

機関番号：32653  
研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2008～2010  
課題番号：20300169  
研究課題名（和文） 機能化温度応答性ナノ表面の創製とタンパク質・細胞の接脱着制御に関する基礎研究  
研究課題名（英文） Functionalization of thermoresponsive nano-interfaces and thermally regulated detachment behaviors of adherent proteins and cells  
研究代表者  
岡野 光夫（OKANO TERUO）  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00130237

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、RAFT 重合法を用いた新規な手法によって poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) を培養基材表面にグラフトし、RAFT 重合の特長を活かした温度応答性培養基材の機能化について検討した。始めに、PIPAAm のグラフト鎖長および密度を精密に制御することで、細胞シート作製のために最適なグラフト条件を細胞種ごとに設定可能な温度応答性培養基材を開発した。さらに、この基材表面にグラフトされた PIPAAm の末端に存在する RAFT 剤由来の官能基をフォトリソグラフィ技術により部分的にマレイミド基に変換し、親水性ポリマーをストライプ状にグラフトしたパターン化温度応答性表面を設計した。この表面上に接着した細胞は同一方向に伸展することから、細胞の配向性を制御した異方性を有する細胞シートの作製を実現した。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, surface-initiated RAFT polymerization was demonstrated to materialize new type thermoresponsive PIPAAm brush surfaces for cell sheet harvest. The molecular weight and graft density of grafted PIPAAm chains was controllable through this grafting method. Therefore, optimal thermoresponsive surfaces were able to be designed for cell sheet preparation. Furthermore, RAFT-mediated block copolymerization achieved the stripe-like micropatterning of thermoresponsive PIPAAm domains and cell-repellent polymer domains. Human fibroblasts were aligned on the micropatterned polymer brush surfaces and the aligned cells were harvested as a cell sheet with well-controlled orientational structures.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：インテリジェント材料

## 1. 研究開始当初の背景

当研究所では、再生医療の実現に向けた細胞シート作製のための基材開発を進めてきた。培養細胞をシート状に回収するためには poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) がナノオーダーの厚みで表面修飾された温度応答性培養表面が必要であり、これまでに電子線によって誘発される重合反応によってポリスチレン表面に PIPAAm を修飾する手法が確立されている。この PIPAAm 修飾基材に細胞を播種し、コンフルエント状態になるまで培養した後、低温培養 (20°C) することによって各種の細胞をシート状に回収するに成功している。現在では、細胞シートを利用した再生医療は新たな治療方法を生み出す手法として期待されている。

一方、細胞シートをより幅広く多種多様な組織・臓器に応用展開するにあたり、用いる細胞の特性(主に接着性)によっては既存の修飾基材は必ずしも有用ではない。たとえば、増殖性の低い細胞の増殖速度を向上させる、接着性の高い細胞の温度変化による脱着速度を迅速化する、などの機能を温度応答性培養基材に付与するためには、既存の手法を用いて行うには限界がある。また、対象となる臓器・組織の特徴に合わせて生体組織を模倣した細胞シートの設計が求められるが、既存の技術では実現は困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、このような現状を考慮し、既存の基材作製とは異なる手法の開発を目的とした。具体的には、現在の細胞シート技術において達成されていない上述の課題を解決できると期待される RAFT 重合法を用いたポリマーブラシ構造を有する新規な温度応答性基材の作製を試みた。さらに、作製された温度応答性高分子ブラシの末端を修飾することにより、培養基材の機能化を実現し、これまでとは異なる特長を有する次世代型の細胞シートの作製についても検討した。具体的には、いくつかの生体組織が持つ細胞および細胞外マトリックスの配向性を模倣した細胞シートの作製を目指して、接着細胞の配向性を制御可能な機能化温度応答性培養基材の作製を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 表面開始型 RAFT 重合法により、ガラス基板表面に PIPAAm をブラシ状にグラフトした。重合反応に関与する連鎖移動剤 (RAFT 剤) の濃度を変化させることにより、ブラシ鎖長を制御することができる。また、基板表面に開始剤を固定化することにより、この固定化密度を変化させることでブラシの密度

を制御することができる。ポリマーブラシの鎖長および密度を精密に制御することにより、表面に付与される温度応答性を対象となる細胞種ごとに最適化することが可能となる。

はじめに、シランカップリング反応を利用してプラズマ処理後のガラス基板にアミノ基を導入した。この基板表面に縮合剤を用いて重合開始剤 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (V-501) を固定化することにより、表面開始型のポリマーグラフトを行った。この際、アミノ基を有するシランカップリング剤である 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) とアルキル鎖を有するシランカップリング剤 hexyltriethoxysilane (HTES) の混合比を変化させ (APTES/HTES=100/0, 50/50, 10/90)、基板表面に固定化される V-501 の密度を制御した。固定化密度の異なる V-501 固定化基板を連鎖移動剤 (RAFT 剤) 4-cyano-4-((thiobenzoyl) sulfanyl) pentanoic acid および IPAAm を含む反応溶液中に浸漬し、表面開始 RAFT 重合法により基板表面に PIPAAm をグラフトした。RAFT 剤および IPAAm を各濃度に調整した反応溶液中に V-501 固定化基板を浸漬し、基板表面上に PIPAAm をグラフトさせた。重合反応条件 (RAFT 剤濃度、モノマー濃度など) を変化させることでポリマー鎖長の異なる PIPAAm グラフト表面を作製し、各種の基板表面の物性を評価した。基板表面の親水性/疎水性については静的水中接触角測定により比較を行った。また、PIPAAm のグラフト量については Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) 測定から明らかにした。

それぞれの PIPAAm 修飾基材および V-501 固定化基板に対してウシ頸動脈血管内皮細胞 (BAEC) を  $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の細胞数で播種し、細胞の接着挙動を顕微鏡観察した。通常培養条件下 (37°C) で 24 時間培養した後、接着細胞を 20°C で培養し、PIPAAm ブラシ表面からの細胞の脱着挙動について評価した。さらに、コンフルエント状態になるまで培養した細胞を低温処理することにより、細胞シートの作製を試みた。

(2) RAFT 重合法によりグラフトされたポリマー末端から多段階に重合可能であることから、PIPAAm ブラシ末端から親水性ポリマー poly(*N*-acryloylmorpholine) (PAAcMo) を伸長反応によりグラフトしたブロック共重合体 ブラシ (PIPAAm-*b*-PAAcMo) 表面を作製した。フォトリソグラフィの手法を用いて、この伸長反応を部位選択的に行い、PIPAAm ブラシ領域および PIPAAm-*b*-PAAcMo ブラシ領域をストライプ状に設計することで、細胞の配向制御を実現した。

RAFT 重合法により作製した PIPAAm ブラシ

表面にフォトレジストをスピコートし、当研究所において開発されたマスクレス露光装置を用いてフォトレジストを部分的に除去した。この際、幅の異なるストライプ状に光を照射することで、ポリマーブラシのパターン幅の調整を行った。フォトレジストが除去された部分の PIPAAm ブラシ末端に存在するジチオベンゾエート基をマレイミド基に変換し、伸長反応を引き起こさない領域を作製した。具体的には、マレイミド(30 mM)および 2-aminoethanol(10 mM)を含む PBS 溶液中に基板を浸漬し、20° C で 20 時間放置した。基板を洗浄後に、残存するフォトレジストをアセトンにより除去し、ジチオベンゾエート基およびマレイミド基を末端に有する PIPAAm のパターン化表面を作製した。この基板を AcMo(1 M)と V-501(1 mM)を含む 1, 4-ジオキサン中に浸漬し、70° C で 20 時間反応させることで、部位選択的に PAcMo のグラフトを誘起させた。

PIPAAm および PIPAAm-*b*-PAcMo 領域をストライプ幅 50 μm に設計したパターン化温度応答性表面にヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を  $2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の細胞数で播種し、細胞の接着挙動を顕微鏡観察した。通常培養条件下(37° C)で細胞の伸展方向および増殖について観察した後、コンフルエント状態の細胞を 20° C で培養することで細胞シートの回収を試みた。また、コンフルエント状態の細胞および細胞外マトリックス中のアクチンおよびフィブロネクチンを染色し、細胞骨格、関連タンパク質の配向性についても評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 異なる重合条件によって得られた各 PIPAAm ブラシ表面上の PIPAAm グラフト量は RAFT 剤の濃度に依存して顕著に変化した。RAFT 剤が高濃度の条件下では重合反応が抑制され、短い鎖長の PIPAAm がグラフトされた。また、APTES/HTES の比率を変化させることにより、PIPAAm のグラフト密度も制御できることが示唆された。各基板表面には鎖長および密度が異なる PIPAAm ブラシが構築されていることから、表面の親水性/疎水性が鎖長に依存して異なることが予想された。事実、接触角は PIPAAm のグラフト量が多くなるにしたがって減少し、より親水的な表面になっていることが分かった。

次に、これらの PIPAAm ブラシ表面に対する培養細胞の接着・脱着挙動について観察した。RAFT 剤の非存在下でグラフトされた分子量制御されていない PIPAAm 表面は分子鎖長が著しく長く、細胞は接着しなかった。一方、RAFT 剤濃度が 0.25 mM 以上の条件で PIPAAm をグラフトした場合、細胞は PIPAAm ブラシ表面に接着可能であった。RAFT 剤により重合

反応が抑制された結果、比較的短い鎖長の PIPAAm がグラフトされたため、37° C の培養条件下において十分に疎水的な表面物性を示したものと考えられる。接着した細胞を 37° C で 24 時間インキュベートした後、各基板に対して低温処理を行ったところ、RAFT 剤 0.25 mM~1 mM の条件で作製された基板表面から細胞の脱着が観察された。さらに、同様の基板表面上でコンフルエント状態の細胞を低温処理することにより、細胞シートの回収に成功した。これは、温度変化による PIPAAm ブラシ表面の物性変化に起因しており、低温処理に伴って表面が親水的に変化したことが示唆された。一方、シートの剥離に要する時間は鎖長および密度が異なることにより変化した。短い鎖長の PIPAAm が低い密度でグラフトされた表面上においては、低温処理によって細胞シートが隔離しないケースが見られた。この結果から、各細胞に応じて最適な鎖長・密度を設定することが細胞シートの回収に必要であることが示唆された。本手法によって作製された PIPAAm ブラシ表面は新規な温度応答性培養基材として利用可能であることが示唆された。BAEC シートを回収する際に、その可否および完全なシートの剥離に要する時間は各基板で異なり、最適な PIPAAm 鎖長とグラフト密度を追求することが可能であった。

(2) RAFT 剤濃度 0.5 mM の条件下で作製された PIPAAm ブラシ表面上に、PAcMo をグラフトして得たパターン化温度応答性表面上において、NHDF はストライプパターンの方角に沿って伸展し、同一方向に配向性を示した。さらに数日間培養すると、接着細胞は配向性を維持した状態で増殖し、結果的にコンフルエント状態になった。蛍光色素によりこの細胞レイヤーを染色した結果、アクチンおよびフィブロネクチンも同様に配向性を示す様子が観察された。この結果から、力学的・生化学的に異方性を有する細胞シートとして利用できること期待される。

さらに、このパターン化表面は PIPAAm をベースとして設計されているため、低温培養後 30 分程度で細胞シートは表面から完全に剥離した。低温培養により回収される細胞シートは表面から剥離する際に収縮することが既往研究より明らかになっている。本研究においても、NHDF シートは基板表面の約 1/3 程度に収縮することが確認されている。一方、配向性を制御することにより、細胞シートの収縮率が異なることが明らかになった。シートは剥離する際、細胞の伸展方向に対してより大きな収縮率を示し、正方形の基板表面から剥離したシートは各辺が約 1 : 3 の比率を持つ長方形として回収された(通常温度応答性基材から同様の条件下で剥離した細胞

シートはほぼ 1:1)。このことから、細胞シートを構成する細胞はパターン化培養基材上で全体的に同一方向に配向性を示していること、剥離した後もその配向性に依存した形状を維持することが分かった。さらに、この細胞シートが力学的に異方性を示すことを示唆する結果であった。

本手法により作製したパターン化温度応答性培養基材は細胞の配向性を制御するために有効であり、細胞を播種するだけで配向性を制御可能であることから、細胞シートの機能化を目的とした次世代型の温度応答性培養基材として利用できる。細胞の配向性を制御することにより得られる力学的・生化学的な異方性を活用し、より生体内の構造に類似した細胞シートおよびそれらからなる組織を構築することが可能となると期待される。

## 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 11 件)

- ① H. Takahashi, M. Nakayama, K. Itoga, M. Yamato, T. Okano, (5 番目)

Micropatterned thermoresponsive polymer brush surfaces for fabricating cell sheets with well-controlled orientational structures, *Biomacromolecules*, in press, 査読有

- ② K. Nagase, M. Watanabe, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, (5 番目)

Thermo-responsive polymer brushes as intelligent biointerfaces: preparation via ATRP and characterization, *Macromol. Biosci.*, 11 巻, 400-409, 2011, 査読有

- ③ H. Takahashi, M. Nakayama, M. Yamato, T. Okano, (4 番目)

Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest, *Biomacromolecules*, 11 巻, 1991-1999, 2010, 査読有

- ④ K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, M. Annaka, T. Okano, (7 番目)

Preparation of thermoresponsive anionic copolymer brush surfaces for separating basic biomolecules, *Biomacromolecules*, 11 巻, 215-223, 2010, 査読有

- ⑤ K. Nagase, J. Kobayashi, T. Okano (3 番目),

Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering, *Journal of the Royal Society Interface*, 6 巻, S293-S309, 2009, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 岡野光夫, Temperature Responsive Polymeric Surfaces for Biomedical Applications, 14<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 2009.2.17, アメリカ合衆国

[その他]

ホームページ

<http://www.twmu.ac.jp/ABMES/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡野 光夫 (OKANO TERUO)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00130237