

Mini Review

Notch ligand コンジュゲート高分子マトリックス

金野智浩¹⁾, 坂野誠治²⁾, 東田修二³⁾, 伊藤嘉浩^{1,4)}

¹⁾財団法人神奈川科学技術アカデミー「再生医療バイオリアクター」プロジェクト
(現 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻)

²⁾旭化成株式会社 先端材料・融合研究所

³⁾東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 臨床検査医学分野

⁴⁾理化学研究所 中央研究所

Preparation of polymer matrix bioconjugated with Notch ligand

It is important to prepare the cell culture devices with functional polymer surfaces. Notch ligand delta-1 is considered as one of the important membrane proteins for self-renewal of hematopoietic stem cells. In this study, a polymer matrix immobilized with Notch ligand delta-1 was prepared by photo-immobilization technique for culture the stem cells. It has been reported that photo-reactive polymers bearing azidophenyl groups could immobilize functional proteins without losing their biological activity. Therefore, a novel photo-reactive phospholipid polymer, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer bearing azidophenyl groups, was applied as the matrix to conjugate with Notch ligand delta-1. A leukemia cell line, TMD7, was cultured on the bioconjugated polymer surface. The polymer surface immobilized with Notch ligand delta-1 was recognized by TMD7, and the cells efficiently grow on the phospholipid polar group concentrated surface (PC surface) with protein. It was considered that the PC surface provided a suitable environment around the membrane proteins without denaturation. The photo-reactive phospholipid polymer was expected to constitute on *in vitro* niche to culture hematopoietic stem cells.

Rec.11/8/2004, Acc.12/22/2004, pp426-430

Tomohiro Konno¹⁾, Seiji Sakano²⁾, Shuji Tohda³⁾ and Yoshihiro Ito^{1,4)}

¹⁾Regenerative Medical Bioreactor Project, Kanagawa Academy of Science and Technology,
(Present address: Department of Material Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo)

²⁾Asahi Kasei Corporation

³⁾Tokyo Medical and Dental University

⁴⁾RIKEN, Discovery Research Institute

Key words Notch ligand delta-1, photo-reactive polymer, phospholipid polymer, photo-immobilization

はじめに

造血幹細胞の未分化維持培養システム(生体外 niche)の構築は再生医療における重要なトピックスである。生体外 niche の構築にはサイトカインや膜タンパク質の機能解明, またはそれらの組み合わせやシグナル伝達経路の解明などに代表される, いわゆる細胞生物学の視点からの研究が重要であることはもちろんのこと, 一方, それら

の成果を得るための基礎材料, またはそれらの成果を反映した材料工学研究の推進が必須である。生体外において造血幹細胞の自己複製を促すためには, あらかじめストローマ細胞層を形成する必要がある。このストローマ細胞層による造血支持機構の一つに細胞膜(造血幹細胞-ストローマ細胞)同士の直接接触が考えられる。この機構の一つに Notch シグナルが考えられている¹⁾。ストローマ細

