

バイオシグナル分子を固定化した 細胞成長促進ハイブリッド材料の合成

京都大学 工学部

伊 藤 嘉 浩

Insulin or epidermal growth factor (EGF) was conjugated with synthetic polymers. One was coupling with water-soluble polymer, poly(acrylic acid), another immobilized on water-insoluble polymer, poly(acrylic acid)-grated polystyrene film or surface-hydrolyzed poly(methyl methacrylate) film. While conjugation with poly(acrylic acid) slightly altered the mitogenic activity of the polypeptides, immobilization on films significantly enhanced the effect. Small amounts of immobilized insulin and EGF (1 to 10% of the required amount of native insulin and EGF) were sufficient to stimulate growth of mouse fibroblast STO cells and Chinese hamster ovary cells overexpressing EGF receptors, respectively.

1 緒 言

多細胞生物は、細胞間、コラーゲンのような細胞間基質、及びホルモン・サイトカイン・成長因子などのバイオシグナル分子の3つの様式で制御され、細胞社会（組織）を形成している（Fig.1）。このなかで、最後のバイオシグナル分子による制御だけが溶解状態で行われる¹⁾。はたして固体状態でもこの情報は伝達されるのであろうか。

本研究では、バイオシグナル分子としてインシュリンと上皮細胞成長因子(Epidermal growth factor, EGF)を選び、これらを、種々の合成高分子とハイブリッド化し、その細胞成長促進活性を検討した。

2 実 験

2.1 インシュリン・ハイブリッド材料の合成

Fig. 2に示すような二種類のハイブリッド体を

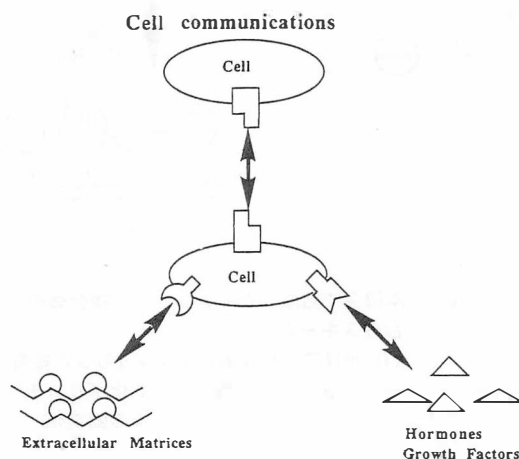


Fig.1 細胞機能

細胞間、細胞間基質、そして溶解状態のバイオシグナル分子とのコミュニケーションで制御される。

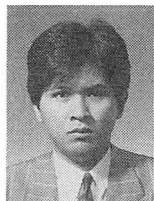
合成した。インシュリン、ポリアクリル酸（分子量、15,000）、ポリスチレン、アクリル酸モノマーは、シグマ、シグマ、和光純薬、ナカライ・テスクから各々購入した。

インシュリンとポリアクリル酸とのカップリング反応は以下に示すように行った（Fig. 2a）。まず、ポリアクリル酸の水溶液（200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）に水溶性カルボジイミド（1 mg/ml ）を加え、4℃で24時間反応させた。過剰のカルボジイミドは限外濾過で除去した。このように活性化したポリアク

Design and Synthesis of Biomaterials
Hybridized with Biosignal Molecules
to Enhance Cell Growth

Yoshihiro Ito

Faculty of Engineering,
Kyoto University



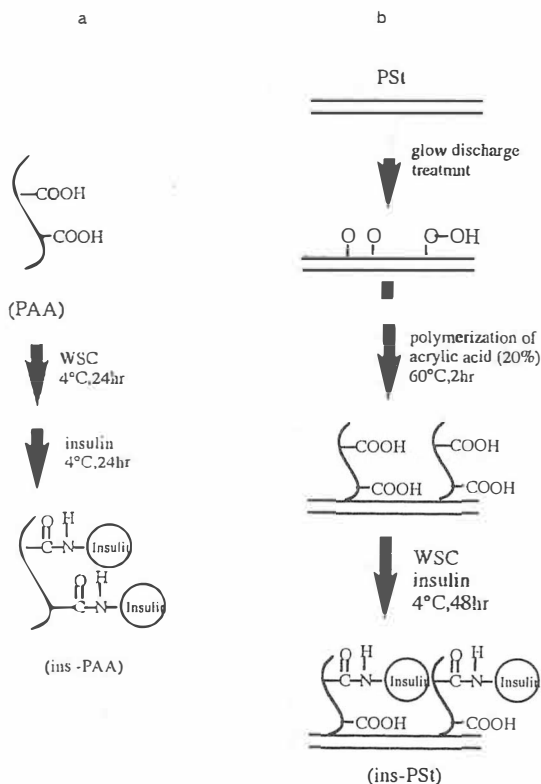


Fig. 2 本研究で合成したインシュリン複合体の合成スキーム
(a) ポリアクリル酸とインシュリンの結合、
(b) ポリアクリル酸グラフト化ポリスチレン上へのインシュリンの固定化。

リル酸水溶液にインシュリン (2mg/ml) を加え、4°C でさらに24時間反応させた。さらに活性化カルボキシル基を除くためにグリシン (10mg/ml) を加え、4°C で6時間反応させた。合成したハイブリッド体は限外濾過により精製した。

インシュリンの膜への固定化は以下に示すように行った (Fig/2b)。まず、ポリスチレン膜を室温、0.05Torrの減圧下で、200wの電力でグロー放電処理を行った。グロー放電処理した膜を、予め精製し、水溶液にしたアクリル酸モノマー (20wt%) に浸せし、脱気し、窒素置換して封管した。これを60°C で2時間加熱することにより、グラフト重合を行った。反応後、モノマーの溶出がなくなるまで (pH変化が観測されなくなるま

で) 洗浄した。洗浄したポリアクリル酸グラフト化ポリスチレン膜を水溶性カルボジイミド (1mg/ml) を含む種々の濃度のインシュリン水溶液中に4°C で48時間浸せし、固定化を行った。反応後、インシュリンの放出がなくなるまで洗浄した。固定化量の定量、洗浄の確認は¹²⁵Iラベル化インシュリンを用いて行った。

2.2 EGFハイブリッド材料の合成

Fig. 3に示すような二種類のハイブリッド体を合成した。EGF、ポリアクリル酸(分子量、15,000) ポリメチルメタクリレートは、東洋紡、シグマ、アルドリッチから各々購入した。Fig. 3 EGFとポリアクリル酸のカップリングは以下に示すように行った (Fig. 3a)。ポリアクリル酸 (250 μg/ml) と水溶性カルボジイミド (5mg/mlを混合し、室温で30分間反応させた。限外濾過で未反応のカルボジイミドを除去した後、EGF (300 μg/ml) と4°C で24時間反応させた。生成物は限外濾過で精製した。

EGFの表面加水分解ポリメチルメタクリレート膜へ固定化は以下に示すように行った (Fig. 3b)。まず、ポリメチルメタクリレート膜は、トルエン

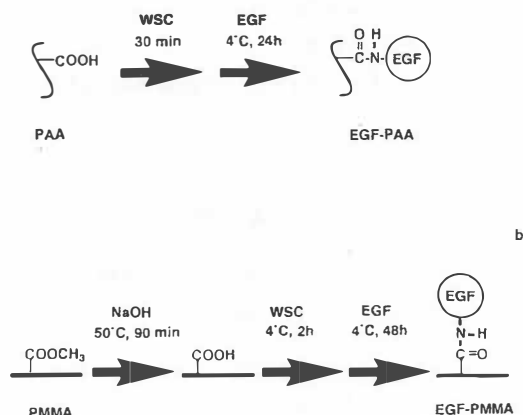


Fig. 3 本研究で合成した EGF複合体の合成スキーム
(a) ポリアクリル酸とEGFの結合、
(b) 表面加水分解ポリメチルメタクリレートへのEGFの固定化。

からキャストして得た。膜は4MNaOH水溶液中に50℃で90分間浸せきすることにより表面加水分解を行った。10wt%クエン酸水溶液中で中和した後、pH変化がなくなるまで十分に洗浄し、固定化反応に供した。膜を水溶性カルボジミド(5mg/ml)水溶液に4℃で2時間浸せきし、続いて種々の濃度のEGF水溶液中に4℃で48時間浸せきした。固定化後、非固定化EGFがなくなるまで洗浄した。固定化量、洗浄の確認は¹²⁵Iラベル化EGFを用いて行った。

2.3 細胞成長促進活性の測定

インシュリン・ハイブリッド材料の細胞成長促進活性は、マウス繊維芽細胞STOを用い、EGFハイブリッド材料は、EGFレセプター過剰発現CHO細胞を用い測定した。各々の細胞は、無血清のダルベッコ変法イーグル最少必修培地あるいはHam F-12培地で37℃、5%炭酸ガス雰囲気下、90%湿度のもとで培養された。培養後、細胞内のDNA量を4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドールで染色し、蛍光法により定量した。

3 結果

3.1 ハイブリッド材料の合成

ポリアクリル酸がカップリングした複合体の

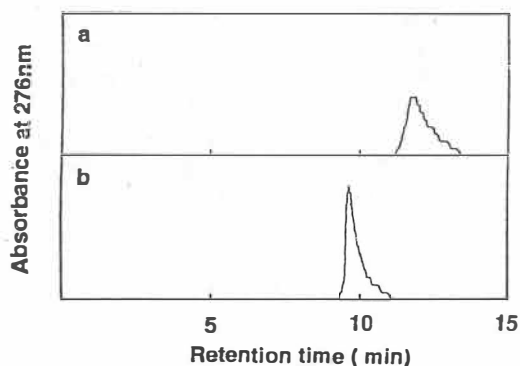


Fig. 4 ポリアクリル酸と結合したインシュリンのHPLC溶出パターン
(a) 生来のインシュリン、
(b) ポリアクリル酸結合インシュリン。

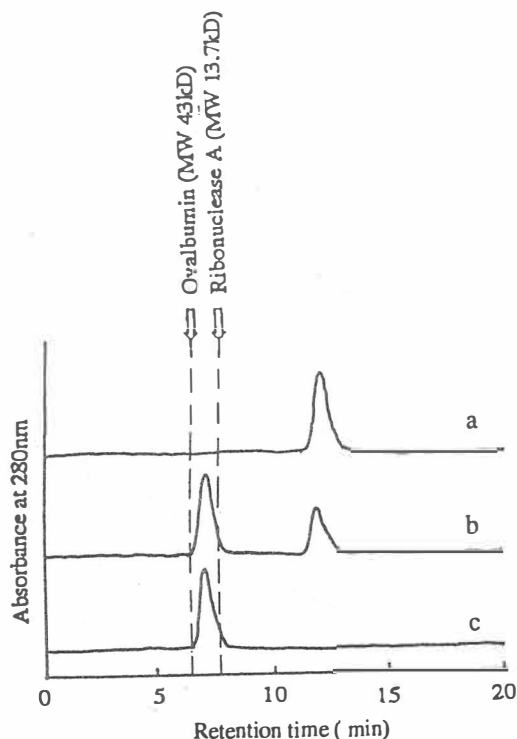


Fig. 5 ポリアクリル酸と結合したEGF(b)のHPLC溶出パターン
(a) 生来のEGF、(b) 未精製、
(c) 精製ポリアクリル酸結合EGF。
矢印は標準に用いたタンパク質のピーク位置を示す。

HPLC測定の結果をFig. 4、5に示す。溶出パターンから、インシュリンとEGFのハイブリッド体の分子量は各々約4万と2万と見積もられた。

約4分子のインシュリンが1分子のポリアクリル酸と、約1分子のEGFが1分子のポリアクリル酸と結合していることがわかった。ハイブリッド体の結合比が異なるのは、仕込み比が異なるためと考えられる。

Fig. 6には仕込み量と、膜への固定化量の関係を示す。インシュリン、EGFともに仕込量の増加に伴い、固定化量も増加した。

3.2 ハイブリッド体の細胞成長促進活性

修飾成長因子存在下での細胞成長を調べた結果

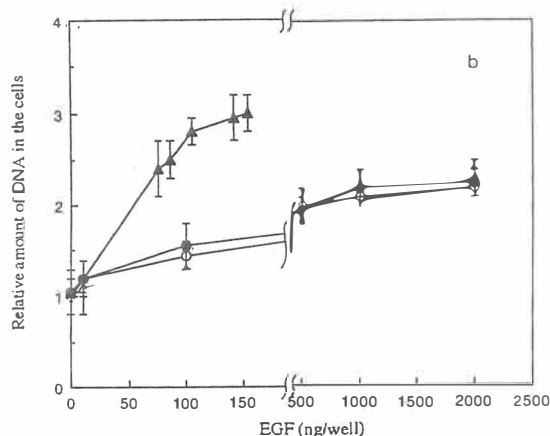
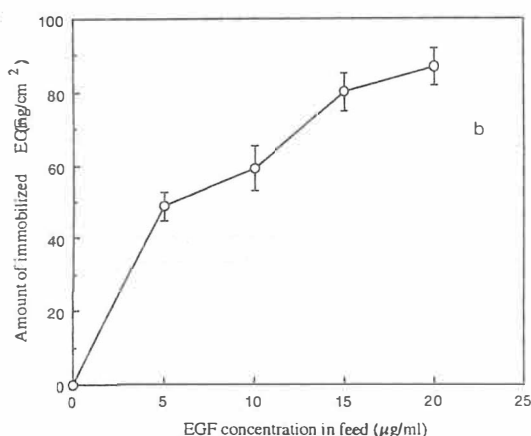
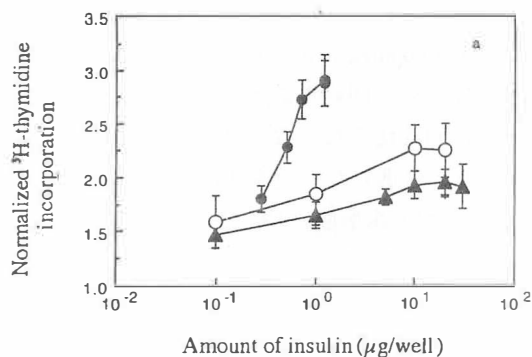
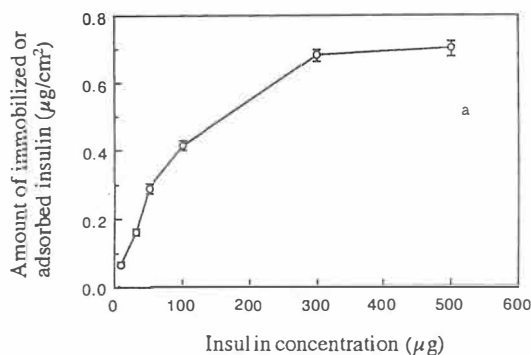


Fig. 6 インシュリン(a) とEGF (b) の仕込み濃度と固定化量の関係

インシュリンはポリアクリルグラフト化ポリスチレン膜上に、EGFは表面加水分解ポリメチルメタクリレート膜上に水溶性カルボジイミドをカップリング剤として固定化された。

Fig. 7 ハイブリッド化インシュリン(a)とEGF(b)の細胞成長促進活性

(a) : 生来のインシュリン (▲)、ポリアクリル酸結合インシュリン (○)、固定化インシュリン (●)。(b) : 生来のEGF (●)、ポリアクリル酸結合EGF (○)、固定化EGF (▲)。インシュリン存在下ではマウス繊維芽細胞ST0をEGF存在下ではEGFレセプター過剰発現チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞を48時間培養し、それぞれ表面加水分解ポリメチルメタクリレート膜、ポリアクリル酸グラフト化ポリスチレン膜上での細胞数を1として相対値として表した。

をFig. 7に示す。インシュリンーポリアクリル酸ハイブリッド体は生来のインシュリンより若干高い細胞成長促進活性を有した (Fig. 7a)。

そして固定化インシュリンは1/10から1/100の濃度で生来のインシュリンあるいはそれ以上の生理活性を有するようになった (Fig. 7b)。EGFの場合は、ポリアクリル酸が結合することにより若干活性は低下したが、固定化によりインシュリンの場合と同様の効果がみられた (Fig. 7b)。

4 考 察

インシュリン、EGFともに固定化により細胞成長促進活性は飛躍的に増大した。非常に低濃度で高い成長促進活性を有するのは、膜表面の局所濃度が高く、細胞と有効に相互作用する濃度が高く

なるためと考えられる。

また低濃度で有効なばかりでなく、最大の促進効果も固定化バイオシグナル分子の方が高くなった。これは、固定化により、レセプターのダウンレギュレーションが抑制されるためと考えられる²⁾。この際、インシュリン固定化よりEGF固定化の方が細胞成長に対する効果が大きかったのは、後者の細胞はEGFレセプターを過剰発現しており、EGFの影響を受けやすいためと考えられる。

インシュリンとポリアクリル酸のハイブリッド体の活性が生来のインシュリンより高くなったのは、EGF複合体の場合と異なり、ポリアクリル酸1分子がインシュリンを複数分子有する多価リガンドとなって、レセプター凝集を促進して活性化を誘起しやすかったためと考えられる。

バイオシグナル分子と合成高分子とのハイブ

リッド化は、これまで非常に多くの研究がなされてきたが、その作用機構や効果について統一的な研究はなかった。本研究は、バイオシグナル分子をどのような形態の合成高分子とハイブリッド化するかによって大きく活性が異なってくることを明確に示した。本研究の知見は、今後のハイブリッド生体高分子の設計に有意義であろう。

引用文献

- 1) 伊藤嘉浩、：細胞増殖因子固定化材料による無血清細胞培養、組織培養、19 520-524 1993
- 2) Ito Y, Zheng J, Imanishi Y, Yonezawa K, Kasuga M, : Protein-free cell culture on an artificial substrata with covalently immobilized insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93 3598-3601 1996