

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12547

研究課題名(和文)光スイッチングによる表面撥水性の制御とスマート細胞分離システムへの応用

研究課題名(英文)Photo-controlled surface water repellency for smart cell separation system

研究代表者

中山 正道(NAKAYAMA, MASAMICHI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体関連物質との相互作用を外部刺激により制御するインテリジェント材料がバイオメディカル分野で注目されてきている。フルオロアルキル基とスピロベンゾピラン基をそれぞれ有するモノマーの共重合体をガラス基板上に物理コーティングした表面は、紫外光/可視光の照射光変化により可逆的な吸収スペクトルと表面濡れ性の変化を示した。また、紫外光照射した中疎水的表面では細胞の接着・増殖が確認され、細胞障害性が低い可視光照射により表面疎水性を増大させ、非侵襲的に細胞を自発的に剥離させることに成功した。光応答性フルオロポリマー修飾表面は細胞治療への応用も可能なスマート細胞分離システムへの発展が期待された。

研究成果の概要(英文)：Glass surfaces coated with spirobenzopyran-installed fluoroalkyl polymer was prepared to control cell adhesion behavior through the surface hydrophobic alternation derived from spirobenzopyran photoisomerization between high polar merocyanine and low polar spiropyran form. Polymer-coated surface exhibited the reversible change of adsorption spectra and static contact angle change which were attributed to the photoisomerization by switching ultraviolet(UV)/visible(Vis) light. Bovine endothelial cells greatly adhered on the moderately hydrophobic surface with UV treatment, compared to the UV-treated strongly hydrophobic surface. Adhering cells spontaneously detached after Vis treatment. Moreover, confluent cultured cells also peeled off as a sheet-like cell structure with maintaining cell-cell junctions and extracellular matrix proteins. The concept of light-responsive surface would be a unique strategy for cell manipulation in applications of cell-based therapies.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：光応答性 フルオロポリマー スピロベンゾピラン コーティング 細胞接着制御

1. 研究開始当初の背景

界面における生体分子や細胞との相互作用を外部刺激で制御する試みは、医療やバイオ分野において新しい概念を提案する革新的な技術として急速に発展してきている。外部環境に応答するスマート界面の研究は新しい学問と見ることができ、新理論と応用の両面で大きく飛躍が期待される領域である。外部刺激でタンパクや細胞との相互作用を効率的に制御するスマートバイオ界面の設計では、可逆的な刺激特異性と速やかな応答能を表面に導入することが重要である。従来の技術を振り返ると、刺激により“疎水性/親水性”と表面特性が変化するもののみが検討されており、疎水性のときに対象物を接着させ、親水性のときに脱着させるものである。基材から細胞をダメージなく回収するための刺激として温度が知られているが、局所的な制御が困難であるために個々の細胞や任意の細胞群の分離回収に対応できるエリア制御が容易な光が注目されてきている。しかし、現状では細胞障害性が危惧される紫外 (UV) 光を用いるものがほとんどである。

一方、可逆的な“撥水性 (強疎水性) /非撥水性 (中疎水性) 変化を生体分子の相互作用制御に利用した報告例はこれまでにない。タンパクや細胞が接着しやすい比較的疎水性の表面 (静的接触角: 60~80°) に対して、強疎水性を示す撥水性表面では、タンパクや細胞の接着性が劇的に減少することが知られている。すなわち、表面の撥水性を特定の刺激で動的に変化させるスマート界面を構築させることが可能となれば、生体分子や細胞と界面との相互作用を任意に制御可能な新しいバイオセパレーション技術の確立が期待できる。しかし、“撥水性 (強疎水性) /非撥水性 (中疎水性)”と動的に変化する表面において、タンパク・細胞の接着状態が可逆的に制御できるかについてはいまだ明らかになっていない。

以上の背景より、本課題では低い細胞障害性を示す可視光 (Vis 光) を利用して、表面疎水性の増大を誘起する新しい光応答性表面を提案し、接着細胞を非侵襲的に回収可能なスマート表面を構築する。

2. 研究の目的

本課題では、特定の細胞や任意の細胞群を分離回収に対応できる局所的制御が容易な光に着目し、低細胞障害性の可視光照射により表面疎水性が増大する光応答型のスマート表面を提案する。この原理を用いて表面疎水性度の増大により接着細胞を剥離させる表面設計と新しい分離モードに基づくバイオセパレーション技術の追究を目的とする。

撥水性 fluoroalkyl 基と光応答性 spirobenzopyran (Sp) 基をそれぞれ有するランダム共重合体を物理コーティングすることで、照射光の波長変化により表面ぬれ性を変化させる光応答型表面を構築する。さら

にスピロピランの光異性化による表面状態の違い (撥水性/非撥水性) の対応した細胞の接着挙動の違いを明らかにする。最終的には、可視光照射により非侵襲的に接着細胞を剥離させる機能性表面のデザインとその基礎概念を確立し、スマート細胞培養表面へ発展させる。

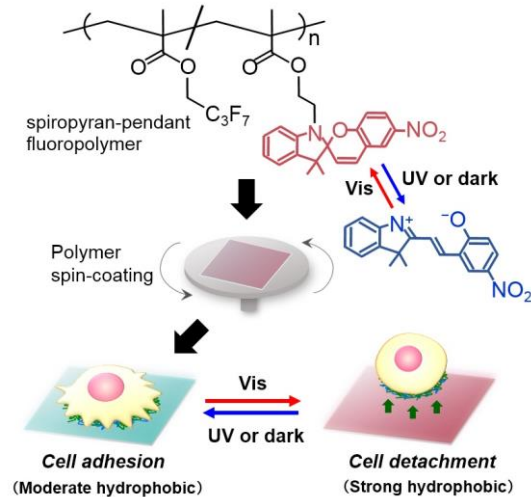


図1 光応答性高分子表面における細胞接着制御の概念

3. 研究の方法

(1) 光応答性フルオロ高分子の合成

Fluoroalkyl 基および Sp 基を有するメタクリレート heptafluorobutyl methacrylate (7FMA) と 1'-[2-(methacryloyloxy)ethyl]-3',3'-dimethyl-6-nitrospiro[2H-1benzopyran-2,2'-indoline] (SpMA) を 1,4-ジオキサン中 (7FMA/SpMA=85/15 in molar ratio) に分散させ、減圧下における凍結-融解法により脱酸素処理した後、アゾ開始剤共存下、70 °C で 24 時間ランダムラジカル重合した。次に反応溶液を冷メタノールに滴下することで、光応答性基含有フルオロ高分子 P(7FMA-co-SpMA) を得た。

(2) 高分子コーティング基板の作製と表面キャラクターゼーション

trifluorotoluene に溶解したポリマー溶液 (0.5, 0.75, 1.0wt/v%) を C₆H₁₃ 修飾ガラス表面 (24 x 25 mm) 上にスピコート (3000rpm, 30sec) することでポリマー薄膜を形成した。37°C のリン酸緩衝液に 1 日浸漬させた後に UV 光を 5 分間照射し (352 nm) した。これらの表面を超純水で洗浄後、減圧乾燥した。

得られた基板表面について、ATR/FT-IR 測定とエリプソメトリー法により高分子修飾量および膜厚をそれぞれ決定した。また、UV 光 (352 nm) /緑色 Vis 光 (530 nm) 照射後の吸収スペクトル測定を行い、基板表面に被覆した高分子に含有される Sp 基の光異性化反応を評価した。一方、液滴法による静的接触角測定により光照射による表面濡れ性の変化について検討した。

(3) 光照射による細胞の接着性評価

ポリマーコート基板にウシ頸動脈由来血管内皮細胞 (BAEC) を 2×10^4 cells/cm² で播種し、37 °C で 5 % CO₂ 環境下で任意時間培養を行った。これらの表面に対して室温下で可視光を 30 分間照射し、細胞の接着数の変化を位相差顕微鏡画像で評価した。また、コンフルエント状態まで培養した細胞群に対して、室温下で Vis 光 (530 nm, 1.75 mW/cm²) を照射することにより細胞シートの回収を検討した。

4. 研究成果

得られた高分子は数平均分子量が 44100、モノマー組成は 7FMA/SpMA=132/20 であった。ATR/FT-IR 測定から、エステル C=O 伸縮振動 (1750 cm⁻¹) と Si-O 変角振動 (1000 cm⁻¹) のピーク強度を比較した。既知量の poly(7FMA) が被覆された表面を用いて作成した検量線を用いて表面ポリマー量を算出した。またエリプソメトリー測定により高分子膜厚を決定した。結果を表 1 に示す。いずれにおいても、スピンコート時のポリマー濃度に依存して増加が確認された。また、ポリマー修飾表面を超純水で洗浄した結果、洗浄前後でポリマー修飾量は同程度であった。疎水性ガラス表面とポリマー骨格が疎水性相互作用することで、ポリマーがガラス基材上に安定に物理吸着していると考えられた。

表 1 高分子コーティング表面の特性評価

Polymer conc. (w/v%)	Polymer amount (mg/cm ²)	Thickness (nm)
0.50	2.54 ± 0.24	18.7
0.75	4.40 ± 0.39	26.3
1.0	6.08 ± 0.05	36.3

1.0w/v%のポリマー濃度で高分子修飾した表面の吸収スペクトル測定を行うことで、表面に修飾された Sp 基の光異性化反応を観察した。Sp 部位は開環構造の merocyanine (MC) 型に光異性化することで、可視光域に吸収が存在する化合物として知られている。光応答性フルオロポリマー修飾表面に対して UV 光照射することで 550~600 nm 付近の吸収が増大したこと、さらに可視光照射することで可視光域の吸収が減少したことから表面 Sp 基の光異性化を確認した。また、照射光の波長変化により可視光域 ($\lambda_{max}=557$ nm) の可逆的な吸収の増減が観察されたことから、可逆的に表面 Sp 基の光異性化可能な表面が構築できたと考えられた。また、UV 光照射 30 秒後では MC 型の吸収ピーク波長は 580 nm 付近であったのに対して、UV 光を 5 分間照射し続けることで、吸収ピーク波長がブルーシフトし 557 nm まで変化した。すなわち、高分子膜中の極性が低い環境下に存在した Sp 基が UV 光照射によって極性の高い環境下に局在化する

るように膜構造が変化したものと考えられる。

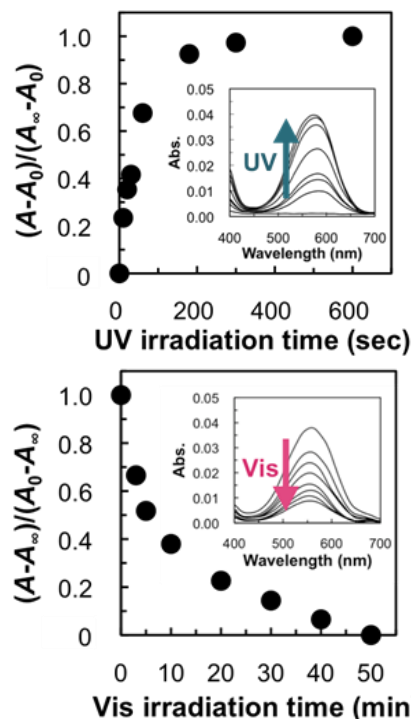


図 2 UV/Vis 光照射による高分子コーティング表面の吸収スペクトル変化

液滴法によるスピンコート表面の静的接触角測定の結果から、UV 光または Vis 光照射による表面 Sp 基の光異性化に基づく極性変化により可逆的な表面ぬれ性変化が観察された。高分子修飾表面では Vis 光照射下で測定することにより、UV 光照射したものと比較して表面の接触角が増大した。これは、表面に修飾された Sp 基が Vis 光照射により親水性 MC 型から疎水性のスピロピラン (SP) 型へ光異性化することで、疎水性度の弱い表面 (弱疎水性) から疎水性度の強い表面 (強疎水性) に変化したためであると考えられた。また、照射光の波長変化を繰り返し行うことで、表面 Sp 基の光異性化反応に基づく可逆的な接触角変化も観察された。

表 2 表面接触角の照射光波長依存性

Polymer conc. (wt/v%)	Contact angle (deg.)	
	UV (352nm)	Vis (560nm)
0.5	73.4 ± 1.0	77.6 ± 1.7
0.75	75.2 ± 1.6	81.9 ± 0.7
1.0	77.9 ± 1.5	88.2 ± 1.5

0.5-1.0w/v%のポリマー濃度でスピンコートした表面における BAEC の接着挙動について検討した。水中で基材表面に UV 光を 5 分間照射後、37°C で BAEC を培養した結果、良好な細胞接着が観察されたが、ポリマー修飾量が增大するほど表面疎水性が増大し、細胞

との相互作用が減少することで、接着細胞数の減少が観察された。一方、この表面に対して室温で可視光を照射することで、接着細胞が剥離することがわかった。これは、表面上の Sp 基が親水性 MC 型から疎水性 SP 型へ光異性化することにより疎水性が増強し、接着細胞が剥離したと考えられた。また、高分子修飾量および膜厚の増大に伴い、可視光照射後の接着細胞数は減少した。これは、高分子の修飾量および膜厚の増大により表面疎水性が増大することで、細胞やタンパク質との相互作用が抑制されたためであると考察された。これらの結果より、従来の表面親水化とは異なり、可視光照射による表面疎水性の増強により接着細胞を脱着可能な表面が構築できたと考えられる。さらに、フォトマスクを利用した可視光照射エリア制御により照射エリア選択的な細胞脱着についても確認された。

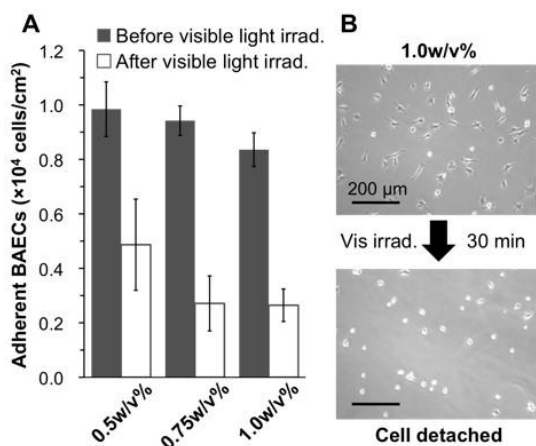


図3 Vis 光照射前後の細胞接着性変化
A: 細胞接着量、B: 細胞の位相差顕微鏡像

次に 1.0w/v% で高分子コーティングした表面上でコンフルエント状態まで BAEC に対して、30 分間可視光照射することで細胞-細胞間の結合を保持したままシート状の組織である細胞シートとして回収可能であった。光応答性フルオロポリマー修飾表面と比較して、回収した細胞シートが収縮している様子が観察された。これは伸展した接着細胞が基材表面から脱着することで細胞内骨格が収縮し、細胞-細胞間結合によりシート全体が収縮したためであると考えられた。また、回収した細胞シートについて、細胞核と細胞外タンパク質の fibronectin を免疫染色することで、細胞シートの組織構造を蛍光顕微鏡により観察した。細胞シートの基底面側には fibronectin が存在していることから細胞-ECM 間の構造を維持したまま非侵襲的に細胞が回収可能であることが示された。

以上の結果から、本研究で検討した光応答性フルオロポリマー修飾表面は、可視光照射による疎水性増強により細胞脱着を任意に制御する新規スマート細胞分離システムへ発展させることが期待できた。

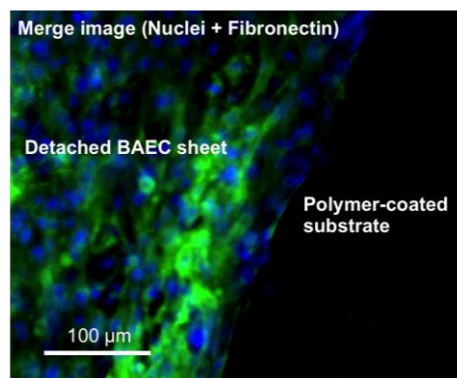


図4 回収した細胞シートの蛍光免疫染色像
(青: 細胞核、緑: フィブロネクチン)

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計0件)
なし

〔学会発表〕(計3件)

- ① Masamichi Nakayama, Tomonori Kanno, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Visible light-triggered cell detachment system using smart fluoropolymer coated surface", 11th SPSJ International Polymer Conference, 2016. 12. 14, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ② Masamichi Nakayama, Tomonori Kanno, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Visible light-triggered cell recovery system from intelligent fluoropolymer coated surface", 3rd International Conference on Biomaterials Science, 2016. 11. 28, 東京大学伊藤国際学術センター (東京都文京区)
- ③ Masamichi Nakayama, Tomonori Kanno, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Visible-light induced cell detachment system using smart fluoropolymer-coated surface", 10th World Biomaterials Congress, 2016. 5. 18, モントリオール (カナダ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 正道 (NAKAYAMA, Masamichi)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00338980

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

菊池 明彦 (KIKUCHI, Akihiko)
東京理科大学・基礎工学部・教授
研究者番号: 40266820