

内996

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

細胞接着挙動の定量的解析と温度応答性表面
による細胞の接着制御

Quantitative Analysis for Cell Adhesion and Modulation of
Cell Interactions on Temperature-Sensitive Surfaces

申請者

内田 勝美

Katsumi Uchida

応用化学 化学工学

1999年10月

事故や先天的欠損症、癌などの疾患により、非常に多くの人々が組織や臓器を失っている。アメリカの統計では、臓器障害を持つ患者数は年間数百万人、外科的処理はのべ800万件、医療費は4000億ドルにも及ぶ。外科的再建技術の進歩はあるものの、未だ不完全であり、種々の化学反応の場である肝臓のような器官を外科的処理のみで再建することはおそらく不可能であろう。また、移植にはドナー数が圧倒的に不足している。たとえば全米で肝障害により年間3万人が死亡しているのに対し、ドナー数は3000を下回る。このような背景から、人工臓器の開発が強く望まれている。人工材料のみから作る人工骨、人工関節、人工腎臓（ダイアライザ）、人工心臓が実用化されているが、近年、細胞と人工材料を組み合わせた肝機能補助装置などのハイブリッド型人工臓器も注目を集めている。いずれにおいても、生体組織と人工材料との相互作用をいかに制御するかが重要な課題である。人工臓器の多くが血液と接触し、血液がこうした人工臓器と接触するために生起する血栓形成反応は大きな障害となっている。よって、人工臓器などに用いる材料を設計する上で、材料表面上での血栓形成をどのように抑制するかが克服すべき最重要課題の一つである。また、ハイブリッド型人工臓器の開発においては、人工材料表面における細胞接着などの種々の細胞機能をいかに制御するかが重要な問題である。

本論文では、以上のような背景のもとで、人工材料表面における細胞機能、特に細胞の接着挙動を制御することを目的とし、以下の点について議論した。血液と接触する材料において、血栓形成反応に大きく寄与する細胞、つまり血小板の活性化を防ぐことが重要である。血小板の活性化は、血小板が材料表面に接着し、偽足形成などの形態変化を起こすことによって生起する。材料の中には、血栓ができるにくい材料、抗血栓性材料と呼ばれる材料が知られており、それらの材料を用いて、血液成分、特に血小板の材料表面への接着、および形態変化を定量的に解析した。さらに、材料表面上の血小板の動的挙動を解析し、血小板の活性化抑制のメカニズムについて議論した。これにより、細胞の中でも外的環境変化に最も鋭敏に反応する血小板の粘着メカニズムに関する知見が得られ、細胞接着制御の概念を示した。温度応答性高分子ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) を材料表面に導入することによって、温度変化のみで材料表面の濡れ性を制御できる。この表面の物性変化により、血管内皮細胞や肝細胞などの細胞は、温度変化のみで材料表面上を接着・脱着する。タンパク分解酵素やキレートなどの化学的処理を行わず、きわめて非侵襲的な方法で細胞を回収できる。これらのこと我々はすでに明らかにしているが、この表面を用いて、血小板の接着挙動の解析を行い、細胞の接着制御と表面特性との相関性について議論した。

本論文は全5章より構成される。

第1章では、血小板の粘着挙動に関する解析法についてまとめ、その解析法の妥当性について検討した。次に、抗血栓性材料に関する既往研究をまとめ、材料

表面と血小板粘着との相関性について整理した。さらに、温度応答性高分子を利用した、温度変化に伴う材料表面の親水性・疎水性変化による細胞の接着・脱着制御に関する既往研究をまとめた。以上述べた既往研究の現状を概説し、その問題点を提示することによって、本論文の目的およびオリジナリティを明確にし、本論文の主旨を概説した。

第2章では、血小板の粘着挙動に関する解析法について検討した。血小板と材料との相互作用を解析する上で、材料を生体内で使用する *in vivo* および *ex vivo* 解析法が用いられてきたが、動物の負担が大きい、費用及び時間がかかる、リアルタイムの解析結果が得られない、個体差および実験系が複雑すぎるといった多くの難点がある。そこで、生体外でおこなえる簡便な解析法が望まれている。本章では、蛍光顕微鏡および位相差顕微鏡、CCD カメラ、VTR 装置、画像解析装置、測定セルからなる解析装置を開発した。最初の方法として、*in vivo* および *ex vivo* 解析法の結果と相関が得られるように、全血を用い、流動下で測定可能な、*in vivo* に近い状態で測定できる方法を考案した。蛍光色素メパクリンで血小板を標識し、フローセル部に装着した材料と全血を接触させることによって、材料表面に接着した血小板の挙動を解析した。材料表面に接着した血小板を蛍光顕微鏡で観察し、その画像をビデオテープに録画し、画像解析装置によって材料表面への血小板の粘着量を観察部位に対する粘着血小板の占有面積比で算出した。ハードセグメントの化学組成のみが異なるセグメント化ポリウレタンにおける血小板の粘着率の差を検知できることから、有用な解析法であることが示された。さらに、血小板浮遊液を用いて、材料表面上における血小板の動きを測定する方法を考案した。血小板浮遊液をバッヂセルに入れ、位相差顕微鏡を用いて材料表面上における血小板の動きを観察する。その画像をビデオテープに録画し、画像解析装置によって材料表面上の血小板の運動性および速度を解析した。抗血栓性材料である、2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)とスチレン(St)からなる、HEMA-St ブロックコポリマーおよびポリエチレングリコール(PEG)表面における血小板の運動性を解析した。その結果、HEMA-St ブロックコポリマー表面上では、接触初期の血小板の動きは、方向や速度はランダムであったが、時間の経過と共に一定の方向に動くようになった。それに対し、PEG 表面上では、時間の経過に関わらず、ランダムな動きを続けていた。抗血栓性材料における血小板の動きの違いを観察でき、有用な解析法であることが示された。

第3章では、抗血栓性材料である、多相系材料(HEMA-St ブロックコポリマー)、高親水性材料(PEG)、生理活性物質を利用した材料(ヘパリン化表面)、生体膜類似表面を有する材料(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリンコリン(MPC)共重合体)における血小板粘着率、血漿タンパク、補体などの血液成分の挙動解析を、フローセルを用いた *in vitro* 解析法および、拍動型左心室補助装置(LVAD)による *ex vivo* 解析法より行った。その結果、材料との接触初期に

おける血小板の粘着量がその後の血栓形成に反映し、吸着タンパク層の組成及び厚さが材料表面の抗血栓性に影響を及ぼすことがわかった。補体活性と血小板粘着量との相関性はなかった。さらに、ラマン分光法の解析結果より、材料表面における自由水、タンパクの構造変化および血小板粘着量との相関性が得られ、自由水の量が多いほどタンパクの構造変化が少なく、血小板粘着が抑制された。これより、血小板の粘着を抑制するメカニズムの指針が得られた。

第4章では、抗血栓性材料である、HEMA-St ブロックコポリマー、PEG 表面における血小板の運動性を解析した。HEMA-St ランダムコポリマーと比べて両表面における血小板の動く速度は大きいが、2章でも述べたとおり、HEMA-St ブロックコポリマーと PEG 表面における血小板は異なる運動性を示した。そこで、血小板の動的挙動のメカニズムを解明するために、血小板に ATP 合成能阻害剤を導入して、血小板の運動性を解析した。その結果、HEMA-St ブロックコポリマー表面上における血小板は、代謝阻害剤の影響により動きが抑制されたのに対し、PEG 表面上における血小板は、運動の抑制は認められなかった。PEG 表面上での血小板の動きは ATP 合成を伴わないのに対し、HEMA-St ブロックコポリマー表面上での血小板の動きは、ATP を利用して血小板膜の動きに影響することが示唆された。PEG 表面は親水性が高いため、疎水性相互作用やイオン結合が弱く、物理化学的な相互作用による血小板の受動的な粘着を抑制するのに対し、HEMA-St ブロックコポリマー表面は、血小板の受動的な粘着は生じるが、血小板は活性化せず、ATP を利用して材料表面から脱着することが明らかになった。以上のことから、血小板粘着抑制のプロセスが明らかになり、材料によってそのプロセスが異なることが示唆された。

第5章では、温度応答性高分子ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を材料表面に導入し、温度により表面の濡れ性を制御することによって、血小板の動きを制御することを目的とした。PIPAAm グラフト表面は、温度により表面の濡れ性が変化し、低温側では、表面は親水性を示し、30度付近で急激に疎水性に変化した。血小板の動きは表面の濡れ性に応答し、表面が親水性の場合は、PEG 表面の場合と同様に血小板は活性化せず、細かい振動をしていた。一方、表面が疎水性になると、血小板は直ちに活性化し、偽足形成して動きは止まった。4章と同様、代謝阻害剤の有無による血小板運動性の影響を調べたが、PEG 表面と同様の結果が得られた。以上の結果より、血小板が温度変化による表面の親水性-疎水性変化を鋭敏に認識し、表面の物性変化によって血小板の機能を制御できることが明らかになった。

以上のように、本論文は、材料表面上における血小板粘着メカニズムを解明し、温度応答性表面を用いて血小板の粘着挙動を制御する、きわめてユニークな概念を提示した。その結果、抗血栓性材料の開発のみならず、組織工学の応用的発展に大きく寄与できると考える。