

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02578

研究課題名(和文) バイオシステムの多様な光制御を実現する新規機能性ポリマーの光応答物性

研究課題名(英文) Photo-responsive properties of novel functional polymers realizing versatile photo-control of biosystems

研究代表者

須丸 公雄 (Sumaru, Kimio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：40344436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：光に応答して疎水性から水和性に変化するo-nitrobenzaldehyde(NBA)を組み込んだポリマー系について、バイオシステムの様々な光制御への応用を検討した。光応答細胞剥離技術について、課題となっていた光水溶性ポリマーの培養液中における安定性が、疎水性モノマー成分の導入により向上することを確認した。さらにこの疎水性成分の比率を高めたポリマーを用いて、培養基材上における細胞への様々な薬物の投与を光で時空間制御する技術を確立した。また、アセタール保護NBA基への光照射がむしろポリマーの固定安定化を促進する所見に基づき、光照射によってポリマーの架橋をもたらす、新規光応答モチーフを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、培養基材上に接着する細胞に対して、選択的に剥離操作あるいは薬物投与をオンデマンドに行うための要素技術を確立するに至った。これは、既に先行して我々が実用化した光による高速細胞マニピュレータに対して、細胞殺傷のみならず、生きたままの選択的回収する操作を新たに付与するものである。さらに、本研究で新規に確立した、任意の細胞に対して任意をタイミングで薬物を投与する技術は、培養細胞群における個々の細胞の振る舞いの解析(シングルセル解析)において、強力な操作ツールとなることが期待される。さらに、新たに見出された光応答架橋モチーフは、培養環境のゾル-ゲル転移を光で誘起する新技術実現を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Using polymer systems incorporated with o-nitrobenzaldehyde(NBA), we examined photo-control of cell culture systems. With respect to the technology to detach the adherent cells from the substrate upon light irradiation, we improved the the long term stability of photo-dissoluble polymer in the culture medium, which had been problematic, by introducing hydrophobic monomer. Further, by increasing the amount of the hydrophobic component, we established a technology to control the delivery of drug to the cells on the substrate in a spatio-temporal manner. On the other hand, based on the observation that photo-irradiation to acetal-protected NBA group increased the immobilization stability of the polymer in aqueous systems, we found novel photoresponsive motives which crosslink polymer in sharp response to light.

研究分野：光機能性バイオポリマー

キーワード：光応答水溶性 細胞操作 オンプレートDDS 光二量化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

局所的・即時的・遠隔的に作用させることのできる光は、 μm スケールの微小な対象をリアルタイムに作用させることが可能である上、ITとの親和性が高く、こうした特性を利用して、顕微鏡観察下の細胞をレーザー光で自動操作する技術がすでに実用化に至っている。また、多様化するバイオシステム制御へのニーズに応えるべく光応答性材料を介した制御技術が研究されている。中でも、光開裂機構を含むシステムは盛んに検討され、生細胞の精密パターンニングや機能制御などへの応用が、これまでさまざまな研究者によって報告されている。その一方で、光反応性部位に生じた物性変化をポリマー全体の状態変化に「増幅」、大きな光応答を取り出せる原理的特徴を有する高分子の熱力学的相転移に基づく光応答メカニズムについても、ずっと以前から検討が行われていたが、いずれも中性水系の環境でバイオシステムを制御するのに十分な光応答を示すには至っていなかった。

こうした状況において申請者らは、不可逆ながら中性水系での光照射に鋭敏に応答しイオン解離する *o*-nitrobenzaldehyde (NBA) を、新たな光反応分子構造として検討、これを側鎖に有するポリマー材料 (NBA ポリマー) の開発に成功していた。そして poly(*N*-isopropyl acrylamide) (pNIPAAm) を主鎖とする NBA ポリマーが、室温・中性を含む広い温度・pH 範囲で光照射に応答し、水を含まない固体状態から速やかに水溶化することを見出した。しかも、全体のわずか 1/3 程度の NBA 残基が反応したところで水溶化に至ったことが明らかになり、高分子の熱力学的相転移に基づく増幅効果を通じて高い光感度 ($56 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) の達成が確認された。さらに、このポリマーのコート層上で培養された細胞が、わずか 1 秒の局所光照射後速やかに剥離、生きたまま選択的に回収されることを確認、精密で即時的な細胞培養系の時空間制御が実証された。ポリマー溶液をコートするだけでこのような光機能性表面を構築できることもまた、高い光感度の達成同様、高分子の相転移に基づくスキームによるもので、実用上極めて重要な優位性を有するものであった。

こうして NBA ポリマーの優れた光応答性の一端が明らかになり、さらなる用途展開について鋭意検討を行う中で、様々な課題 (問い) も見えてきていた。まず、このポリマー材料の光応答特性が水やリン酸緩衝水溶液中では長期にわたって安定に保持されるのに対し、細胞培養液中では数日のタイムスケールで徐々に低下することが明らかになってきた (「培養環境中での光応答低下はどのようにして起こるか」)。また、主鎖に疎水性成分を導入するなりすれば、ポリマーを溶解に至らしめることなく、光で水和性だけを增加させられる可能性があり、ポリマー中に保持した別の分子の放出を光制御することにつながるもので、学術的観点においてのみならず、今後の応用展開においても興味深いと考えられた (「溶解を伴わない水和変化は分子拡散にどう影響するか」)。さらに、ポリマー側鎖にある NBA は、光照射によってニトロソ安息香酸に転化するが、低分子のニトロソ化合物について報告されている分子間会合や光応答解離といった特徴的な特性を、高分子物性の制御にも活用できる可能性が示唆されていた (「ニトロソ基の光応答特性は、ポリマー物性にどう反映するか」)。

2. 研究の目的

まさに日本発の「新種」のこの光応答性ポリマーについて、申請者らは、NBA 及びその誘導体について見込まれる特徴的な光応答特性が、ポリマー系全体の大きな物性変化に及ぶ物理化学的プロセスを解明、さらに、これらを種々の光制御技術に応用するための基礎的知見を蓄積することを目的とした。NBA の光転化反応は鋭敏である上 (量子収率 ~ 0.5)、転化後生成するニトロソ安息香酸は、pH7 以上の条件でほとんどがイオン解離、ポリマーは高分子電解質の様相を呈し、中性環境での光照射でこれほど大きな水和変化を示すポリマー系は、他に例を見ないものであった。そこで本研究では、様々な構造を有する NBA ポリマー及びその誘導体の光応答物性を系統的に解析、培養細胞などを用いて応用検討を試みた。NBA 及びその保護体は光転化後、特徴的な会合・光解離特性を有するニトロソ基を生じるが、これをポリマー構造に導入した試みも前例がなく、本研究での先駆的検討が、これまでにない光制御システムの実現につながる可能性が大いに見込まれた。

3. 研究の方法

3. 1. 「培養環境中での光応答低下はどのようにして起こるか」

NBA ポリマーコート層の光応答特性は、血清を含む細胞培養液中の成分の共存で徐々に低下することが明らかになっていった。また応答性低下後のポリマー層に光を照射すると、時に膜状の不溶物の残存が観察されていた。まずは、培養液に含まれ、NBA との反応が見込まれる成分 (アミノ酸など) の共存が系に与える影響を系統的に調査、するとともに、主鎖の疎水性を適度に高め、原因成分のアクセス抑制についても検討、光応答性と未照射状態の安定性を両立する条件を探索した。

3. 2. 「溶解を伴わない水和変化は分子拡散にどう影響するか」

まずはポリマー主鎖の疎水性増加による水溶化の抑止を検討、疎水性の高いモノマー成分で

ある *N*-tert-butyl acrylamide (NTBAAm) を重合時に導入してポリマーを合成、光応答放出させる薬物分子としては、光照射により任意の箇所とタイミングで細胞に緑色蛍光を発現させることに成功している fluorescein diacetate (FDA) に加え、細胞膜のカルシウム透過性を飛躍的に亢進する薬物であるイオノマイシンを用いて検討を行った。

3.3. 「ニトロソ基の光応答特性は、ポリマー物性にどう反映するか」

ポリマーの合成途中で得られるアルデヒド基をアセタール保護したポリマー（光応答電荷発生しない）について、NMR を用いた構造変化の解析を行った。また、(保護)NBA 基を中心に、様々な芳香族ニトロ化合物を新規光反応性（二量化）モチーフの候補構造として検討を行った。

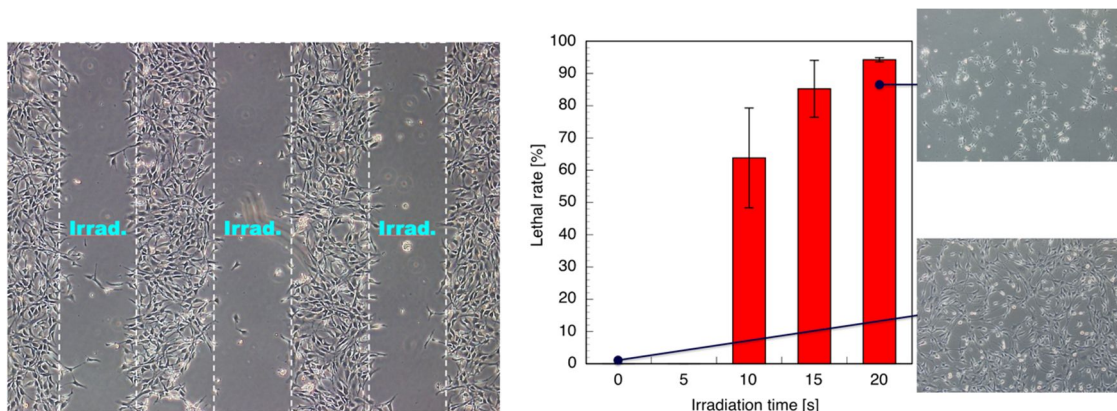
4. 研究成果

4.1. 「培養環境中での光応答低下はどのようにして起こるか」

系統的な解析により、培地中に含まれる血清成分が、課題となっている培養液中でのポリマーの光応答性低下につながることを示されたが、さらなる検討の結果、応答性低下が特に細胞接着域においてより顕著に見られること、NBA ポリマー層が薄い場合には、細胞が光剥離された箇所に、細胞接着域に沿った痕跡が残存することが観察された。このことは、細胞が接着面に向かって分泌する成分によって、その下にある NBA ポリマーが変質することを示すものであり、光細胞剥離性の安定維持が原理的に困難であることが強く示唆された。しかしながら、疎水性モノマー成分である NTBAAm の導入によってポリマー主鎖をより疎水性にすることで、安定維持特性が大きく向上、4 日間培養後の局所光照射と培地吹付けで、細胞を選択的に剥離除去させられることを確認することができた。

4.2. 「溶解を伴わない水和変化は分子拡散にどう影響するか」

NTBAAm 比率をさらに上げることにより、光照射によって NBA ポリマーが膨潤はするが溶解しない条件を特定、このポリマーとイオノマイシンをブレンドしたコート表面で、暗所において薬物を安定保持（ケーシング）する一方、光照射されると底面から培養細胞に放出され、細胞膜のカルシウム透過性の亢進することがカルシウム指示薬を用いた観察の結果確認された。さらにイオノマイシン比率が多い条件では、このスキームで細胞を光選択的に殺傷しうることを、その殺傷率を照射量によって制御しうることを実証した。



イオノマイシンブレンド NBA ポリマーコート表面における NIH/3T3 細胞の光応答（左）ストライプ局所照射後の様子（右）細胞殺傷率の照射時間依存性

4.3. 「ニトロソ基の光応答特性は、ポリマー物性にどう反映するか」

アルデヒド基をアセタール保護したポリマーについて検討したところ、光照射によってニトロソ基が生成することが NMR 測定の結果示唆された。このアセタール保護 NBA ポリマーのコート層に光照射を行うと、ポリマーの溶媒溶解性が低下する所見が得られ、この原理によってネガ型フォトリソグレイとして機能することが明らかになった。一方で、光に反応して水溶化する NBA ポリマーについても、水中でなく乾燥状態（空気中）で光照射を行うと、冷水での洗浄によって照射域がむしろ残存する傾向を示すことが確認された。この知見を活用して、NBA ポリマーによって基材に固定された水溶性ポリマーの架橋層の形成を試みた。このような構成が実現すると、水溶性ポリマー架橋層を、光に反応して基材表面からリリースさせ、膨潤させることによって、大きな「動き」として取り出すことが可能となるが、NBA ポリマーは多くの有機溶媒に溶解するため、他のポリマー溶液のオーバーコートによって多層構造を得るのは困難であった。NBA ポリマー層に空気中のわずかな光照射によって安定化（仮固定）させたのち、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC)、酸触媒架橋剤及び硫酸を含むメタノール溶液をオーバーコート、加熱によって架橋することで、所望する多層構造を得た。これに水中で局所照射を行うと、照射域で速やかに HPC 架橋層が基材表面からリリースされ膨潤することが確認され、光応答アクチュエータの新たな仕組みとしての応用可能性が示唆された。また、新規光反応性モチーフの候補構造の探索

において、複数の芳香族ニトロ化合物について、極めて顕著な光二量化反応性を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuyukubo Atsushi, Sumaru Kimio, Kanamori Toshiyuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Photolithographic Fabrication of Semi 3-D Microstructures Composed of Flexible Hydrogel Sheet for in Vivo-like Cell Culture System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 4129 ~ 4133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.9b00656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 須丸 公雄、高木 俊之、金森 敏幸	4. 巻 37
2. 論文標題 細胞の自在操作を可能にする新しい光応答性ポリマー材料	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオマテリアル - 生体材料 -	6. 最初と最後の頁 162 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 須丸 公雄	4. 巻 51-5
2. 論文標題 光応答性ポリマーが実現するオンプレート細胞分離	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 分離技術	6. 最初と最後の頁 267-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 須丸 公雄	4. 巻 5
2. 論文標題 光応答性ポリマーが拓く新しい培養細胞プロセッシング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 OPTRONICS	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 須丸 公雄	4. 巻 92
2. 論文標題 細胞を操作する光応答ポリマーの開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 応用物理	6. 最初と最後の頁 161-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 須丸 公雄
2. 発表標題 光応答ポリマーを用いた細胞を操る分子技術
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄
2. 発表標題 自立浮遊ハイドロゲル膜足場を用いた新規細胞培養系
3. 学会等名 日本膜学会第44年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須丸 公雄
2. 発表標題 Photo-controllable hydrogel systems
3. 学会等名 Gel Sympo 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須丸 公雄
2. 発表標題 機能性色素が拓く光バイオマニピュレーション
3. 学会等名 近畿化学協会機能性色素部会第105回例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 やわらかな自立浮遊ハイドロゲル膜上でのスフェロイド培養による肝特異的機能発現
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須丸 公雄
2. 発表標題 Photo-responsive Polymers for On-Plate Cell Manipulation
3. 学会等名 Material Research Meeting 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 Enhancement of liver-specific function of HepG2 cells by using flexible floating? hydrogel membrane as cell culture scaffold
3. 学会等名 The 8th Asian Biomaterials Congress（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 Construction of floating cell spheroid culture system using hydrogel membrane scaffold for enhancement
3. 学会等名 The 26th Symposium of Young Asian Biological Engineer's Community(YABEC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 Evaluation of physiological functions of HepG2 spheroid cultured on floating hydrogel membrane
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 細胞機能の発現を目指したやわらかな自立浮遊ハイドロゲル膜足場上の細胞培養
3. 学会等名 2020年度シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 細胞機能の発現を目指した自立浮遊ハイドロゲル膜足場の創製
3. 学会等名 膜シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須丸 公雄
2. 発表標題 光応答ポリマー二重層を用いた自在細胞操作
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須丸 公雄、高木 俊之、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 光パターン化ポリマー薄層の光選択剥離による新規細胞操作
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 細胞機能の亢進を目指した自立浮遊ハイドロゲル膜上での細胞培養
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 細胞機能の亢進を志向したしなやかな自立浮遊ハイドロゲル膜足場の開発
3. 学会等名 日本膜学会第42年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 やわらかな自立浮遊ハイドロゲル膜を足場とする新規細胞培養系の構築
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 露久保 淳、須丸 公雄、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 やわらかな自立浮遊ハイドロゲル膜上での新たな細胞培養
3. 学会等名 第32回高分子ゲル研究討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須丸 公雄
2. 発表標題 光応答ポリマーを用いた培養細胞の高速自動レーザープロセッシング
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会 第40回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須丸 公雄
2. 発表標題 光応答性ポリマーが拓く新しいバイオマニピュレーション
3. 学会等名 第8回 PhotoB10ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須丸 公雄、高木 俊之、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 Spatiotemporal control of drug release implemented with photo-responsive cell culture substrate
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須丸 公雄、高木 俊之、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 NBAポリマー基材を用いた培養細胞の光マニピュレーション
3. 学会等名 第48回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須丸 公雄、高木 俊之、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 光水溶化ポリマーを用いた半立体細胞組織形成
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須丸 公雄、高木 俊之、森下 加奈、金森 敏幸
2. 発表標題 光水溶化ポリマー膜を用いた半立体細胞組織形成
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	高木 俊之 (Takagi Toshiyuki) (10248065)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------