

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710097

研究課題名（和文）基材界面物性を利用した温度応答性超薄膜ゲルの設計と細胞シート回収への応用

研究課題名（英文）Control of surface properties of ultra thin temperature responsive hydrogel layer utilizing basal surface property and its application to cell sheet recovery

研究代表者

秋山 義勝（AKIYAMA YOSHIKATSU）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20349640

研究成果の概要：超薄膜グラフトゲルが基材表面物性の影響を受ける点に着目し、TCPS のような疎水性基材ではなく親水性基材表面に PIPAAm をグラフトした場合、親水性基材成分から水分子が供給され迅速な細胞および細胞シートの剥離が実現できると推測した。本研究では、このコンセプトを基に TCPS 表面にポリアクリルアミドをグラフトした親水性表面を作製し、さらにその表面上に温度応答性高分子をグラフトした新規温度応答性培養皿を作製した。細胞接着および剥離の結果から、新規温度応答性表面において細胞接着性が損なわれることなく、温度変化により迅速な細胞剥離が実現できることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：温度応答性表面、電子線照射、細胞剥離、組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

温度応答性高分子、poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) は水溶液中において、32℃を境に高温側では高分子鎖は脱水和、凝集し水溶液は白濁するが、低温側では水和、伸張し透明となる。PIPAAm を材料表面にグラフトすることで、温度変化により親水性、疎水性に変化する機能性表面を得ることができる。PIPAAm を電子線重合法で Tissue Culture Polystyrene (TCPS) 表面にグラフトした表面 (PIPAAm-TCPS) に細胞を播種すると、37℃において細胞は接

着、伸展、増殖することができる。コンフルエント状態まで細胞を培養し、温度を 20℃に下げることによって細胞をシート状で非侵襲的に剥離することができ、得られたシートの基底膜側には細胞外マトリックス (ECM) 成分が保持されている。膜タンパク質を破壊し細胞を基材表面から回収するトリプシン酵素による手法と比較した場合、PIPAAm-TCPS からのマイルドな温度変化による細胞剥離は細胞へのダメージは極めて小さい。本研究グループでは、回収した細胞シートが保持する ECM 成分の特性を利用し、臨床応用への研究

を展開している。このような細胞接着、剥離機能は PIPAAm を TCPS 表面上に 20nm 程度の超薄膜状でグラフトすることではじめて発現する。PIPAAm の膜厚が 40nm 程度の場合、37 °C でも細胞は接着しない。これは、疎水性 TCPS の基材界面近傍で起こる PIPAAm 鎖の疎水性凝集が、PIPAAm-TCPS 表面の PIPAAm 鎖の脱水和を促進し細胞が接着できる疎水性表面を提供できると考えている。すなわち、基材物性表面により超薄膜物性が制御できることが期待できる。

一方、細胞シートを利用した臨床応用を推進するには、患者様の負担を軽減するために、より迅速な細胞シートの回収が臨まれている。本研究提案は、PIPAAm 超薄膜が基材物性に影響を受ける点に着目し、PIPAAm 鎖の水和を迅速化する基材界面、PIPAAm 層の設計を検討し、細胞シート剥離の迅速化を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究提案の目的は、上記のコンセプトに基づき、親水性基材表面に PIPAAm をグラフトし、迅速な細胞剥離を示す新規温度応答性細胞培養表面を開発することである。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル親水性基材表面の開発

モデルとなる親水性基材表面を得るために電子線照射重合法によりポリアクリルアミド (PAAm) を TCPS 表面 (PAAm-TCPS) にグラフトした。その際、初期の添加モノマー量を変化させ、グラフト量が異なる PAAm を得た。

### (2) 電子線重合法による PAAm-TCPS 表面への PIPAAm のグラフト

電子線照射重合法により PAAm-TCPS 表面に PIPAAm をグラフトした (PIPAAm-PAAm-TCPS)。その際、初期の添加モノマー量を変化させ、グラフト量が異なる PIPAAm-PAAm-TCPS を得た。

### (3) 表面物性の評価

#### 1: 表面濡れ性の評価

表面接触角計を用いて、20 °C および 37 °C における表面接触角の測定を行った。

#### 2: グラフトポリマー量の測定

ATR / FT-IR により得られてスペクトルのピーク比から、グラフトポリマー量を求めた。PAAm は  $11670\text{cm}^{-1}/11600\text{cm}^{-1}$  の、PIPAAm は  $11650^{-1}/11600\text{cm}^{-1}$  のピーク比から求めた。