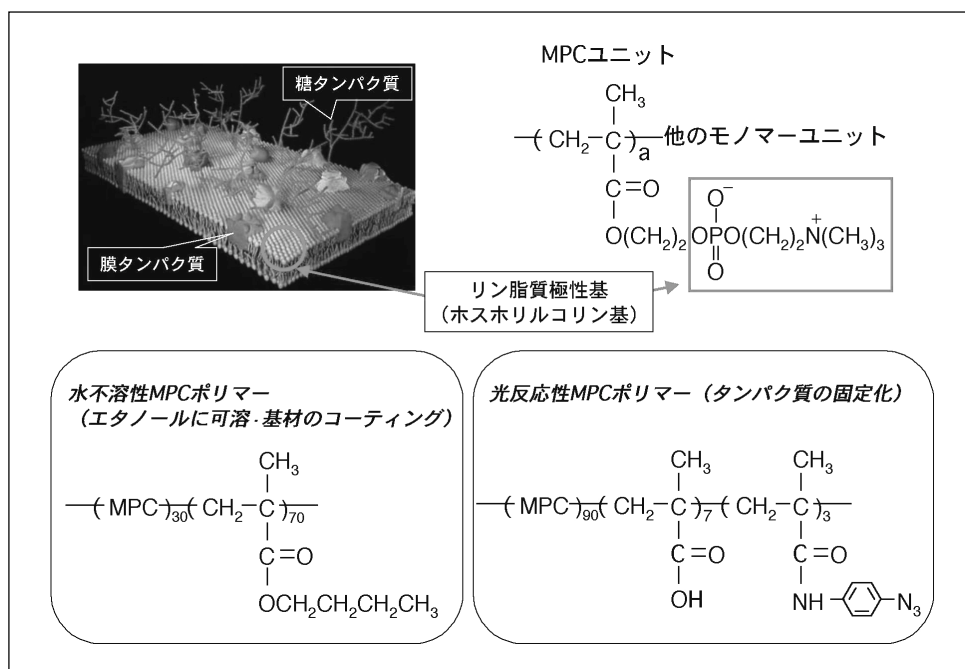


図1 生体膜表面の模式図と代表的なMPCポリマーの構造式 (水不溶性 光反応性)

胞の細胞膜に発現している Notch ligand delta-1 は、造血幹細胞側に発現しているレセプターを介してシグナル伝達し、造血支持機構に寄与していると考えられている。一方、材料工学においても新しい分子設計概念の下、培養基材表面に生体膜類似構造を構築することができるポリマーバイオマテリアルが創製されている。本稿では、新しいポリマーバイオマテリアルに Notch ligand delta-1 の機能をインプットした光固定化バイオコンジュゲート培養基材について概説する。

リン脂質ポリマー

造血幹細胞やストローマ細胞にかかわらず、全ての細胞 (生体) 膜表面はリン脂質極性基の高集積化表面を形成している。つまり、生体細胞の緻密な機能はタンパク質により制御されているが、それらのタンパク質が効率的に機能する「場」を提供しているのはリン脂質極性基表面であると言える。特に膜タンパク質を介した細胞への効率的なシグナル伝達機構は当然のごとく細胞膜表面を支持体として行われている。細胞膜表面では中性のホスファチジルコリン (PC surface) が支配的となっている。

1990 年に石原らは高分子合成化学を駆使してメタクリル酸エステルの側鎖に生体膜同様のホスホリルコリン基を具備した 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) を一成分とした MPC ポリマーを報告した (図 1)²⁾。つまり、MPC は生物学的なデザインセンスを取り入れた

全く新しいタイプのポリマーバイオマテリアルである。MPC ポリマーの材料としての物理化学的な特性評価はもちろんのこと、生化学的評価も積極的に展開され、現在では特に血液と接触するデバイスの表面修飾に利用されている。MPC ポリマーは合成高分子であるため、目的に応じた任意の分子設計が可能である (水溶性、非水溶性、組成、モノマー配列...)。とりわけ MPC ポリマーの最大の特長は生体内・生体外問わず、生体反応を実質的に制御しているタンパク質との非特異的な相互作用を全く誘起しないことである³⁾。さらには MPC ポリマー上で培養した細胞や接触した細胞からは他の基材表面と比較して、ストレスを受けると放出する一連の炎症性サイトカインの発現が全くみられないことが明らかとされている⁴⁾。これは培養基材を PC surface としたことによって細胞にとっての生体異物表面 (吸着 → 変性タンパク質層) と認識されていないためであることが考えられる。生体外 niche の構築を考慮する際に、最も基礎的な表面として PC surface を利用し、さらに特定のタンパク質 (本研究においては Notch ligand delta-1) を固定化することで効果的な機能発現につながると期待できる。

光固定化法 (光バイオコンジュゲート)

生体情報分子 (タンパク質類) の培養基材表面への固定化方法は疎水性相互作用や静電的相互作用などの物理吸着のみならず、化学固定化系においてもこれまでに種々検討

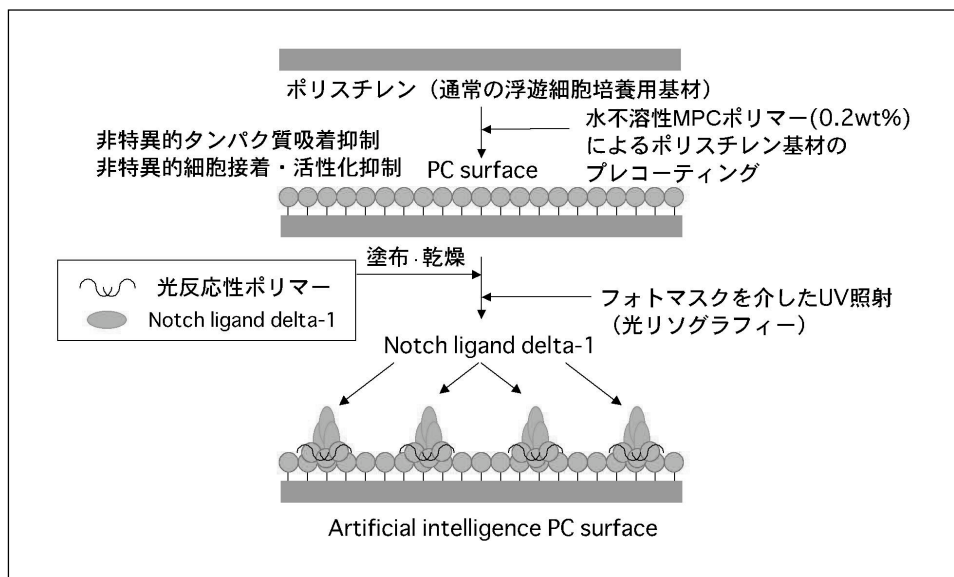


図2 光反応性ポリマーによるNotch ligand delta-1の光固定化の方法と模式図

されてきた。特に汎用性の高い固定化方法の一つに松田らにより報告された光反応性ポリマーの利用があげられる⁵⁾。光反応性ポリマーは紫外光照射することで10秒以内に培養基材表面上に共有結合により架橋することが可能である。また、水溶媒系であることから、タンパク質などもその結合部位を選定することなく容易に培養基材表面に固定化することができる。光固定化タンパク質は結合に配向性はないが、機能発現するのに十分な活性を維持していることが細胞生物学的観点からも検討されており、ダウンレギュレーションの抑制など培養基材への固定化による利点が種々報告されている⁶⁾。造血幹細胞培養においてもストローマ細胞との細胞膜を介した直接接合の影響が大きいと考えられる。つまり、生体外 niche をデザインするには、培養基材表面からの刺激因子を活性を維持した状態で固定化することが重要である。光反応性ポリマーによるタンパク質固定化培養基材は、生体外で細胞を取り扱う際における新しい培養基材創製の方法の一つとして期待できる。

Notch ligand delta-1マイクロパターン固定化

Notch ligand delta-1 は既報に従い調製した¹²⁾。本研究では光反応性 MPC ポリマー⁷⁾を Notch ligand delta-1 固定化の支持体として用いた。つまり、培養基材表面に構築されるリン脂質極性基の高集積化表面を膜タンパク質のサポートレイヤーとした。基材表面への非特異的なタンパク質吸着は誘起せず、特定の膜タンパク質をランダムに固定化

することで、生物機能がインプットされた培養基材表面となると期待できる。ポリマー材料を光反応性としたことでタンパク質の固定化のみならず、培養基材上におけるマイクロパターン化加工も可能である⁷⁾。各種光反応性ポリマーと Notch ligand delta-1 を溶解したコンジュゲート水溶液を培養基材表面に塗布し乾燥後、紫外光照射することで基材表面の光反応性ポリマーを支持体に Notch ligand delta-1 を固定化した培養基材を調製した（図2）。UV 照射時に微細加工技術で利用されるフォトマスクを利用することで、培養基材を幅 150 μm の非固定化領域で隔てた幅 100 μm のストライプ状の Notch ligand delta-1 固定化表面を調製した。

TMD7の認識と増殖活性の向上

本研究ではモデル造血幹細胞として東田らにより樹立された白血病細胞株 TMD7 を用いた^{8,9)}。TMD7 は Notch ligand delta-1 存在下において増幅する株細胞である。基本的には浮遊細胞であるが、培養が長期化するに従い基材表面に非特異的に接着する様子が観察された。

TMD7 を各種マイクロパターン化表面に播種した際の位相差顕微鏡写真を図3に示す。基盤表面を PC surface にしたことで Notch ligand delta-1 固定化領域以外への非特異的な細胞接着を完全に抑制した。その結果、全ての Notch ligand delta-1 固定化マトリックスで TMD7 による特異的な認識を確認できた。一方で、ポリマーのみをマイクロパターン化した場合にはポリマーの性質に依存した異なる応答が観測された。特にポリアリルアミン表面では、Notch

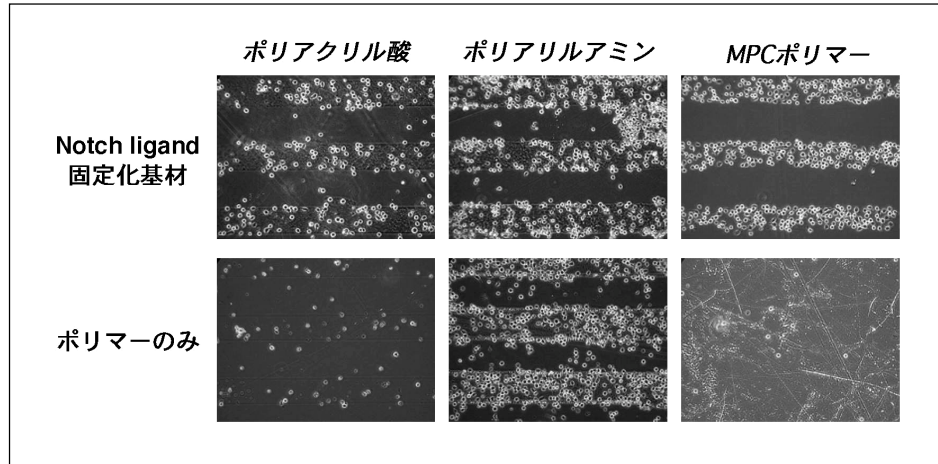


図3 各種光反応性ポリマーを用いてマイクロパターン固定したNotch ligand delta-1 固定化培養基材上でのTMD7 培養（培養1日後）

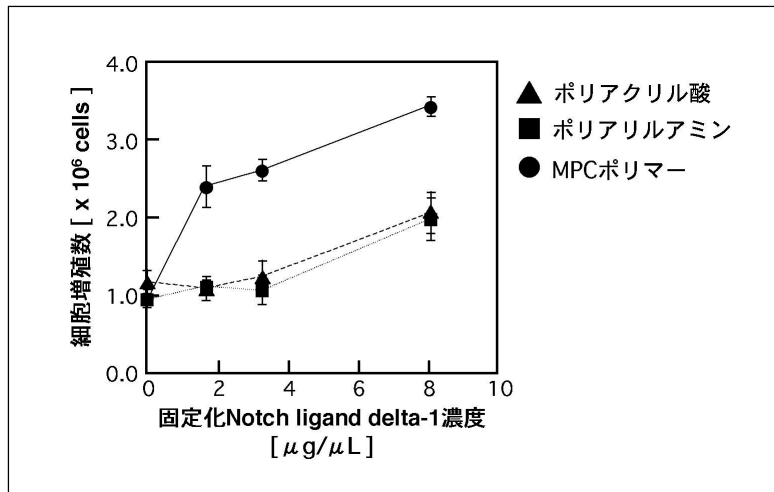


図4 各種光反応性ポリマーを用いてコンジュゲートしたNotch ligand delta-1 固定化培養基材上でのTMD7 の細胞増殖数変化（WST-1アッセイ，培養4日後）

ligand delta-1をコンジュゲートしていない表面においても特異的にTMD7がマイクロパターン化している様子が観察された。これはポリアリルアミン表面が正に帯電しており，培養液中からのタンパク質の吸着のみならず，細胞も静電的に引きつけた結果であると考えられる。リン脂質極性基を有するMPCポリマーや負に帯電しているポリアクリル酸表面では，Notch ligand delta-1をコンジュゲートしていない表面においては，完全にTMD7はそれらの表面を認識していない様子が観察できた。

さらに固定化基材上でのTMD7の増殖能を検討した結果を図4に示す。膜タンパク質リガンドであるNotch ligand delta-1は光反応性MPCポリマーを支持体として固定化した系で顕著な細胞増殖活性を示した（未発表データ）。これまでの研究からMPCポリマーとタンパク質との非特異

的な相互作用は極めて弱く，共存しているタンパク質のコンホメーション変化を誘起しないことが知られている^{3,10,11}。本研究ではその結果，Notch ligand delta-1がnativeに近い環境（細胞膜内での状態）で固定化されたために，他のマトリックスに比較して相対的に高いS/N比を示し，かつ高い活性を保持したと推察できる。

おわりに

生体外での細胞培養システムにおいて細胞が接触しているのは唯一，培養基材表面である。つまり，造血幹細胞の生体外nicheを構築する上で培養基材の表面設計は極めて重要な因子である。細胞機能を実質的に制御しているのはタンパク質であるが，一方で生体外nicheを構築しようとするときに，機能性タンパク質の発現環境を最適化

する必要がある。つまり、PC surface は単に機能性タンパク質の支持体として機能しているにすぎないが、培養システム内で機能性タンパク質を効果的な機能発現に帰結させるための基礎的な基材表面としてPC surfaceは有効であると考えられる。特に Notch ligand delta-1 のように膜タンパク質を固定化して細胞膜内にあるような機能を期待する場合は、顕著にその効果が発現するものとする。

機能性タンパク質のシグナル伝達経路の解明や新規膜タンパク質の発見といった細胞生物学的研究の推進が重要であることはもちろんのこと、それらを見出すための基礎材料、またはそれらの機能を材料システムに取り入れた培養基材の創製が今後の再生医療研究を推進するには必須になると考える。これまでのところ、生体外 niche の構築には未だ至っていないが、細胞との接触界面を制御するバイオインターフェイスサイエンスのさらなる発展により理想とする生体外 niche の構築に、より一歩近づけると考える。

文 献

- 1) Milner LA, Bigas A: Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*, 93(8): 2431-2448, 1999.
- 2) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N: Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membranes. *Polym J*, 22(5), 355-360, 1990.
- 3) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N: Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res*, 39: 323-330, 1998.
- 4) Sawada S, Sakaki S, Iwasaki Y, Nakabayashi N, Ishihara K: Suppression of the inflammatory response from adherent cells on phospholipid polymers. *J Biomed Mater Res*, 64A: 411-416, 2003.
- 5) Sugawara T, Matsuda T: Novel surface graft copolymerization method with micron-order regional precision, *Macromolecules*, 27: 7809-7814, 1994.
- 6) Ito Y, Kondo S, Chen G, Imanishi Y: Patterned artificial juxtactine stimulation of cells by covalently immobilized insulin. *FEBS lett*, 403: 159-162, 1997.
- 7) Konno T, Hasuda H, Ishihara K, Ito Y: Photo-immobilization of a phospholipid polymer for surface modification. *Biomaterials*, 26: 1381-1388, 2005.
- 8) Tohda S, Sakano S, Ohsawa M, Murakami N, Nara N: A novel cell line derived from de novo acute myeloblastic leukaemia with trilineage myelodysplasia which proliferates in response to a Notch ligand, Delta-1 protein. *Br J Haematol*, 117: 373-378, 2002.
- 9) Tohda S, Murata-Ohsawa M, Sakano S, Nara N: Notch ligands, Delta-1 and Delta-4 suppress the self-renewal capacity and long-term growth of two myeloblastic leukemia cell lines. *Int J Oncol*, 22: 1073-1079, 2003.
- 10) Miyamoto D, Watanabe J, Ishihara K: Effect of water-soluble phospholipid polymers conjugated with papain on the enzymatic stability. *Biomaterials*, 25(1): 71-76, 2004.
- 11) Sakaki S, Nakabayashi N, Ishihara K: Stabilization of an antibody conjugated with enzyme by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine copolymer in enzyme-linked immunosorbent assay. *J Biomed Mater Res*, 47: 523-528, 1999.
- 12) Karanu FN, Murdoch B, Miyabayashi T, Ohno M, Koremoto M, Gallacher L, Wu D, Itoh A, Sakano S, Bhatia M: Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood*, 97: 1960-1967, 2001.