

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20106012

研究課題名(和文)分子認識バイオインターフェースのナノ構築と細胞機能診断デバイスへの展開

研究課題名(英文) Nano-fabrication of Molecular Recognition Biointerfaces and Application to Cell Analysis Micro-biodevices

研究代表者

高井 まどか(Takai, Madoka)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40287975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 48,000,000円、(間接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、材料表面へのタンパク質の吸着とそれを介した細胞接着を、様々な材料表面を用い、水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)法を用いて評価することで、初期接着挙動を解析するデバイス創製を目的とした。QCM-Dを用いることで、タンパク質が材料の吸着し細胞が接着する一連のプロセスを同一パラメータで解析することができた。また細胞接着密度の異なる接着細胞数では、接着している細胞数が多いと、吸着と伸展の挙動は検出されるが、リモデリングは観察されないという差異をQCM-Dで解析することができた。細胞と材料表面の接着挙動を動的に解析するデバイスとしてQCM-Dが適応できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To consider cell-materials interaction, we studied to understand the initial cell adhesion behavior on the materials surface using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D). The first phase of cell-material interactions is protein adsorption and after that cells start to attach, adhere and spread on the protein adsorption layer. A total series of the protein adsorption behavior and cell adhesion behavior on different material surfaces has been evaluated clearly by QCM-D. The adhesion strength of cell-materials interface can be also evaluated by QCM-D. QCM-D is one of the analytical tools for evaluating the adhesive strength, which is an index of the interaction between cell and materials and is characterized by real time monitoring.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：ナノ材料

キーワード：生体材料 ナノバイオ 分子認識 細胞 表面界面

1. 研究開始当初の背景

再生医療や組織工学の発達において、細胞と材料間の相互作用を解析することは、細胞の材料表面への初期接着挙動が、増殖、伸展、分化およびアポトーシスなどの後の細胞挙動に大きな影響を与えるため重要である。細胞は、材料表面に吸着したタンパク質を介して表面と相互作用する。しかし、物性の異なる材料表面におけるタンパク質吸着、さらに吸着したタンパク質がどのように細胞初期接着過程に影響を及ぼすのかの詳細が明らかにされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、様々なナノ構造を有する材料表面へのタンパク質の吸着とそれを介した細胞接着を同一のパラメータで評価することで、初期接着挙動を解析するデバイス創製を目的とした。タンパク質吸着および細胞の接着挙動解析用の診断デバイスに関しては、基板へ吸脱着した物質の物理特性を検出できる水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)を用いた。

3. 研究の方法

3.1 分子認識バイオフィンターフェースのナノ構築

細胞接着は、タンパク質吸着表面に起こる反応である。そこでタンパク質を固定化する表面として種々の材料物性を持つ分子認識バイオフィンターフェースの構築を行った。細胞機能診断用の QCM-D に展開するため、QCM-D センサー基板への分子認識ポリマー膜を作製する技術を検討した。光グラフト重合やポリマーコーティングに関しては、QCM-D のシグナルの安定性が得られず、解析が難しいことが分かり、表面開始型原子移動ラジカル重合法(SI-ATRP)を選択した。

まず、分子認識バイオフィンターフェースとして、PAEMA(カチオン性)、PBMA(疎水性)、PMSu(共有結合性)の高密度ポリマーブラシの作製を行うタンパク質吸着に関する基礎データを収集した。この際、タンパク質の変性を抑制すると報告のある PMPC を用い、タンパク質を固定化できる PAEMA とのブロックポリマーブラシ(PMbA)表面を作製した。固定化した一次抗体の結合解離定数を調べたところ、PAEMA > PBMA > PMSu > PMbA となった。PAEMA はカチオン性ポリマーであり、静電的な引力により抗体と強く相互作用をすることで抗体の構造変化を引き起こしたため、活性が大きく失われたと考えられる。また、PMbA において結合解離定数が PAEMA と比べて減少し、抗体の活性が向上したことを示している。下層の PMPC がタンパク質吸着抑制能を持つことから、PMPC が抗体と表面の相互作用を緩和することで抗体の構造変化を抑制し、抗体抗原結合解離定数が減少したものであると考察した。