#### 3: XPS による表面の元素組成分析

XPS による PAAm-TCPS および PIPAAm-PAAm-TCPS の表面元素分析を行った。

#### 4: 温度変化にともなう細胞接着および剥離性の評価

ウシ頸動脈由来血管内皮細胞 (BAEC) を 3

7 °C で PAAm-TCPS および PIPAAm-PAAm-TCPS に播種し経時変化に伴う、細胞接着性について評価を行った。37 °C、24 時間後、PIPAAm-PAAm-TCPS を 20 °C のインキュベーターに入れ、経時変化に伴う、細胞剥離挙動について評価を行った。PIPAAm-PAAm-TCPS 表面で BAEC をコンフルエント状態になるまで培養し、細胞シート剥離についても評価を行った。また、比較の為に、TCPS および PIPAAm-TCPS も同様に評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) PAAm-TCPS の物性評価

表 1 に異なるモノマー条件で作製した

表 1 PAAm-TCPSs の表面物性

AAm conc(wt%)	Cell adhesion(%)*	Contact angle(cos θ) (37°C)	Density (PAAmμg/cm <sup>2</sup> )
0.0 (TCPS)	100	0.42 ± 0.03	
5.0	75.6 ± 11.2	0.75 ± 0.02	0.22 (022PAAm-TCPS)
10.0	67.6 ± 14.8	0.82 ± 0.01	0.30
16.5	No adhesion	0.96 ± 0.01	0.33
20.0	No adhesion	0.97 ± 0.01	0.39
25.0	No adhesion	0.98 ± 0.01	0.45

\*Density of initial cells seeded :  $1.3 \times 10^4$  cells /cm<sup>2</sup>, Bovine carotid artery endothelial cells (BCs), DMEM (+ 5.0% FBS), 6 h

PAAm-TCPS の細胞接着性、グラフト量、接触角の結果を示す。

PAAm のグラフト量および表面濡れ性 (cos θ) は仕込み AAm モノマー濃度の増加に従い、増加および濡れ性の向上が認められた。播種 6 時間後の細胞接着率もグラフト PAAm 量の増加にともない減少し 0.33 以上 μg/cm<sup>2</sup> の PAAm グラフト密度において、細胞非接着性を示した。これらの結果より、PAAm のグラフト量の違いにより、異なる濡れ性を示す親水性表面を得ることに成功した。PAAm のグラフト量にしたがい、0.22mg/cm<sup>2</sup> の PAAm 密度を有する PAAm-TCPS)。

### (2) PIPAAm-PAAm-TCPS の物性評価

表 2 に 022PAAm-TCPS、030PAAm-TCPS、033PAAm-TCPS に PIPAAm をグラフトした時の PIPAAm グラフト量、播種 6 時間後の細胞接着性を示す。

表 2 PIPAAm-PAAm-TCPS の表面物性

Sample	IPAAm (wt%)	Density (PIPAAmμg/cm <sup>2</sup> )	Cell adhesion (%)*
022PAAm-TCPS 細胞接着表面	20.0	0.85	116.0 ± 11.8 (085PIPAAm-022PAAm-TCPS)
	55.0	1.20	119.2 ± 21.2
	70.0	1.60	No adhesion
030PAAm-TCPS 細胞接着表面	20.0	0.80	47.2 ± 11.4
	55.0	1.10	52.8 ± 23.2
	70.0	1.90	No adhesion
033PAAm-TCPS 細胞非接着表面	20.0		No adhesion
	55.0		No adhesion

\*Density of initial cells seeded :  $1.5 \times 10^4$  cells /cm<sup>2</sup>, BCs, DMEM (+ 5.0% FBS), 6h

図1に PIPAAm-PAAm-TCPS の FT-IR/ATR スペクトルを示す。PAAm は  $1670\text{cm}^{-1}$  付近に、PIPAAm では  $1650\text{cm}^{-1}$  付近にカルボニル基の伸縮振動に由来する吸収ピークが観測できる。PIPAAm を PAAm-TCPS 表面にグラフトすることでカルボニル基の吸収ピークが  $1650\text{cm}^{-1}$  (低波数側) にシフトする。このピークトップのシフトから PAAm 上に PIPAAm がグラフトされたことを確認した。PIPAAm のグラフト量は仕込み IPAAm モノマー量により増加した。022PAAm-TCPS 表面に、 $0.85 \text{ g/cm}^2$  (085PIPAAm-022PAAm-TCPS)、 $1.20 \text{ g/cm}^2$  (120PIPAAm-022PAAm-TCPS) のグラフト量で PIPAAm を固定化した場合、TCPS と同様な細胞接着性を示した。しかし、 $1.60 \text{ g/cm}^2$  (160PIPAAm-022PAAm-TCPS) でグラフトした場合は細胞非接着性を示した。同様な傾向は 033PAAm-TCPS でもみられ、グラフトした PIPAAm が多い場合、細胞非接着性を示した。

