

免疫細胞の分離を志向した糖残基修飾界面の創製

Preparation of sugar chain modified bio-interfaces for separation of immune cells

助成年度 令和3年度研究助成
助成番号 MZR2022004
研究期間 2022/04/01 ~ 2023/03/31
代表研究者 能崎 優太 (Yuta Yoshizaki)
東北大学大学院 薬学研究科 分子薬科学専攻

キーワード 星型高分子, リン脂質ポリマー, 細胞接着抑制, 選択的細胞接着

1. 研究の背景と目的

免疫細胞を選択的に捕捉し、機能的に均一な細胞集団を分離することができるインテリジェント界面を創製することを目的とする。樹状細胞などの抗原提示細胞は獲得免疫を制御するための鍵となる細胞であり、異常な細胞やウイルス、細菌の排除や自己組織への寛容といったホメオスタシスの維持において重要な役割を果たしている。特にアレルギーや自己免疫疾患においては、抑制性の免疫細胞を局所で生じさせることが重要である。樹状細胞を任意の場所に集め、特定の機能を持つ細胞を集めることができれば、免疫が関連している疾患の治療に役立つと考えられる。

最も理想的な生体親和性界面は、天然の細胞膜表面そのものである。細胞膜はリン脂質分子の集合体からなる二分子膜で構成され、リン脂質二分子膜の細胞外水相面と細胞内水相面ではリン脂質分子の種類が異なる。細胞の外側と水相との界面は電氣的に中性なホスホリルコリン(PC)基を有するリン脂質分子が80%を占めている。このPC基を側鎖に有するメタクリル酸エステルとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) が知られている[1]。MPCを一成分とした共

重合体、MPCポリマーは、高分子、ラミックス、金属など医療機器に幅広く利用されている材料にコーティングすることが可能で、人工細胞膜表面を作り出すことができる。MPCとn-butyl methacrylate (BMA)を共重合したポリマー、poly (MPC-random-BMA) (PMB)でコーティングした表面は生体親和性に優れ、とくにMPCユニットが約30mol%のPMBを用いたコーティングが最も細胞接着抑制効果が高いことが明らかとなっている[1]。またフェニルボロン酸成分を含むリン脂質ポリマーをコーティングした表面は、ヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60)を一時的に接着させ、機能的に細胞を分離することに成功している[2]。

一方、スターポリマーは、1つの原子または複数の原子団を中心として、そこから3本以上のポリマー鎖が連結した構造を持つ分岐ポリマーと定義される。重合技術の発展に伴い、スチレン系、ジエン系の枝ポリマーを持つスターポリマーが種々合成されてきた。分岐構造を持つことでスターポリマーはコンパクトな形態・サイズ、低粘度といった直鎖型ポリマーとは異なる溶液物性を示すことが明らかになった。近年ではリビング重合系やその開始剤、触媒系の飛躍的な進化により

スターポリマーの精密合成と機能化が盛んに研究されている。特にモノマー配列を制御したブロック配列型のスターポリマーを表面に展開した場合では、マイクロ相分離構造と呼ばれる周期構造をとる場合があり、特定の機能を界面にインストールするのに有効である[3]。

貪食細胞であるマクロファージや樹状細胞は、病原体の表面に存在する分子構造の繰り返しパターンを認識するパターン認識レセプターを持っていることが知られ、その一つとしてマンノース結合レクチン(MBL)がある。MBLは規則正しい間隔で分布するマンノースやフコース残基に結合するが、不規則な間隔で分布するマンノースやフコース残基には結合しないという性質を持っている[4]。したがって、人工的に糖鎖残基の配列を制御した表面を構築することができれば、特定の細胞のみを捕獲できる表面の創製が期待できる。

そこで本研究では、原子移動ラジカル重合を用いて、構造が精密に制御されたポリマーを合成する。ポリマーの分岐数や親水性ブロックと疎水性ブロックの鎖長を変更したポリマーを合成し、コーティングした基板に接着する樹状細胞の数を調べる。親水性のユニットとして MPC を用い、疎水性ユニットには BMA を用いた。MPC は細胞膜の構成成分であるリン脂質極性基と類似の化学構造を持ち、そのホモポリマーや BMA との共重合体は免疫系に認識されず、生体適合性に優れ、タンパク質非吸着性や細胞非接着性といった特性

を持つ。さらに機能性のユニットとして糖残基やボロン酸を導入すれば、接着できる細胞を選別することが可能になると考えられる。本研究では図1に示すような直鎖のポリマーおよび4分岐型のスターポリマー材料を合成し、基板にコーティングすることで細胞の分離を志向したバイオインターフェースを創製することを目的とした。まずは最初のステップとして様々なモノマー配列を持つ4分岐型スターポリマーを合成し、基板にコーティングして、基板表面の元素分析や細胞接着抑制性を調べた。さらに機能性ユニットの導入に関する検討を行ない、樹状細胞の分離について基礎的な検討を行なった。

2. 研究の内容・方法

(2-1) ポリマーの合成

原子移動ラジカル重合(ATRP)により親水性モノマーMPC, 疎水性モノマーBMAを用いて4分岐ポリマーおよび比較対照用の直鎖型ポリマーを合成した。水不溶性ポリマーを得るため、本研究では MPC:BMA の仕込み比を 20:80 (mol%) に固定してポリマーの合成を行った。分岐構造内での配列の影響を調べるためにランダムコポリマー、およびコア部分が MPC, 末端部分が BMA となるブロックコポリマー、コア部分が BMA, 末端部分が MPC となるブロックコポリマーを合成した。具体的には、溶媒のエタノールに、ペンタエリスリトールテトラキス(2-ブロモイソブチレート)を開始剤として加え、銅触媒として臭化銅(II)、配位子として 2,2'-ビピリジン(bpy)、銅触媒の還元のためにアスコルビン酸を添加した反応系で各モノマーを混合した。アルゴンガスを用いて溶存酸素を除去し、60°Cに加熱して22時間攪拌することで重合した。精製操作として良溶媒にクロロホルム、貧溶媒をジエチルエーテル/ヘキサンを用い、再沈殿を2回繰り返した。

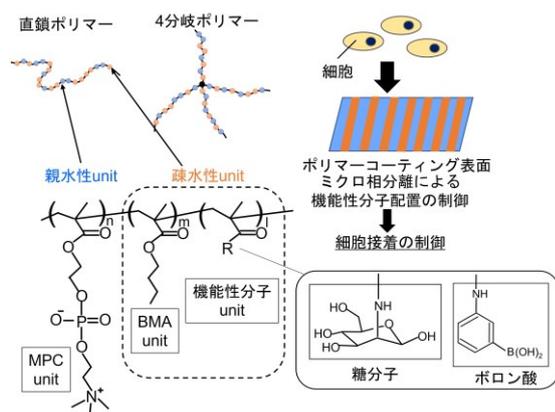


図1 本研究の概要。ポリマーの構造。

(2-2) 基板へのポリマーコーティング

合成したポリマーを 0.2 wt% になるようにエタノールに溶解させた。ポリエチレンテレフタレート (PET) 基板は調製したポリマー溶液 1 mL に浸漬することでコーティングした。ウェルプレートを用いる場合はマイクロピペットを用いて、各ウェルに作製したポリマー溶液 1 mL を入れ、すぐに吸い取ることでコーティングを行なった。その後、油回転ポンプを用いて減圧したデシケーター内に 24 時間静置して溶媒を留去し、ポリマーコーティング基材を得た。

(2-3) 細胞接着

10 cm シャーレで培養した HeLa 細胞を PBS で洗浄後、トリプシン処理により接着した細胞を剥離させて遠沈管に移し、90 g で 3 分間遠心分離を行った。遠心分離後の上清をアスピレーターで除去した。ウシ胎児血清 (FBS) 10%、抗生物質のペニシリン/ストレプトマイシン 1% を含む DMEM 培地に再懸濁し、 1.0×10^5 cells/mL となるように調製した。ポリマーでコーティングしたウェルプレートを 30 分間 PBS に浸漬した。30 分後、アスピレーターで PBS を除去し、FBS を 10%、抗生物質のペニシリン/ストレプトマイシン 1% を含む DMEM 培地を 0.5 mL ずつ各ウェルに入れた。その後 1.0×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を 0.5 mL ずつ各ウェルに加え、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で 24 時間培養した。24 時間後に位相差顕微鏡で観察を行い、アスピレーターで培地を除去後、PBS 1 mL で 3 回洗浄後、PBS 1 mL を添加し、再度観察を行った。洗浄後の表面に接着伸展している細胞の数をカウントした。

3. 研究の成果

(3-1) ポリマー合成の結果

モノマー配列の異なる 3 種類のポリマーを合成に成功した (図 2)。MPC と BMA がランダム配列のポリマー (4arm-rPMB)、開始剤から BMA ブロックユニットを伸長させてその後 MPC のブロックを伸長させたポリマー (4arm-bPBM)、MPC ブロックを

伸長してから BMA ブロックを伸長したポリマー (4arm-bPMB) を合成することができた。プロトン核磁気共鳴 (¹H-NMR) スペクトルから MPC ユニットと BMA ユニットの組成は、MPC:BMA = 2:8 であることが分かった。この組成は合成時に仕込んだモノマー組成に概ね一致した。ゲル浸透クロマトグラフィー測定から重量平均分子量が 4 万程度のポリマーであることが分かった。合成したポリマーはエタノールに溶解する一方で、水には溶解しないことを確認した。また、BMA ブロックを伸長する場合は配位子として bpy ではなく、N,N',N'',N'''-ペンタジエチルトリアミンを用いることでポリマーを合成できることが分かった。

