

平成22年6月25日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700401

研究課題名 (和文) 生体由来スキャフォールドの可逆的改質に基づく組織構築

研究課題名 (英文) Tissue engineering based on reversible modification of bio-oriented scaffolds

研究代表者

中西 淳 (NAKANISHI JUN)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・独立研究者

研究者番号：60360608

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、生体由来材料を一時的に修飾し、その後に光照射で除去可能な分子を合成し、材料の特性を可逆的に変化させる手法の開発に取り組んだ。モデル実験として、アミノ化基板のポリエチレングリコール (PEG) の可逆的修飾による細胞付着性の制御を実施し、本戦略の妥当性を確認した。また、可逆的修飾という特徴に着目し、金ナノ粒子や基板上での生理活性アミンの活性制御や表面密度勾配の形成を行う手法を確立した。

研究成果の概要 (英文) : In this study, I have developed a method for reversible modification of the surface properties of bio-oriented scaffolds by using a molecule that can be once conjugated but cleaved in response to light. As a proof of concept, I demonstrated a reversible modification of an amino-terminated surface with poly(ethylene glycol) and control of its cell adhesiveness. In addition, I have succeeded in the control of the activity of biological amine and the formation of surface chemical gradients on gold nanoparticles and substrates based on the similar strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

(1) 病気やケガなどによる損傷で機能不全に陥った臓器・組織を再生するためには、失われた機能を代替組織で補う必要がある。慢性的なドナー不足の昨今、工学的に代替組織を構築する組織工学技術が注目を集めている。

(2) 皮膚や骨などの間葉系組織に関しては、その構造が比較的単純であるため、既に臨床応用にまで達しているが、その反面、肝臓や腎臓などの物質収支に関わる臓器は大きな遅れをとっている。

(3) これらの臓器では、複数種の細胞が密接

に且つ整然と配置されており、その結果生じるニッチと呼ばれる微小環境が細胞の機能発現に不可欠だからであり、三次元培養担体内で生体を模倣した細胞の空間分布を実現することが、合理的且つ有効な戦略となる。(4)ただ、二次元培養担体表面で細胞の分布を制御する技術(細胞パターンニング技術)がさかんに開発されているのに対して、三次元培養担体内での報告は限定的で、特に、生体由来スキャフォールド上で細胞を自在に配置する手法は皆無であった。

2. 研究の目的

- (1) 生体由来スキャフォールドを可逆的に修飾する分子により細胞付着性を制御する技術を開発する。
- (2) 前記技術を利用して、光照射と細胞播種を繰り返すことで、異種細胞を三次元空間内で位置選択的に配置する。

3. 研究の方法

(1) 光分解性基を介して活性エステル基とアルキニル基を有するヘテロ二価性光分解性架橋剤(化合物1)を合成した。この分子により、生体由来スキャフォールド中のアミノ基と細胞接着を抑制するポリエチレングリコール(PEG)を連結し、光照射により切断することで、細胞付着性を可逆的に制御するのが本分子の設計のねらいである。

(2) アミノプロピルシランで修飾したガラス基板を例に(1)の反応を実施し、その反応過程を接触角変化やAFMによる観察により評価し、さらにこの基板をストライプ状にパターン化照射することで光照射領域・非照射領域の細胞付着性の違いを調べた。この際、分子量が5000のPEGを使用した。

(3) 同様の化合物で、光分解性基を介して活性エステルとジスルフィドを有する分子を合成した。この分子で表面修飾した金ナノ粒子上で、アミノ基を有する生理活性物質であるヒスタミンを固定化・光放出を行った。粒子からの光放出は、 α -フタルアルデヒドと2-メルカプトエタノールによる蛍光誘導体化により行った。また、細胞内 Ca^{2+} 蛍光指示薬のFluo 3を取り込ませたHeLa細胞に対してこのナノ粒子作用させ、固定化・光放出によるヒスタミンの生理活性変化を調べた。

(4) 同様の化合物で、光分解性基を介して活性エステルとトリメトキシシランを有する分子を合成した。この分子で表面修飾したシリコン基板上で、アミノビオチンの固定化し、その後光照射を調節することで、基板表面

でのビオチンの密度勾配の形成を行った。ビオチンの検出にはアビジン修飾蛍光ビーズを用いた。

4. 研究成果

(1) 以下に示すスキームで化合物1を合成した(図1)。合成した分子はNMRおよびIRにより確認した。

(2) 以下に示すスキームで、アミノ化基板の可逆的修飾を行った(図2a)。この反応の過程において、基板表面の水接触角は $31^\circ \rightarrow$

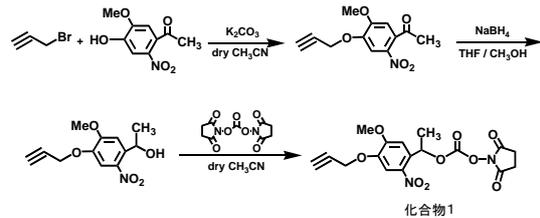


図1. 光応答性ヘテロ二価性架橋剤(化合物1)の合成スキーム

$52^\circ \rightarrow 43^\circ \rightarrow 34^\circ$ と変化した。また、AFMの形状像では、PEG修飾後には特徴的な顆粒状の構造が観察され、また光照射によりそのほとんどが除去されることが確認できた(図2b)。

つづいて、この基板をパターン化照射した上で細胞を播種したところ、PEG化状態である光非照射領域には細胞が付着せず、光照射領域に選択的に細胞が付着することが分かった(図3)。光照射領域の細胞接着性とほ

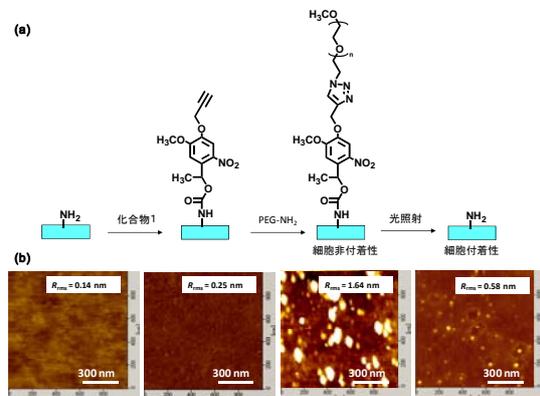


図2. 化合物1を用いたアミノ化基板の可逆的PEG化と表面状態の変化。(a)原理図。(b)AFMによる表面形状変化の観察。

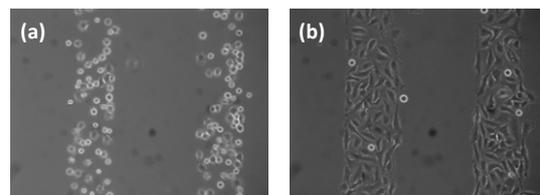


図3. アミノ化表面での可逆的PEG化による細胞付着性の制御。パターン化照射・HeLa細胞播種後(a)30分後および(b)68時間後の位相差像。

ば同程度であり、以上より、図2に示したスキームにより、アミノ化基板の細胞附着性を可逆的に変化させられることが分かった。現在、この手法を基に、コラーゲンゲル上での細胞附着性制御の検討を進めており、すでにいくつかポジティブな結果を得ている。これをさらに進めることで、本研究課題の申請当初の最終目標であった異種細胞のパターニングが可能となると考えている。

(3)本研究で確立された可逆的修飾という現象に着目し、生理活性物質の活性が可逆的に制御可能であるか調べた。まず、同様の光応答性分子で表面を修飾した金ナノ粒子を作製した(図4)。このナノ粒子は、確かに光照射時間に依存してヒスタミンを放出し(図5 a)、また、HeLa 細胞の細胞外液に添加すると、光照射に応じた細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大が観察された(図5 b)。一方で、ヒスタミン固定化ナノ粒子を添加するだけでは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化はおこらなかった(データ省略)。この結果は、ヒスタミンはナノ粒子と結合している状態では活性が抑えられ、ナノ粒子から切り離されることによって、初めて生理活性を取り戻すことが実証された(発表論文③)。