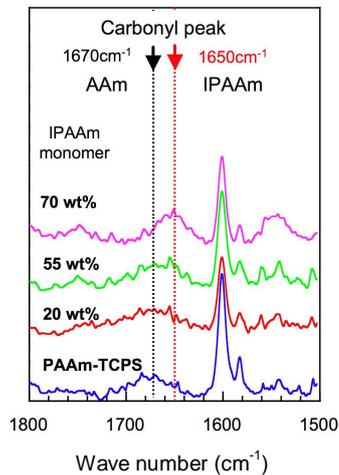


図1 PIPAAm-PAAm-TCPS、PAAm-TCPS の FT-IR スペクトル。PAAm-TCPS(022PAAm-TCPS)、20wt% (085PIPAAm-022PAAm-TCPS)、55wt% (120PIPAAm-022PAAm-TCPS)、70wt% (160PIPAAm-022PAAm-TCPS)

しかし、033PAAm-TCPS のような親水性表面上に PIPAAm をグラフトしても細胞接着性が現れなかった。すわわち、親水性の PAAm-TCPS 疎水性 TCPS 表面に PIPAAm をグラフトした場合、異なる物性を示すことが示唆された。

図2に温度変化にともなう表面濡れ性の変化を示す。比較として 160PIPAAm-TCPS、120PIPAAm-TCPS、TCPS も評価した。

TCPS 以外の各表面では温度変化にともない、高温側では疎水性、低温側では親水性を示す接触角の変化を示した。PAAm 成分を含まない、160PIPAAm-TCPS と 120PIPAAm-TCPS では膜厚が薄いと考えられる 120PIPAAm-TCPS がより疎水性を示した。TCPS 界面近傍で起こる

疎水性凝集による高分子鎖の脱水和を受けやすいと考えられる。一方、PAAm 成分を含む

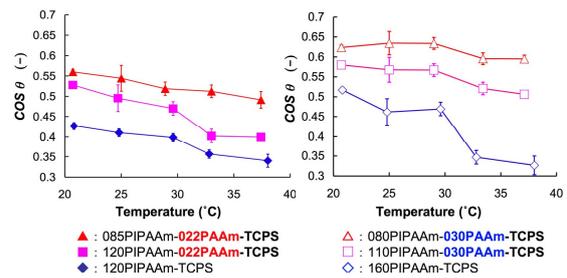


図3 PIPAAm-PAAm-TCPS の温度変化にともなう表面濡れ性の変化

PIPAAm-PAAm-TCPS 系では、同等な PIPAAm グラフト量の場合、PAAm 成分が多いほどより疎水性を示す表面であった。これらの結果は表2で示した、細胞接着率を支持する結果であった。

### (3) PIPAAm-PAAm-TCPS の細胞接着性評価

図3に PIPAAm-PAAm-TCPS の経時変化にともなう細胞接着数の変化を示す。160PIPAAm-TCPS、120PIPAAm-TCPS、TCPS を比較として用いた。PAAm-TCPS に PIPAAm をグラフトして用いた。085PIPAAm-022PAAm-TCPS、120PIPAAm-022PAAm-TCPS、085PIPAAm-030PAAm-TCPS (データ記載なし) は TCPS、

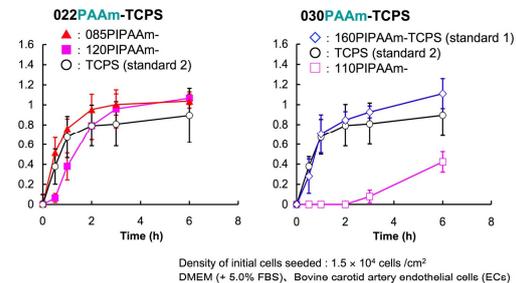


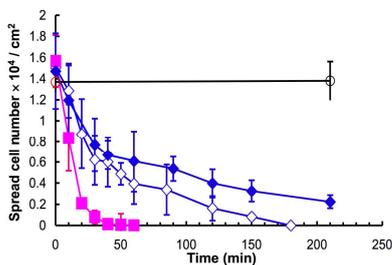
図3 PIPAAm-PAAm-TCPS の経時変化にともなう初期細胞接着性の変化