細胞接着挙動を評価するため、SI-ATRPに

より、モノマーにMPC(生体親和性)、HEMA(親水性)、MEMA(カチオン性)およびMPS(アニオン性)を用いて、QCM-Dの金基板に形成させたSI-ATRPの開始剤の自己組織化単分子(SAM)膜上にポリマーグラフト基板を作製した。細胞播種後24時間での各ポリマーブラシ表面上の細胞形態観察から、poly(MPC)ブラシ基板では細胞はほとんど接着せず、poly(HEMA)ブラシ基板では細胞は接着したが形態が丸いまま伸展しておらず、poly(MEMA)表面では積極的な接着および伸展が見られた。QCM-D基板上に分子認識膜として、SI-ATRP法で種々の物性をもつポリマーブラシを作製する方法を確立した。

3.2 細胞機能診断デバイスの構築

細胞の全く接着しないPMPCブラシを選択し、QCM-D 基板上に細胞接着部位と、細胞非接着部位を作り分けたパターン化基板を作製し、細胞間の距離により細胞接着挙動の違いを評価するデバイスを QCM-D を用いて作製した。パターン化基板での評価の前に、パターン化されていない均一な QCM-D の金基板を用いて、材料と細胞間の相互作用の解析が可能であるかを、細胞数を変化させた際の細胞と材料間の相互作用、接着挙動解析を行うことで評価した。結果を図1に示した。密度の異なる接着細胞数では、異なる D-f プロットが得られ、細胞と材料表面の接着挙動が異なることが示され、QCM-D によるタンパク質吸着、細胞接着の解析手法を確立した。

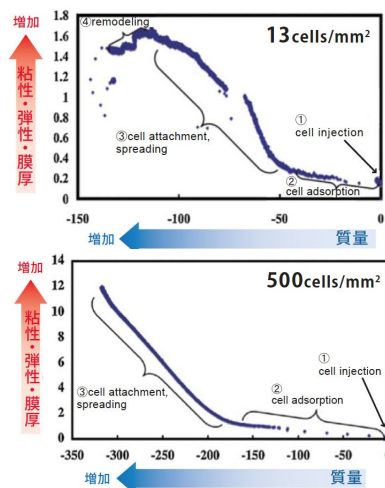


図1 密度の異なる細胞接着表面での QCM-D による細胞接着挙動。接着している細胞数が多いと、吸着と伸展の挙動は検出されるが、リモデリングは観察されない。横軸は、周波数変化(Δf)縦軸は、粘弾性変化(ΔD)を表す。

4. 研究成果

SI-ATRP 法を用い、タンパク質吸着表面として、種々の物性をもつポリマーブラシ表面を精密に作製することができた。タンパク質吸着と細胞接着挙動を QCM-D により評価す

るシステムを構築した。このシステムによりタンパク質吸着と細胞の接着および伸展プロセスを追跡することが可能となった。

分子認識バイオフィューズの構築と分子認識膜の評価として、細胞接着挙動解析を行う QCM-D が構築でき、目的としていた「様々なナノ構造を有する材料表面へのタンパク質の吸着とそれを介した細胞接着を同一のパラメータで評価することで、初期接着挙動を解析するデバイス創製」を達成した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件) 全て査読有り

- 1) Zone electrophoresis of proteins in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchip coated with physically adsorbed amphiphilic phospholipid polymer, K. Nii, K. Sueyoshi, K. Otsuka, M. Takai, *Microfluid Nanofluid*, **14**, 951-959, 2013.
- 2) E. Watarai, R. Matsuno, T. Konno, K. Ishihara, M. Takai, QCM-D analysis of material-cell interactions targeting a single cell during initial cell attachment, *Sensors and Actuators B*, **171-172**, 1297-1302, 2012.
- 3) J. Sibarani, T. Konno, M. Takai, and K. Ishihara, Nonbiofouling surfaces covered by bio-inspired 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer brush by use of polymeric photoiniferter, *Nano LIFE*, **2(4)**, 1242003-1-11, 2012.
- 4) M. Takai, T. Shirai, K. Ishihara, Surface Functionalization of Polydimethylsiloxane by Photo-Induced Polymerization of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine for Biodevices, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **24(5)**, 597-602, 2011.
- 5) J.-H. Seo, T. Shibayama, M. Takai and K. Ishihara, Quick and simple modification of a poly(dimethylsiloxane) surface by optimized molecular design of the anti-biofouling phospholipid copolymer, *Soft Matter*, **7**, 2968-2976, 2011.
- 6) K. Nishizawa, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara, Stabilization of phospholipid polymer surface with three-dimensional nanometer-scaled structure for highly sensitive immunoassay, *Colloid Surf. B: Biointerfaces*, **77**, 263-269, 2010.
- 7) N. Tajima, M. Takai, and K. Ishihara, Significance of Antibody Orientation Unraveled: Well-Oriented Antibodies Recorded High Binding Affinity, *Anal. Chem.*, **83**, 1969-1976(2011).
- 8) Y. Xu, M. Takai, and K. Ishihara, Protein Adsorption and Cell Adhesion on Cationic, Neutral, and Anionic 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Copolymer Surfaces, *Biomaterials*, **30(28)**, 4930-4938, 2009.
- 9) J.-H. Seo, R. Matsuno, M. Takai, and K. Ishihara, Cell Adhesion on Phase-separated Surface of Block Copolymer Composed of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and Poly(dimethylsiloxane), *Biomaterials*, **30(29)**, 5330-5340, 2009.
- 10) Y. Himuro, M. Takai, and K. Ishihara, Poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) mediator as immobilized enzyme membrane for the fabrication of amperometric glucose sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **136** 122-127, 2009.
- 11) Y. Xu, M. Takai, and K. Ishihara, Suppression of Protein Adsorption on a Charged Phospholipid Polymer Interface, *Biomacromolecules*, **10(2)**, 267-274, 2009.

〔学会発表〕(計 9 件)

国際学会での発表のみを抜粋

- 1) K. Takasu and M. Takai, Phospholipid polymer brush interface preserving the structural function of immobilized protein ISAWAT-1, 2012.11.12, Nagoya
- 2) M. Takai, Effect of phase-separated nanodomain structure on protein adsorption and cell adhesion, IACIS 2012, 2012, 2012.5.16, Sendai (invited)
- 3) K. Takasu, and M. Takai, Block-type phospholipid polymer brush retains structural function of immobilized proteins, IACIS 2012, 2012.5.15, Sendai
- 4) M. Takai, K. Ishihara, Biocompatible phospholipid polymer interface for micro-bioanalytical systems, ICAS 2011, Kyoto 2011.5.22 (Invited)
- 5) M. Takai, T. Shibayama, J.-H. Seo, and K. Ishihara, The Effect of Nanophase-separated Hydrophobic-Hydrophobic Copolymers to Cell Adhesion Behavior, BMMP-11, 2011.1.26 Nagoya (Invited)
- 6) M. Takai, Bioconjugated Phospholipid Polymer Biointerface with Nanometer-Scaled Structure for Highly Sensitive Immunoassay, 6th Biyani's International Conference-2011 (BICON-11) on Innovations in the Latest Healthcare Issues, 2011, 9.19, India (Invited)
- 7) A novel high-sensitive immunoassay interface with orientation-controlled antibodies, N. Tajima, M. Takai, and K. Ishihara, Abstract Book of Chemistry and Functional Properties of Soft Interface (Pacifichem 2010), 2010.12.16, Honolulu Hawaii
- 8) N. Tajima, R. Matsuno, M. Takai and K.

Ishihara, A Novel High-sensitive Immunoassay Platform with Orientation-controlled Immobilization of Antibodies on Non-biofouling Polymer Brush, 2009 MRS Fall Meeting, 2009.12.1, Boston

- 9) M. Takai, E. Watarai, T. Kitagawa, and K. Ishihara, Initial cell attachment behavior on various response surfaces analyzed by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D), 16th Congress on European Society for Biomaterials, Lausanne, 2009, 9.10, Switzerland

〔図書〕(計 3件)

- 1) ヘルスケアチップ、高井まどか、先端バイオマテリアルハンドブック、監修 秋吉一成、石原一彦、山岡哲二、NTS、p.439-444、2012 (著書)
- 2) 血液分析チップ、高井まどか、バイオチップ実用化ハンドブック、監修 金子周一、堀池靖浩、NTS、p.529-536、2010 (著書)
- 3) 高井まどか、微量血液診断チップ、次世代医療のための高分子材料工学、監修 秋吉一成、岸田晶夫、シーエムシー出版、263-373、2008 (著書)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井まどか (TAKAI Madoka)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：40287975

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし