

学位論文題名

Design of artificial ligand-appended polymers for non-covalent modification of cell surface

(非共有結合型細胞表層修飾のための人工リガンド提示ポリマーの分子設計)

学位論文内容の要旨

細胞膜は細胞外環境との相互作用を担い、細胞接着やシグナル伝達を調節する重要な器官である。そのため細胞膜に人工リガンドを提示できれば細胞が外部から受ける刺激をコントロールすることが可能となる。目的の薬剤を積極的に取り込ませる事や目的の場所に細胞を接着させる事が可能になれば、医療やバイオセンサー作製への貢献が期待される。しかし、これまで報告されているリガンド提示法は、共有結合による膜蛋白質の修飾や疎水性相互作用を利用した細胞膜への脂質誘導体挿入法であるため、天然のシグナル伝達の攪乱による高い細胞毒性やリガンド提示時間が短い事など問題があった。そこで細胞毒性が低くかつ汎用性の高い細胞表層修飾法が求められている。本研究は毒性が低くかつ細胞膜に長時間滞在しリガンドを提示できる分子の創製を目的とした。

第2章では細胞表層がアニオン性であることに着目し、静電相互作用によってカチオン性ポリマーを細胞表層に固定化することを試みた(Fig. 1)。原子移動型リビングラジカル重合(ATRP)により側鎖にエポキシ基を持つ中間体ポリマーを合成した。エポキシ基は、様々なリガンド分子を簡便に導入でき、開環反応後、水酸基を提示するためポリマーを水溶性にする事ができる。カチオン種として異なる級数のアミノ基を持つ蛍光性ポリマーを作製し、HeLa細胞上での局在を共焦点顕微鏡により観察した。1級アミンや4級アンモニウムを提示させたポリマーは、10分以内に細胞内への取り込みが観察されたが、2級アミンを提示させたポリマー1は長時間細胞表層に局在することが確認された。さらにポリマー末端に疎水基(oleyl 基)を導入したポリマー2では、ポリマー1に比べ細胞表層への導入量が増大した。これは、疎水基が細胞膜脂質二重層へねらい通り挿入されていることを示している。2級アミンの部分の水酸基に変えた非イオン性ポリマーでは細胞との相互作用が全く見られなかったことから、2級アミン提示ポリマーは生理的条件下(pH 7.4)でカチオン性を示しアニオン性細胞表層と静電的相互作用により結合していることが確かめられた。また、2級アミン提示ポリマーは12時間以上細胞表層に局在することから、細胞表層に人工リガンドを提示するのに適していることが示された。

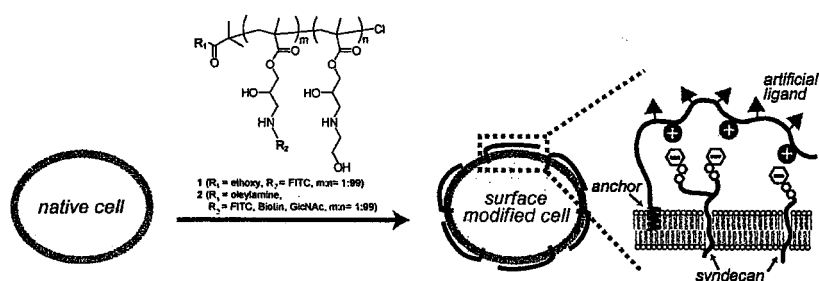


Fig. 1 Schematic illustration of cell surface modification with cationic polymers.

第3章では2級アミン提示ポリマーの細胞表層への局在機構の解析を行った。1級アミンや4級アンモニウム提示ポリマーで見られたように、一般的にカチオン性ポリマーはエンドサイトーシスにより細胞内へ数分に取り込まれることが知られている。本研究で観察された2級アミン提示ポリマーの細胞表層への局在、すなわちエンドサイトーシスの阻害機構を解析するため、生理的条件下でのアミノ基の電離状態とポリマーの構造を調べた。pH滴定によりポリマー分子中のアミノ基の電離度を測定し、動的光散乱測定と分子モデリングから得られた数値を比較することでポリマー構造を予測した。側鎖に1級アミンを持つ代表的なカチオン性ポリマーである poly(allylamine)は、電離度 0.9 でグロビュール構造をとっているのに対し、2級アミン提示ポリマー1では電離度 0.18 と低く、さらに直線状に伸びた棒状構造であることがわかった。ブラシ状に広がった高密度な側鎖に高い親水性を有していることが、その特徴的な構造を示す原因と考えられる。以上の結果を基に、2級アミン提示ポリマーの細胞表層局在機構を推測した。カチオン性ポリマーは、まず膜蛋白質シンデカンのヘパラン硫酸と静電的に結合することが知られている。その後、さらなる静電相互作用による多数のシンデカンの集合化が引き金となりエンドサイトーシスが起きる。しかし、2級アミン提示ポリマーは電離度が低いため、相互作用するシンデカンが少なく、さらに柔軟性の低い棒状構造によりその集合化を阻害するためエンドサイトーシスが起きないと推測される。そのため、他のカチオン性ポリマーでは見られなかった長時間の細胞表層への局在が観察されたと考えられる。

第4章では、ポリマーにより細胞膜上に提示した人工リガンドの認識を利用した細胞の接着制御を検討した。ビオチン-アビジンの特異的な認識に着目し、側鎖にビオチンを持つ2級アミン提示ポリマーを合成し、細胞に導入した。共焦点顕微鏡観察とフローサイトメーターにより細胞膜に人工認識能が導入されたことを確認した。アビジン固定化基板にこの細胞を播種したところ、位置特異的な固定化が観察された。24時間培養後、細胞の良好な伸展ならびに増殖が観察されたことからポリマーの細胞毒性は低く、さらに伸展領域が制限されていることから、分裂した細胞にもポリマーは受け継がれ、その認識能を維持していることが示唆された。以上より、2級アミン提示ポリマーを用いた細胞表層修飾法は人工リガンドを簡便に細胞表面に提示でき、細胞の接着・挙動制御に利用できる事が示された。本手法は、利用可能な細胞種が限定されないことから幅広く細胞工学に応用できると期待される。

また、第5章ではアミノオキシ基提示ポリマーグラフト基材への無保護糖鎖の固定化を行った。代表的な生体分子である糖鎖は、細胞の分化・成長、免疫、老化、ガン化などの生体機能の調節に深く関わっていることが明らかになってきているため、細胞培養基材への応用が注目されている。従って培養基材上に高密度に提示された糖鎖と細胞表面上の糖鎖認識レセプターが強く相互作用することにより細胞の特異的な接着を引き起こすことが期待される。糖鎖固定化にアミノオキシ基と糖鎖の選択的な反応

(Glycoblotting 法) を利用するため、シリコン基板表面にアミノオキシ基を側鎖に持つポリマーをグラフト重合した。その後、糖鎖と反応させ、その固定化を蛍光標識レクチンの結合により確認した。作製したグラフト型糖鎖基材上で線維芽細胞の接着形態を観察した結果、糖鎖の導入により細胞の形状に大きな差が観察された。本研究で作製した基材は様々な糖鎖を一段階で提示することが可能であり、今後細胞分化の調節など糖鎖の新規な機能解析のみならず、糖鎖の生体適合性を利用した医療材料の表面被覆剤への展開が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	居城邦治
副査	教授	喜多村 昇
副査	教授	鈴木孝紀
副査	教授	坂口和靖
副査	教授	村越 敬

学位論文題名

Design of artificial ligand-appended polymers for non-covalent modification of cell surface

(非共有結合型細胞表層修飾のための人工リガンド提示ポリマーの分子設計)

細胞膜は細胞外環境との相互作用を担い、細胞接着やシグナル伝達を調節する重要な器官である。そのため細胞膜に人工リガンドを提示できれば細胞が外部から受ける刺激をコントロールすることが可能となる。目的の薬剤を積極的に取り込ませる事や目的の場所に細胞を接着させる事が可能になれば、医療やバイオセンサー作製への貢献が期待される。しかし、これまで報告されているリガンド提示法は、共有結合による膜蛋白質の修飾や疎水性相互作用を利用した細胞膜への脂質誘導体挿入法であるため、天然のシグナル伝達の攪乱による高い細胞毒性やリガンド提示時間が短い事など問題があった。

本論文は、細胞表面に高分子を用いて人工リガンドを導入する手法、およびそのリガンド認識能を利用した細胞の接着制御に関して報告している。細胞表面がアニオン性であることに着目し、カチオン性高分子を静電相互作用によって細胞表面に固定化する手法は、従来法に比べ低毒性且つ長時間人工リガンドを細胞表面に提示出来ることを見出している。高分子に導入するアミノ基の級数の違いにより細胞上での局在が大きく変化し、細胞表面への局在には2級アミノ基の導入が最適であることを示した。この2級アミノ基提示高分子は、細胞培養条件において他のカチオン性高分子とは異なり、高分子中の2級アミノ基の電離度が低く棒状構造を有しているため、細胞内への取り込みが抑制され細胞表層に保持されることを明らかにした。また、高分子により細胞表面に提示したリガンドの特異的な結合を利用することで、細胞-基板間および細胞-細胞間の接着制御を行い、細胞アレイおよび細胞シートの作製が可能である事を報告している。

これらの結果は、カチオン性ポリマーによる細胞表層修飾法が細胞を用いたバイオセンサーの構築のみならず、近年注目されている再生医療実現に貢献する有用な技術である事を他に先駆けて見出したことを意味している。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格のあるものと認める。