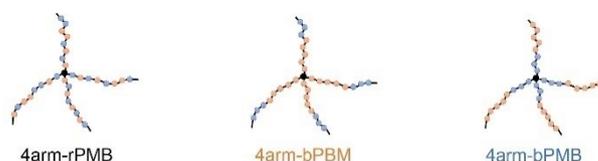


図 2 合成したポリマーの概要図

(3-2) ポリマーコーティング表面の分析

PET 基板にコーティングしたポリマーについて X 線光電子分光法 (XPS) を用いて表面の化学組成を分析した (検出角度: 45°)。図 3 に 122 eV から 144 eV を走査したスペクトルを示す。131 eV 付近にリン元素 (P) の 2p 軌道の光電子に由来するピークが見られた。

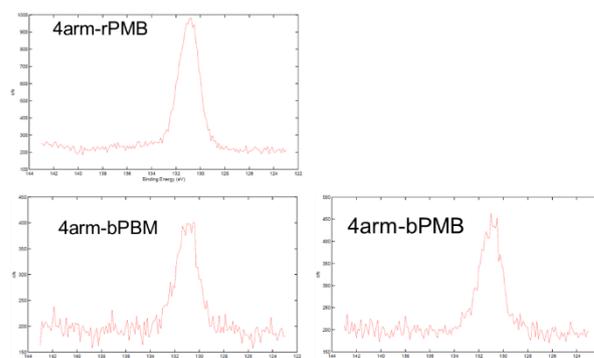


図 3 各ポリマーコーティング PET 表面の P2p スペクトル
したがって、本研究で合成した 4 分岐型スター

ポリマーを用いてPET基板をコーティングできることを確認した。

(3-3) 細胞接着抑制効果

接着細胞を培養する際に汎用されるウェルプレートを用いてポリマーコーティング表面への細胞接着挙動の評価を行った。コントロールとしてポリマーをコーティングしていない Tissue culture polystyrene (TCPS) 表面、さらに既報[1]で優れた細胞接着抑制効果を示すことが報告されている Poly (MPC-random-BMA) 30 (rPMB30) をコーティングした表面を用いた。rPMB30は α , α' -Azobis(isobutyronitrile) (AIBN) を開始剤として合成した。結果を図4に示す。TCPSでは細胞接着が確認されたが、rPMB30コーティング表面では先行研究でも報告されているように接着細胞は観察されなかった。4分岐型スターポリマーコーティング表面でも細胞接着は抑制されることが分かった。これはスターポリマーでも表面コーティングをすることが可能であり、MPCユニットに由来する細胞接着抑制効果を発現した結果であると考えられる。

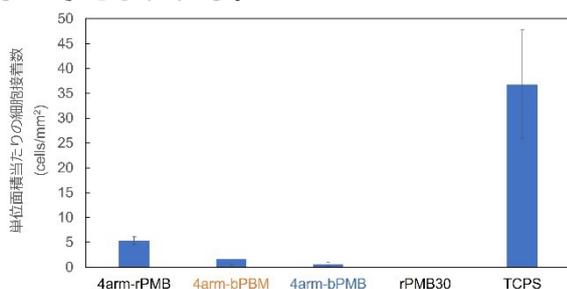


図4 各ポリマーコーティング表面への接着細胞数

スターポリマーをコーティングした表面ではそのモノマー配列の違いにより、接着細胞数がわずかに異なった。この結果についてより詳細に検討するため、細胞懸濁液との接触させた後の洗浄操作を行なう前後で、光学顕微鏡による観察を行なった(図5)。4分岐ポリマーコーティング表面では、細胞接着数に大きな差は見られなかった。3種類のポリマーコーティング表面への細胞接着数に大きな差はないものの、洗浄後の様子に違い

がみられた。ランダムポリマーコーティング表面では、洗浄しきれなかった球状細胞や細胞同士が接着した細胞凝集塊が洗浄後の表面でも見られたが、ブロックポリマーコーティング表面、特に4arm-bPMBコーティング表面ではそれらがほとんど見られなかった。その理由として、ブロックポリマーであることにより、ランダムポリマーよりも1つのPMBユニットのサイズが大きいことで、コーティング表面の粗さが異なり、その差が関与していることが理由の一つとして考えられる。また、この結果から4arm-bPMB表面では、末端部分がコア部分の下に隠れるように基材表面へポリマーがコーティングされていると考えられる。その結果、非接着細胞の除去が容易だったと考えられる。また、洗浄後の表面に再び細胞を播いたところ、同じように細胞接着の抑制効果を確認した。したがって、本研究で構築したポリマーコーティング表面は、繰り返し使用できる再利用性を示すことが分かった。

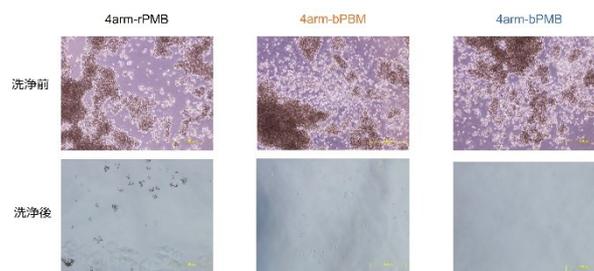


図5 各ポリマーコーティング表面の洗浄操作前後の位相差顕微鏡像

(3-4) 免疫細胞分離に関する実験

4分岐型のスターポリマーについてMPCユニットとBMAユニットさらに図1に示したようにフェニル硼酸ユニットを導入した三元系スターポリマーを合成し、(2-2)および(2-3)と同様の方法で細胞懸濁液と接触させた。細胞の種類はマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を用い、予めリポ多糖 (LPS) で刺激した細胞群と未処理の細胞群と分けて実験を行なった。三元系スターポリマーをコーティングした表面ではLPSで刺激したDC2.4細胞は接着せず、LPS未刺激の細胞は接着した。DC2.4細胞はLPSの刺激によって、細胞表面に発現する

糖タンパク質などの発現が変化する。つまり、細胞表面に発現している分子の変化に応じてポリマーコーティング表面への細胞接着性が変化したと解釈することができる。以上より、機能的に異なる免疫細胞を分離できる表面を構築できるコーティング材料として4分岐型スターポリマーが有用であることが示唆された。

4. 結び

本研究では、生体親和性に優れた MPC ポリマーを4分岐型のスターポリマーとして合成し、細胞分離を目的としたバイオインターフェースの開発をおこなった。疎水性ユニットとして n-butyl methacrylate (BMA) を用い、MPC ユニットが仕込み比で 20 mol% のランダムポリマーと 2 種類のブロックポリマーを合成した。¹H-NMR 解析の結果、合成したポリマーはおおよそ仕込み通りの組成比であることがわかった。ブロックポリマーに関しては末端側に重合したユニットの組成比が低下する傾向が認められた。溶解性試験により、合成したすべてのポリマーは水不溶性であり、エタノールに可溶であることが分かった。ディップコート法により合成したポリマーを基板にコーティングすることで、MPC スターポリマーコーティング表面を作製した。表面の XPS 解析の結果、基板へのポリマーコーティングができていることを確認した。HeLa 細胞を用いたコーティング表面への細胞接着挙動を評価した結果、ポリマーの分岐構造や配列に関わらず優れた細胞接着抑制性があることが分かった。また、スターポリマーコーティング表面については、各ユニットの配列を明確に規定したブロックポリマーにおいて、配列が不明瞭なランダムポリマーと比較して、非接着細胞の除去性（洗浄性）に優れることが示唆された。さらにフェニルボロン酸構造を機能性ユニットとして導入した4分岐型スターポリマーコーティング表面は、LPS で刺激した DC2.4 細胞は接着しないが、未刺激の細胞は接着したことから免疫

細胞の分離が可能なバイオインターフェースを構築することができた。

5. 今後の研究方向性・課題

今後の課題として、BMA と共重合した PMB スターポリマーにとどまらず、MPC のホモポリマーをスターポリマー化し、その末端官能基変換により物理吸着ではなく化学吸着により表面修飾が可能なスターポリマーの合成および表面修飾を行い、その特性評価をおこなうことや、PMB スターポリマーに新たな機能を持つ第三のモノマーユニットを組み込んだ三元系スターポリマーを合成する。特に本研究では糖残基を修飾したスターポリマーの合成については未だ十分に検討できていないため、糖分子を導入したポリマーの合成をおこなう予定である。さらに接着した細胞と接着しない細胞についてその機能を調べることで、分離可能な細胞に関する基礎的な知見の確立を行なう。新たなバイオインターフェースの創製を目指し、コーティング用ポリマー材料の合成と評価をおこなっていく。

6. 参考文献

- [1] K. Ishihara. *J Biomed Mater Res A*. **2019**, *107A*, 933-943.
- [2] K. Ishihara *et al.* *Macromol Biosci*. **2021**, *21*, 2000341.
- [3] J. Chen *et al.*, *Smart Mat.* **2021**, *2*, 367-377.
- [4] B. Lepenies *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev*. **2013**, *65*, 1271-1281.

学会発表

第 71 回高分子討論会 「星型リン脂質ポリマーによる細胞内デリバリー」能崎優太, 金野智浩