

内23-20

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

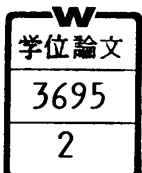
Molecular Design of Functionalized  
Temperature-responsive Polymers for  
Cell Sheet Engineering

細胞シート工学にむけた  
機能化温度応答性高分子の分子設計

申請者  
荻原 充宏

Mitsuhiro Ebara

応用化学専攻 化学工学研究



2003年11月

ヒトの体は、皮膚や毛髪、肝臓、血管などの限られた一部の組織以外では、その再生能は非常に限られており、大部分を欠損するような事故や疾患では再生は期待できない。そのため、代替臓器（人工臓器）を用いるか、臓器移植をおこなうのが20世紀の医療であった。しかし、体内で長期に生体適合性を維持する材料の開発は現実的にはいまだ難しく、多くの場合、異物認識や血栓形成などが不可避である。また、臓器移植では生涯にわたる免疫抑制剤の使用や、ドナー不足などの深刻な問題がある。このような背景のもと、本人の細胞から組織・臓器を再生させる次世代技術として「組織工学」が注目を集めている。本研究では、生体組織が細胞シートを積層した構造であることに注目し、細胞シートを火傷した皮膚や損傷角膜、あるいは心臓・肝臓・腎臓に貼り付けて組織構造を再構築する「細胞シート工学」にむけた新規培養皿の開発に取り組んだ。

細胞シートを作成するといっても、培養皿上で培養した細胞を回収する場合、タンパク質分解酵素によって細胞の足場およびその受容体となるタンパク質を分解して回収するため、細胞を連結した一枚のシート状に回収することは容易ではない。そこで本研究では、タンパク質分解酵素を用いない非侵襲的な細胞シートの回収を実現するために、温度応答性高分子のポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)に注目した。PIPAAmは水中で下限臨界溶液温度(LCST; 32°C)を有し、32°C以下では水和して溶解するが、それ以上の温度で高分子鎖が脱水和・凝集して沈殿する。このPIPAAmを培養皿表面に共有結合的に固定することで、培養皿表面の温度変化に伴う水に対するぬれ性を制御可能となる。すなわち、37°C(LCST以上)で比較的疎水性を示す表面上では細胞は良好に接着・増殖するが、温度をLCST以下にするだけで、培養皿表面のPIPAAm分子が水和・伸展し、親水性表面となるために細胞が自発的に脱着し、シート状組織として回収できる。

本論文では、この温度応答性培養皿を基盤とした細胞シート工学を幅広く臨床に応用するために、細胞の接着・脱着速度、および機能(接着・増殖・分化)を制御可能な新規機能化温度応答性培養皿を考案した。細胞の接着・脱着速度を制御するためには、培養皿の表面物性を任意に調節する必要があり、また細胞機能の制御には、種々の生理活性物質の固定化が1つのアプローチである。いずれの場合も、PIPAAmに親水性基、荷電基、反応性基などを導入して高度な機能を付加することが重要となる。つまり、緻密な分子設計に基づいた新規温度応答性高分子の合成と、それを用いた新規培養皿上での細胞の接着・脱着および機能制御することが本論文の主旨である。

本論文は、緒言(第1章)、第1部(第2~6章)、第2部(第7~11章)の全11章より構成されている。

緒言(第1章)では、温度応答性高分子の分子構造とその相転移挙動への影響に関する基礎研究から、その特長的な性質を生かした応用に関する研究例をまとめた。特に、温度応答性高分子からなるハイドロゲルの体積相転移挙動とその収縮

速度、および温度応答性高分子を固定化した表面のぬれ性変化などを中心に述べた。次いで、細胞接着性ペプチドの構造・機能、およびそれをを用いた応用に関する既往研究をまとめた。最後に、本論文の目的および意義を議論した。

第1部(第2~6章)では、PIPAAmにカルボキシル基やアミノ基などの官能基を導入した機能化温度応答性高分子を作製するための、新規分子設計法の確立とその評価を行った。通常、PIPAAmにカルボキシル基を導入する場合、アクリル酸(AAc)との共重合法がよく用いられるが、AAcの導入量の増大に従ってその相転移温度を上昇させてしまうと同時に、鋭敏な相転移挙動を消失してしまうことが知られている。

そこで第2~4章では、「PIPAAmの温度応答性には高分子側鎖のイソプロピルアミドの連続構造が深く関わっている」という仮説のもと、カルボキシル基とイソプロピルアミド構造を併せ持つ新規モノマー、2-カルボキシイソプロピルアクリルアミド(CIPAAm)を合成し、IPAAmとの共重合体P(IPAAm-co-CIPAAm)を調製した(2章)。また、アミノ基を有するモノマー、2-アミノイソプロピルアクリルアミド(AIPAAm)および水酸基を有するモノマー、2-ヒドロキシイソプロピルアクリルアミド(HIPAAm)も新たに合成した(3章)。さらに、イソプロピル基のかわりにノルマルプロピル基を有する3-カルボキシノルマルプロピルアクリルアミド(CNPAAm)を合成し、これらとIPAAmとの共重合体を合成した。これらの相転移挙動を比較検討した結果、極性官能基を導入しても、高分子側鎖のイソプロピルアミドの連続構造を維持することで、鋭敏な相転移挙動の維持が実現できることを明らかにした。示差走査熱量測定(DSC)や疎水性蛍光物質のピレンを用いた蛍光測定の結果からも、P(IPAAm-co-CIPAAm)の相転移挙動がPIPAAmのそれとわけて類似していることを明らかにした(4章)。

第5および6章では、P(IPAAm-co-CIPAAm)のハイドロゲルを作製し、各温度での平衡膨潤度を求め、その体積相転移挙動を評価した。ゲルにおいても、P(IPAAm-co-CIPAAm)はPIPAAmとほぼ同じ相転移挙動を示した(5章)。また、ゲルの構造とその動的な膨潤・収縮挙動に関して検討した結果、急激な温度上昇によって、PIPAAmゲルはその最外層に高密度の収縮層を形成して収縮が停止するのに対して、CIPAAmを導入するときわめて素早い収縮挙動を実現した(6章)。

第2部(第7~11章)では、新規機能化温度応答性高分子のP(IPAAm-co-CIPAAm)を細胞培養用基材へと展開した。

第7章では、P(IPAAm-co-CIPAAm)培養皿を用いて細胞シートの脱着速度の加速を試みた。細胞はその種によって、温度応答性培養皿に対する接着性・脱着性が異なるため、実際に細胞シートを臨床応用する際には、細胞種によらず素早く回収可能な培養皿の開発が必要である。そこで親水性のCIPAAmを温度応答性培養皿に導入し、低温処理時の細胞脱着速度を顕著に増加させることに成功した。さらに、CIPAAmは親水性であるにもかかわらずPIPAAmの温度応答性を維持できる

ので、37℃での細胞接着性自体にはCIPAAmの影響はほとんどなかった。

第8章では、培養細胞を臨床応用する際に重要視される培養系の安全性に注目した。通常、細胞を培養する際にウシ血清などの動物由来成分が添加されるが、それらが有する感染性や抗原性が近年大きな問題となっている。しかし、血清中には細胞培養に必須の細胞接着因子や細胞成長因子などが含まれており、血清を添加しない系での細胞培養は事実上困難である。近年、遺伝子工学の発展により細胞成長因子などでは遺伝子組み換え体が作製可能になったが、細胞接着因子の大半が分子量数万以上である上に、糖鎖付加などの多段階の翻訳後修飾が行われるため、現在の技術では人工的に合成することはほぼ不可能である。そこで血清中に含まれる細胞接着分子を人工合成ペプチドに代替する目的で、多くの細胞接着分子に共通するアミノ酸配列(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸;RGD)に注目し、RGD固定化温度応答性培養皿による非血清存在下での細胞シート作製を試みた。その結果、非血清存在下(37℃)でも細胞を良好に接着・伸展させることができ、低温処理(20℃)によって細胞を自発的に脱着させ、シート状組織として回収することに成功した。

第9～11章では、RGD固定化温度応答性培養皿からの細胞の脱着メカニズムについて、細胞接着性ペプチドと細胞膜タンパク質との特異的相互作用の制御という観点から検討した。ペプチド固定化温度応答性培養皿は、低温処理によって細胞を自発的に脱着させることが可能であるため、特異的相互作用の解離を動的に観察できる。その結果、固定化するペプチド密度(9章)やペプチド鎖長(10章)を制御したり、RGDのシナジー配列として知られているPHSRNを共固定(11章)することによって細胞と表面の親和性を促進すると、細胞の脱着時間に遅れが見られることが明らかとなった。同時に、固定化するペプチドと温度応答性高分子の間にグリシン(G)やポリエチレングリコール(PEG)をスペーサーとして挿入すると、そのスペーサー鎖長に依存して細胞脱着が阻害されることが明らかとなった。これらの結果から、低温処理におけるペプチド固定化温度応答性培養皿からの細胞の脱着メカニズムは、培養皿表面の高分子鎖の水和・膨潤によって、固定化ペプチドが水和した高分子鎖に遮蔽されてしまい、細胞膜タンパク質とペプチド間の相互作用が急激に低下して起こることが示唆された。

以上より、本論文では、温度応答性培養皿を幅広く臨床に応用するため、新規分子設計法を考案し、それに基づいて、多機能化温度応答性高分子の緻密な分子設計を行った。それを培養皿に応用し、細胞シートの機能維持と安全性確保という観点から、細胞シートの脱着の加速化、および非血清存在下での細胞シートの作製に成功した。この多機能化インテリジェント材料を基盤とする技術は、非常に汎用性が高く、細胞-基質間の特異的な相互作用の制御や細胞の増殖・分化の制御などの基礎的研究から、組織工学・再生医療への応用までの幅広い研究領域において活用でき、21世紀の中核を担う医療技術を支援するものと期待できる。