解・劣化MPモデルを利用して、ヒト単球系白血病細胞株(THP-1)から誘導したマクロファージなどの生体バリアに対するMPの応答について検討を進めている。例えば、poly(ethylene terephthalate)(PET)からなるMPモデルを作製しマクロファージに曝露したところ、UV/US処理により分解・劣化させたPETでは炎症性サイトカインのひとつであるIL-1βの分泌量が有意に増加し、炎症反応が誘導されることがわかった(図6)<sup>(15)</sup>。酸化による表面電荷の変化、結晶化度の変化による機械的特性の変化など、様々な物性も変化し、それらが炎症反応に対して影響を及ぼしたことが示唆された。また、最近の研究から、MPのサイズ、結晶化度、形状、高分子の種類など、様々な要因が生体影響に関与することを示唆するデータが得られている。人工関節から生じる摩耗粉に対する炎症反応やナノ粒子やマイクロスフェアを用いたドラッグデリバリーシステムなど、医療に関連した微粒子と細胞との相互作用に関する知見が、環境問題の考察へ発展していくことが期待される。

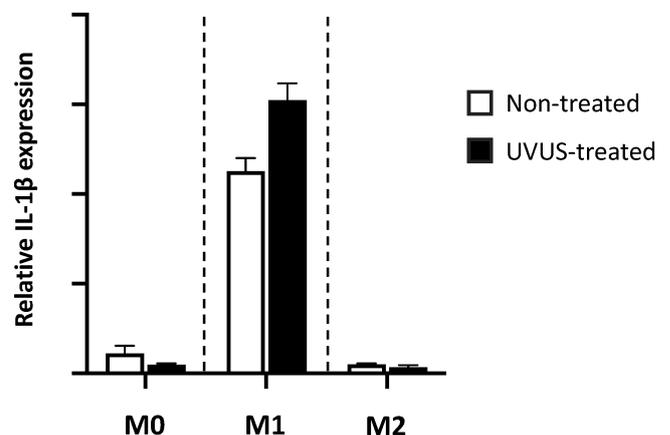


図6 PET欠片に対するマクロファージの免疫応答。

