

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790038  
 研究課題名（和文）プラズマ照射高分子表面を利用した細胞固定化用機能性バイオインターフェイスの設計  
 研究課題名（英文）Fabrication of functional bio-interface for immobilization of living cells by using plasma-irradiated polymer surface  
 研究代表者  
 笹井 泰志 (SASAI YASUSHI)  
 岐阜薬科大学・薬学部・講師  
 研究者番号：60336633

研究成果の概要：弱電離気体を利用するプラズマ技術を基盤とした手法により、細胞培養器材に汎用されているポリスチレン（PS）基板表面へ細胞接着を制御するインターフェイスを設計および構築した。プラズマ技術を利用して化学的に不活性な PS 表面にカルボキシル基を導入し、そのカルボキシル基を介して細胞接着性ペプチドの固定化することで、PS 表面の細胞接着性を飛躍的に改善し、かつ細胞増殖を有為に促進させることができた。足場依存性細胞の生存や活動に接着は不可欠であり、本研究成果は培養細胞の有効利用に有益なものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	300,000	2,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理化学

キーワード：プラズマ加工、表面・界面物性、バイオインターフェイス、細胞接着、細胞接着ペプチド、細胞培養、原子移動ラジカル重合

## 1. 研究開始当初の背景

現在、細胞を利用した実験システムが創薬や環境評価の分野において欠かせないものとなっている。また、最近、再生医療に大きな期待が寄せられており、関連する研究分野が大変注目されている。このような背景から、培養細胞を有効に利用するためのより機能的な培養器材の開発も重要な研究課題の一つとなっている。

動物細胞のほとんどを占める足場依存性細胞は、浮遊状態では生存できず、接着状態

でいることが生命活動に不可欠である。したがって、足場依存性細胞の培養には、細胞接着性が良好な器材を用いる必要がある。現在、細胞培養器材には、その透明性や成型加工性などの特性からポリスチレン（PS）が汎用されているが、PS そのものは疎水性が高く、ほとんどの細胞は接着しない。そこで、一般的な細胞培養には、PS 表面にプラズマ表面処理などを施し、親水性官能基を導入して適度な親水性を持たせることで細胞接着性を改善した組織培養用 PS（Tissue culture

polystyrene: TCPS) が用いられている。一方、TCPS にも接着しにくい細胞の培養や無血清培養など、より高度な実験においては、コラーゲンなど細胞外マトリックス (ECM) を構成するタンパクをコーティングした器材が広く利用されている。しかしながら、ECM タンパクの使用は、感染など動物由来に伴う諸問題を見逃すことができず、また品質維持のために保管条件などに注意を必要とする。そこで、近年、ECM タンパクの代わりに、細胞接着性を有するペプチドを細胞培養基板表面に導入することで基板表面に細胞接着性を付与しようとする試みがある。一方、低分子量のペプチドは、タンパク質のように基板表面に物理的に吸着させることは困難である。したがって、共有結合で基板表面に固定化する必要がある、そのためには、基板表面に反応性官能基を導入する必要がある。

我々はこれまでに、弱電離気体を利用したプラズマ技術を基盤とする表面処理法による高分子表面への生体適合性付与や生体分子固定化用基板の構築など、高分子表面の機能化について報告している。プラズマ表面処理は、その処理効果が基材表面の数 nm に限られることから、基材のバルク特性を保持した状態で表面改質が可能であり、TCPS の製造にも利用されているように細胞培養基板の開発にも大変有用な方法と言える。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、弱電離気体であるプラズマを利用した表面処理を基盤とする高分子表面の機能化法を用いて、細胞培養器材に汎用されているポリスチレン (PS) の表面に細胞接着を制御するインターフェイスを設計および構築することである。

## 3. 研究の方法

本研究は、PS シャーレ表面への (1) 細胞接着性ペプチド固定化のためのカルボキシル基導入、(2) ペプチドの固定化、および (3) 細胞を用いた評価からなる。以下に、各研究方法についてまとめる。

(1) 本研究では、以下の 2 つの方法により、PS 表面へ細胞接着性ペプチド固定化のためのカルボキシル基導入を行った。

① Vinylmethylether maleic acid copolymer (VEMAC) の固定化によるカルボキシル基の導入

我々はこれまでに低密度ポリエチレンやナイロンなどの疎水性医用高分子表面に持続的な親水性を付与する目的で、Vinylmethylether maleic anhydride copolymer

(VEMA) の有機溶媒溶液に基板高分子を浸漬し、基板高分子表面層に VEMA を収着させ、その表面にアルゴンプラズマ照射を行い、基板高分子のプラズマ架橋反応を惹起し、基板高分子表面層に VEMA を固定化後、VEMA の無水マレイン酸部位を加水分解することで VEMAC に変換し、カルボキシル基を発生させる方法を確立している。本研究では、その方法をこれまで未検討であった PS へ適用した。図 1 は本研究で確立した VEMAC 固定化 PS シャーレ (PS/VEMAC) の調製スキームを示している。なお、本研究では、13.56MHz の高周波電源装置を用いた誘導結合方式により、出力および時間を変えて、PS シャーレを設置したガラス製反応容器にプラズマを発生させた。放電ガスのアルゴンは、50 mL/min で流し、反応容器内圧力が 66.6 Pa となるように排気速度を制御した。

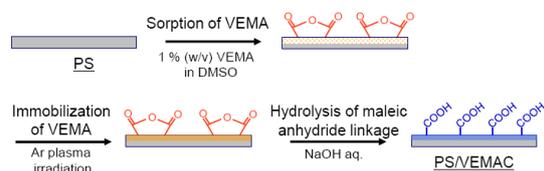


図 1 PS/VEMAC の調製法

②プラズマ照射 PS 表面からポリアクリル酸グラフト層の構築によるカルボキシル基の導入

プラズマ照射された高分子表面には多量ラジカルが生成するが、それが酸化されると水酸基などの酸素含有官能基が導入される。本研究では、図 2 に示す反応スキームにより、プラズマ照射によって生成した PS 表面の水酸基を化学修飾し、リビングラジカル重合法の一つである原子移動ラジカル重合法 (ATRP) によりポリアクリル酸 (PAA) グラフト層を構築した。なお、本研究では、PS 基板表面の酸化効果を高める目的で放電ガスを酸素とした。その他は、①と同様の方法で PS シャーレ表面にプラズマ照射を実施した。

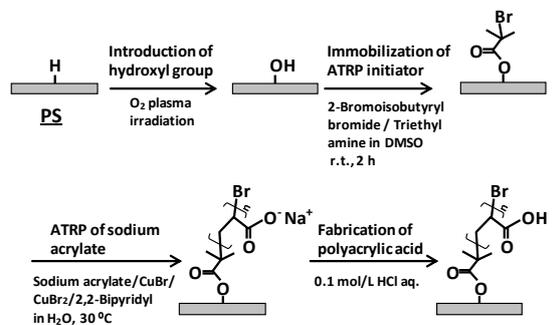


図 2 ATRP による PAA グラフト層の構築法

## (2) ペプチドの固定化

細胞接着性ペプチドには、fibronectin の細胞接着ドメインにおけるアミノ酸配列として同定されている RGD 配列を含む GRGDS を使用した。上記方法でカルボキシル基を導入した PS 表面への GRGDS の固定化は、一般的な縮合試薬を用いて、PS 表面のカルボキシル基と GRGDS のアミノ基との間の縮合反応により実施した。

## (3) 細胞を用いた評価

モデル細胞を用いて、その基板表面への接着性は顕微鏡観察により評価し、増殖性は WST-1 assay により評価した。

## 4. 研究成果

(1) PS シャーレ表面へのカルボキシル基導入による機能化

### ① PS/VEMAC の調製とその表面特性

本方法による PS 基板表面への VEMA の固定化では、用いる VEMA の分子量および VEMA を固定化するときのプラズマ照射条件が得られる PS/VEMAC の表面カルボキシル基濃度に影響した。図 4 は PS/VEMAC 表面のカルボキシル基濃度におけるプラズマ照射条件の効果について検討した結果であるが、出力を変化させたときは、本実験条件下、30W でのプラズマ照射の時にカルボキシル基密度に最大値が認められた。一方、出力を 30W として照射時間を変えた時は、30 秒以上の照射ではカルボキシル基密度に大きな差異は認められなかった。この結果についてであるが、低出力のプラズマ照射では、PS 表面におけるプラズマ架橋反応の進行が不十分なため、加水分解処理の時に PS 表面から VEMA が脱離するためと考えられる。一方、高出力では、PS 基板表面の VEMA が分解されるため、得られる PS/VEMAC 表面におけるカルボキシル基密度が低下したと考えられる。したがって、本方法により、PS 表面に高密度のカルボキシル基を導入するためには、適切なプラズマ照射条件を設定することが重要と言える。一方、こ

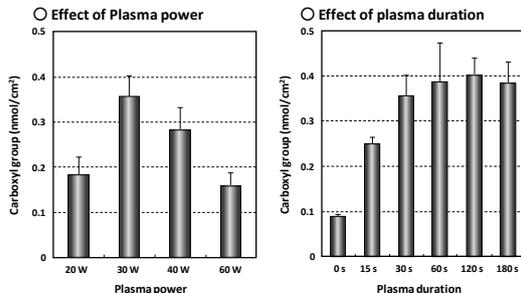


図 4 プラズマ照射条件による PS/VEMAC のカルボキシル基密度の変化

れらの結果は、プラズマ照射条件によって、PA/VEMAC 表面のカルボキシル基密度が制御できることを示唆しており、これは、細胞接着性ペプチドの固定化密度を制御するために有用であると考えられる。なお、PS/VEMAC を用いてヒト前立腺癌細胞 LNCap 細胞を培養したところ、未処理の PS と比較して細胞接着性が顕著に増大した。これは、プラズマ技術によって PS 表面に固定化された VEMAC の細胞表面との良好な親和性を示すものであり、PS/VEMAC の細胞培養基板としての有用性が示唆する結果である。

### ② PAA グラフト化 PS シャーレ (PS/PAA) の調製とその表面特性

PS/VEMAC 表面より高密度のカルボキシル基を導入する目的で、PS シャーレ表面に ATRP を用いて PAA グラフト層を構築した。ATRP では、鎖長の整ったグラフト層の構築が期待できる。得られた PS/PAA 表面の X 線光電子分光スペクトル測定より、本方法により PS 表面に PAA のグラフト層が形成されていることが確認された。また、表面カルボキシル基密度を評価した結果、PS/VEMAC では最大約 0.35 nmol/cm<sup>2</sup> であったのに対し、2 時間の ATRP で調製した PS/PAA では約 1.70 nmol/cm<sup>2</sup> であり約 5 倍のカルボキシル基量が検出された。この結果については、今回、用いたカルボキシル基の定量法が、カルボキシル基と 1:1 で複合体を形成する Toluidine Blue 0 をプローブとしたものであるため、PS/PAA のグラフト層の表面付近のみのカルボキシル基を定量している可能性がある。

PS 基板表面から共有結合で繋がれた状態で ATRP により高分子グラフト層を構築した報告は新規と考えられ、新しい PS 表面の機能化法という点で有益な成果と言える。

### (2) 細胞接着性ペプチドの固定化による細胞接着性 PS 基板の構築

RGD は、ECM タンパクの一つである fibronectin の細胞接着ドメインとして同定されており、細胞表面の膜受容体タンパクであるインテグリンと ECM との結合に係るアミノ酸配列であることから、RGD を含むペプチドは細胞接着性ペプチドと呼ばれている。本研究では、GRGDS ペプチドを PS/VEMAC および PS/PAA に固定化することにより細胞接着性インターフェイスを構築した。なお、本研究では、モデル細胞に未処理の PS シャーレにはほとんど接着せず、collagen (Type IV) でコーティングした器材での培養が推奨されているラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞を使用した。

図 5 は GRGDS 固定化 PS/VEMAC (Pep-PS/VEMAC) 表面における PC12 細胞の接着の様子を示している。ペプチドの固定化量はまだ明らかにできていないものの、図 5 に示すように、Pep-PS/VEMAC 表面においては ECM タンパクの一つである collagen (Type I) コート PS 基板表面と同様、多くの細胞が強く接着している様子がわかる。一方、PS/VEMAC 表面は、未処理 PS 表面よりは接着細胞が認められるが、その接着力は明らかに弱く、細胞の形態が異常に変化しているものも多く認められた。したがって、Pep-PS/VEMAC 表面における細胞接着は、細胞表面のインテグリンが RGD 配列を認識することにより生起しているものと考えられる。

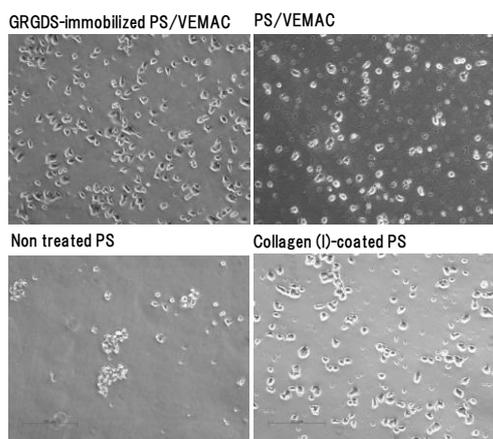


図 5 各基板表面における PC12 の接着の様子

図 6 は本研究で調製した Pep-PS/VEMAC および GRGDS 固定化 PS/PAA (Pep-PS/PAA) を用いて PC12 を 6 日培養後、接着細胞数の計測から細胞増殖性を評価した結果を示している。なお、比較対照の目的で、PS/VEMAC および各種 ECM タンパク (fibronectin, collagen (Type I)、および collagen (Type IV)) でコーティングされた PS シャーレを用いて培養した時の結果も示している。図 6 に示すように、各表面での細胞増殖性には明確な差異が認められ、Pep-PS/VEMAC や Pep-PS/PAA では、collagen (Type IV) にはやや劣るものの、fibronectin や collagen (Type I) でコーティングされたシャーレでの培養よりも、細胞増殖性が增大していた。この結果は、Pep-PS/VEMAC や Pep-PS/PAA 表面が ECM と同様の細胞足場として機能しており、細胞の接着だけでなく、生存や増殖も促していることを示唆している。Pep-PS/PAA における細胞増殖は Pep-PS/VEMAC と比較して促進されていたが、これは、固定化されているペプチドの密度の違いや PAA グラフト層のフレキシビリティ

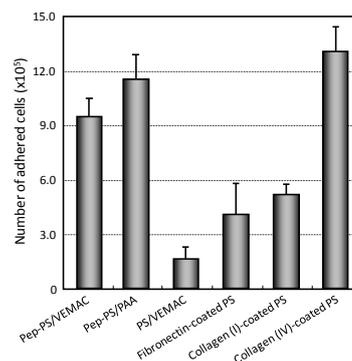


図 6 各基板表面における PC12 の増殖性評価  
実験条件： $1.5 \times 10^5$  個の細胞を播種後 6 日間培養

ティーが影響しているものと考えられる。したがって、ATRP 条件の最適化により、細胞増殖により有利なインターフェイスの構築も可能になると考えられる。

今後、ペプチド固定化密度と細胞接着性あるいは増殖性との相関を明らかにすることで、Pep-PS/VEMAC 表面における細胞接着性や増殖性における固定化されたペプチドの関与を明らかにすることが課題である。

以上の結果は、プラズマ技術を利用した細胞固定化用インターフェイスの設計において新しい有益な知見を提供するものである。

## 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 3 件)

- ① Yasushi Sasai, Natsuko Matsuzaki, Shin-ichi Kondo, Masayuki Kuzuya, Introduction of Carboxyl Group onto Polystyrene Surface Using Plasma Techniques, Surface and Coatings Technology, 202, 5724-5727, 2008, 査読有
- ② Yasushi Sasai, Natsuko Matsuzaki, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi Masayuki Kuzuya, Surface Engineering of Polystyrene Dish for Improvement of Cell Adhesion Using Plasma Techniques, Journal of Photopolymer Science and Technology, 21, 277-280, 2008, 査読有
- ③ Yasushi Sasai, Michinori Oikawa, Shin-ichi Kondo, Masayuki Kuzuya, Surface Engineering of Polymer Sheet by Plasma Techniques and Atom Transfer Radical Polymerization for Covalent Immobilization of Biomolecules, Journal of Photopolymer Science and Technology, 20, 197-200, 2007, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 笹井泰志、松崎奈津子、近藤伸一、山内行玄、葛谷昌之、プラズマ照射高分子表面を利用したペプチド固定化基板の構築とその細胞培養への応用、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都
- ② Yasushi Sasai, Natsuko Matsuzaki, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Fabrication of Artificial Extracellular Matrix on Polymer Substrate Using Plasma Techniques, 9<sup>th</sup> International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2009 年 1 月 21 日、名古屋
- ③ 松崎奈津子、笹井泰志、近藤伸一、葛谷昌之、プラズマ技術を利用したポリスチレン表面の機能化による細胞培養基板の構築、日本薬学会東海支部例会、2008 年 12 月 6 日、静岡
- ④ 笹井泰志、松崎奈津子、近藤伸一、山内行玄、葛谷昌之、プラズマ技術を利用する細胞接着性改善を目的としたポリスチレンの表面設計、第 25 回国際フォトポリマーコンファレンス、2008 年 6 月 26 日、千葉
- ⑤ 笹井泰志、近藤伸一、山内行玄、葛谷昌之、プラズマ技術と原子移動ラジカル重合によるポリエチレン表面の機能化と血液適合性付与、第 57 回高分子学会年次大会、2008 年 5 月 29 日、横浜
- ⑥ 松崎奈津子、笹井泰志、近藤伸一、山内行玄、葛谷昌之、プラズマ技術を利用する細胞の接着性改善を目的としたポリスチレン表面の機能化、第 57 回高分子学会年次大会、2008 年 5 月 29 日、横浜
- ⑦ Yasushi Sasai, Natsuko Matsuzaki, Shin-ichi Kondo, Masayuki Kuzuya, Introduction of carboxyl group onto polystyrene surface using plasma techniques, 6<sup>th</sup> Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering, 2007 年 9 月 28 日、長崎
- ⑧ Yasushi Sasai, Michinori Oikawa, Shin-ichi Kondo, Masayuki Kuzuya, Surface engineering of LDPE sheet by plasma techniques and atom transfer radical polymerization for fabrication of blood-compatible materials, 18<sup>th</sup> International Symposium on Plasma Chemistry, 2007 年 8 月 27 日、京都
- ⑨ 笹井泰志、及川倫徳、近藤伸一、葛谷昌之、プラズマ技術と原子移動ラジカル重合法による生体分子固定化用高分子表面

の設計、第 24 回フォトポリマーコンファレンス、2007 年 6 月 26 日、千葉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹井 泰志 (SASAI YASUSHI)  
岐阜薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：60336633