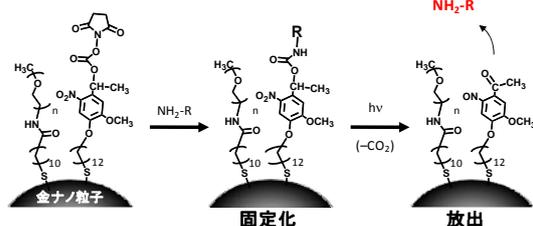


図4. 同様の化合物で修飾した金ナノ粒子表面でのアミンの保護と光反応によるその放出。

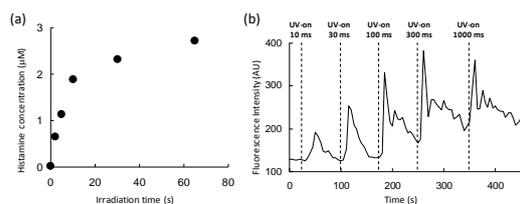


図5. 金ナノ粒子表面でのアミンの保護と光反応の検証。(a) 蛍光誘導体化による確認。(b)細胞に対する生理活性の確認。

(4)また、可逆性を加減することにより、基板上での定量的パターンニング技術の開発に取り組んだ。まず、同様の光応答性分子で表面を修飾したシリコン基板上を作製した。この基板に対して、照射時間を変えつつ隣接する帯状の領域を光照射することで表面密度勾配を形成したところ(図6 a)、これに対応して、固定化されるアビジン化ビーズの蛍光量が段階的に減少しているのが確認できた(図6 b)。エリプソメトリーにより別途求めたアミノビオチンの表面密度とこの蛍光強度を合わせることで、形成されたビオチ

ン密度勾配を定量的に評価することに成功した(図6 c)。この基板からのアミンの放出速度は固定化するアミンの種類に依存しないことを確認しているため(データ省略)、最初の固定化量を求めておけば、光照射を加減することで、自在に表面密度を制御できることが明らかになった(発表論文②)。

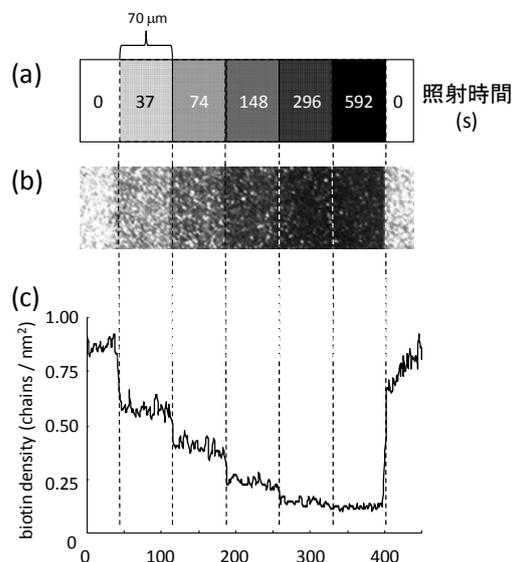


図6. 同様の化合物で修飾したガラス表面での固定化ビオチンの密度勾配形成。(a) 光照射パターン。(b) 蛍光アビジン像。(c) 蛍光強度プロファイル。

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 J. Nakanishi, Y. Kikuchi, Y. Tsujimura, H. Nakayama, S. Kaneko, T. Shimizu, H. Yokota, K. Yamacughi, Y. Yoshida, T. Takarada, M. Maeda and Y. Horiike, "Precise patterning of photoactivatable glass coverslip for fluorescence observation of shape-controlled cells", *Supramolecular chemistry*, in press. 査読有。
- ② H. Nakayama, J. Nakanishi, T. Shimizu, Y. Yoshino, S. Kaneko, Y. Horiike and K. Yamaguchi, "Silane-coupling Agent Having a Photoremovable Succinimidyl Carbonate for Patterning Amines on Glass and Silicon Surfaces with Controlled Surface Densities", *Colloids and Surfaces B*, 76: 88-97 (2010). 査読有。
- ③ Jun Nakanishi, Hidekazu Nakayama, Takahiro Shimizu, Haruhisa Ishida, Yukiko Kikuchi, Kazuo Yamaguchi and Yasuhiro Horiike, "Light-Regulated Activation of Cellular Signaling by Gold Nanoparticles That Capture and

Release Amines”, Journal of the American Chemical Society, 131: 3822-3823 (2009). 査読有.

〔学会発表〕(計2件)

- ① 中山秀一, 中西淳, 清水孝弘, 吉野雄太郎, 岩井秀夫, 金子信悟, 山口和夫, 堀池靖浩, 「光解離性スクシンイミジルエステルを有する単分子膜基板でのアミン誘導体の表面密度制御」, 第58回高分子討論会, 2009年9月18日, 熊本大学.
- ② 金子信悟, 中西淳, 中山秀一, 吉野雄太郎, 山口和夫, 堀池靖浩, 「光解離性PEGを修飾したアミノ化表面に基づくケージド基板」, 第58回高分子討論会, 2009年9月17日, 熊本大学.

〔図書〕(計1件)

- ① 中西淳 (分担執筆), フロンティア出版, ナノ空間材料の創製と応用, 2009, 205-213.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 光分解性ヘテロ二価性架橋剤

発明者: 山口和夫, 中西淳

権利者: 神奈川大学, 物質・材料研究機構

種類: 特願

番号: 2009-114028

出願年月日: 2009年5月8日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 淳 (NAKANISHI JUN)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・独立研究者

研究者番号: 60360608

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし