

# マクロファージ付着阻害効果による低免疫反応ゲルの創製

黒川 孝幸 [北海道大学創成研究機構／特任助教]  
龔 剣 萍 [北海道大学大学院先端生命科学研究院／教授]

平 敏夫 [株式会社プライマリーセル／研究所長]

## 背景・目的

生体材料を生体に移植すると移植された患者自身の免疫機構によって免疫拒絶反応が起こることから生体材料の交換手術が必要となるといった問題が生じている。特に、免疫系細胞のマクロファージは通常の細胞に比べて付着性が非常に高く、移植された生体材料に付着することで異物として認識し、免疫拒絶反応を促進する。そのため、生体材料に対するマクロファージの付着を制御することは非常に重要である。

そこで本研究では、マクロファージに対して抗付着性を有するゲル基板を探索することにより、臨床において引き起こされる免疫拒絶反応を抑制する生体材料の新しい設計モデルを提案することを目的とする。

## 内容・方法

これまで当研究室で細胞付着率が比較的低いことが明らかとなっている中性のゲルに注目し、中性の polyacrylamide ゲル (PAAm ゲル)、poly (N, N-Dimethylacrylamide) ゲル (PDMAAm ゲル)、そして N-(carboxymethyl)-N, N-dimethyl-2-(methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt ゲル (PCDME ゲル) を合成した。このうち PAAm ゲル、PDMAAm ゲルは低い細胞付着率が明らかになった中性のゲルである。これらの基盤ゲル上で iPS 細胞を培養すると、細胞は基盤に付着せずに塊を形成し、未分化性を保っていた。また、PCDME ゲルは近年、細胞付着に影響を及ぼすタンパク質の付着率が低いことが明らかとなった両性イオン性のポリマーで構成されたゲルである。これらのゲルの溶媒を緩衝液 (HEPES buffer) に交換し、オートクレーブ処理 (120℃, 20分) により滅菌した。その後あらかじめ培養しておいたマウス由来マクロファージを各種基板上に播種し、時間経過後に視野中の基板上に残った付着細胞の数をカウントし、評価した。また接触角計により各種基板の純水に対する接触角を測定し、細胞付着率との相関性を調べた。

## 結果・成果

どの基盤上で培養したマクロファージもよく増殖した。一方、ポリスチレン (PS) 基板上に比べてどの中性ゲル上においても付着細胞数は低く、特に PCDME ゲル上において付着細胞が認められなかった。これらのことから、表面に電荷を持たない中性ゲル上では細胞が付着し

にくく、さらに化学種によって付着のし易さを制御できる可能性が示唆された (Fig.1)。また、PAAm ゲルと PDMAAm ゲルは通常の基盤に比べて細胞が付着しにくい、1週間の長期培養を行うと付着数が増加する。一方、PCDME ゲルは長期培養を行っても付着数が非常に少ないことがわかった。ここで、PS (non-treated) とは表面にプラズマ処理による親水性コーティングを施していない疎水性のポリスチレン製培養ディッシュのことを指し、一般的にプラズマ処理を施してある PS (treated) よりも細胞の付着率が低いことで知られている。PS (treated) は細胞付着が容易であるため細胞培養ディッシュとしてよく用いられている代表的な基盤である。基盤の表面物性を評価する指標として平滑な基盤に対する純水液滴の接触角に着目した。タンパク質や細胞付着率が最も高い基盤の接触角は 70 deg 周辺であり、その基点よりも親水性もしくは疎水性をもつ基板上において細胞は逆に付着しにくくなる傾向にあることが知られている。今回、細胞付着率の低い各種中性ゲルの接触角は 12 deg~43 deg の範囲内であり、特に PCDME ゲルの接触角が最も小さかった (Fig.2)。これらの結果から、電気的に中性であれば静電的相互作用によるタンパク等の吸着がないため、タンパクを足場とした細胞の付着も起きづらいと理解できる。また、基盤表面の接触角が低いとき、すなわち表面の親水性が高いときは、基盤表面に多くの水分子を水和するため、タンパク・細胞などが基盤に直接接触できないことが、高い抗付着効果を示す原因であると示唆される。

次に、各ゲル試料で培養したマクロファージを PS 基盤に継代し、マクロファージの性質に変化がないか確認した。PS 基盤上に継代したマクロファージはどれも基盤に付着しながら増殖した (Fig.3)。この結果から抗付着性ゲル基盤上で培養したマクロファージは付着性と増殖性の基本的な性質を保持していることが確認できた。

以上のことから、中性ゲルのうち PCDME ゲルが最もマクロファージ抗付着性を有する新規ゲル基板として有用であることが示された。

また、ゲルを合成する際に、固体基盤表面から高分子を成長させる手法を開発し、ゲルと固体基盤の強固な接着を実現した。これにより、固体基盤のゲルによるコーティングが可能となった。 (Fig. 4)

## 今後の展望

本研究により、PCDME ゲルが高いマクロファージ抗付着効果を有することが明らかとなった。マクロファージの形態的には基盤との相互作用は認められず、未刺激の状態を維持しているように見受けられる。今後、PCDME ゲル上で培養したマクロファージの発現遺伝子を PCR にて同定することにより、さらに詳細に変異原性について検討を進める。マクロファージは接触刺激から免疫応答のスイッチとなり得るため、未反応の状態を維持することが大きな課題である。