120PIPAAm-TCPS、160PIPAAm-TCPS と同等な細胞接着性を示した、播種後、24 時間後の細胞接着性は同等であった。110PIPAAm-030PAAm-TCPS では、播種後、3 時間目以降から細胞接着が確認できた。PAAm 量の違いが細胞接着性に影響を与えていることが示唆された。

図4に播種、24 時間後、37 から 20 のインキュベーターに移し、細胞剥離挙動を評価した結果を示す。120PIPAAm-022PAAm-TCPS からの細胞剥離は最も早く 60min で完全な剥離を示した。しかし、PAAm 成分を含まない 120PIPAAm-TCPS は 220min の時間でも完全な剥離を実現できなかった。PAAm 成分が細胞剥離の加速化に有効であることが示唆される。

図5に 120PIPAAm-022PAAm-TCPS および

160PIPAAm-TCPS からの細胞シート剥離挙動の結果を示す。細胞シートの回収においても



After culturing ECs for 24 h at 37°C, the cultured cells were transferred to an incubator at 20°C  
Initial density of cells :  $1.5 \times 10^6$  cells /  $\text{cm}^2$ , DMEM (+ 5.0% FBS)

図 4 20 における細胞剥離挙動。  
TCPS (○), 120PIPAAm-TCPS (□)  
160PIPAAm-TCPS (△)  
120PIPAAm-022PAAm-TCPS (◇)

120PIPAAm-022PAAm-TCPS は迅速な剥離を示すことが明らかになった。これらの結果から PAAm-TCPS のような親水性表面に PIPAAm をグラフトし、そのグラフト量を最適化することで PIPAAm 鎖の水和が加速し、接着細胞の剥離の加速の実現することに成功するとともに、超薄膜の物性は基材表面物性によって影響を受けるといった当初の研究コンセプトを強く支持する結果を得ることができた。これら結果を基に、基材表面物性の違いによる超薄膜物性への影響を図 6 にまとめた。

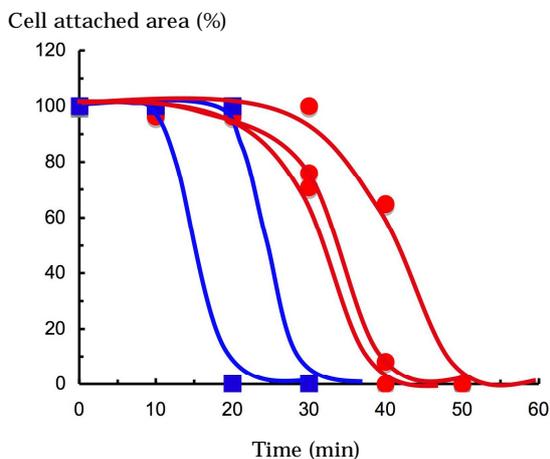


図 5 細胞シートの剥離挙動。  
160PIPAAm-TCPS (□)、  
120PIPAAm-022PAAm-TCPS (○)

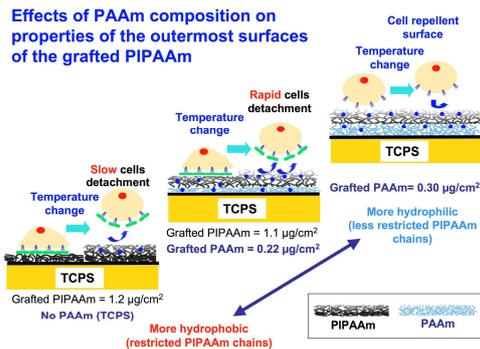


図 6 PAAm 量の違いによる PIPAAm 超薄膜層への影響

## 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)

[図書](計 1 件)

Biomaterials in Asia, Chapter 4, World Scientific

“Temperature-responsive Cell Culture Surfaces for Cell Sheet Tissue Engineering” Z. Tang, Y. Akiyama, T. Okano, 2008

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山義勝 (AKIYAMA YOSHIKATSU)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20349640

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし