

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700496

研究課題名（和文） 機械的刺激を用いた新規温度応答性細胞培養表面の開発

研究課題名（英文） Development of new type of temperature-responsive cell culture surfaces with stretchable properties

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（和文）：

伸縮性基材の特性を利用した温度応答性細胞培養表面を新たに開発し、物理的な変化による表面物性変化について評価を行った。その結果、伸展時にはより疎水性を示すとともに温度応答性高分子の密度の減少が確認され、細胞接着には影響はなかったが、ゆっくりとした細胞剥離性を示した。これらの結果から、基材の伸展により固定化した温度応答性高分子の密度、膜厚が制御されたものと推測した。

研究成果の概要（英文）：

A method of mechanical-assisted control of the polymer thickness and density of temperature-responsive cell culture surfaces was developed by grafting PIPAAm onto PDMS surfaces. Hydrophobicity of the PIPAAm-PDMS surfaces was readily controlled by stretching the surfaces. Further investigation of PIPAAm-PDMS surfaces demonstrated that this hydrophobicity control is because the polymer thickness and density is altered by the stretching. This result suggests that such control may attain producing cell adhesive surfaces appropriate for variety of target cells by stretching one PIPAAm-PDMS surfaces.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：PDMS, poly(N-isopropylacrylamide), 電子線照射、超薄膜、細胞シート工学

1. 研究開始当初の背景

市販のポリスチレン製組織培養皿表面を温度応答性高分子で修飾した温度応答性培養皿により得られた細胞シートは、角膜上皮

再生、食道組織再生をはじめとする新しい組織、臓器再生技術として注目を集めている（M. Yamato et al, J. Prog. Polym. Sci., 2007, 1123 など）。温度応答性培養表面は温度応答

性高分子である PIPAAm を組織培養ポリスチレン (TCPS) 表面に電子線照射によりナノオーダーの超薄膜状で固定化することで得られる。PIPAAm を単に基材表面に修飾しただけでは、細胞が接着、剥離するような性質は得られない。20nm 程度の PIPAAm 膜を TCPS 表面上に構築することではじめて細胞接着、剥離が可能な温度応答性培養表面の構築が可能となる。これは、TCPS の疎水性基材界面近傍の PIPAAm 鎖が脱水和を受け、これが温度応答性培養表面の最表面にある PIPAAm 鎖にも影響を与えるためである (Y. Akiyama et al, *Langmuir*, 2004, 20, 5506)。したがって、20nm よりも薄い膜厚では最表面の PIPAAm 鎖の脱水和を促進し、結果的には強い疎水性を示し、細胞は接着はするが剥離はしない。一方、膜厚が 30nm 程度の場合、基材界面で発生する脱水和は最表面層の PIPAAm には影響を与えにくい。したがって、より水和した PIPAAm 鎖となり、非接着細胞表面となる。このような PIPAAm の細胞接着、剥離に対する膜厚依存性はガラス表面でも観察された。細胞培養、細胞シート化に最適と思われる 20nm 程度の PIPAAm 層を有する温度応答性培養表面でも、接着しにくい細胞、あるいは接着するが剥離しにくい細胞種が存在する。すなわち、細胞種により接着、剥離のための適度な PIPAAm 鎖の水和 (親水性)、脱水和 (疎水性) が異なることを示唆している。このような細胞種に対してはグラフト量を変化させたり、疎水性モノマーと共重合させたりし、異なる疎水性を有する温度応答性表面を開発し評価を行ったが、すべての細胞種に対して有効であるとは言い難い。このような背景から、本研究提案者は、同一の温度応答性細胞培養表面でも細胞種の違い、特性にあわせた細胞培養表面を提供することができる温度応答性培養表面の開発を着想した。具体的には、ポリジメチルシロキサン (PDMS) のような柔軟性のある基材表面上を超薄膜状の PIPAAm で修飾を行い (PIPAAm-PDMS)、適度に伸張、収縮させることで修飾した高分子鎖を物理的に収縮させ、水和、脱水和を制御するとともに PIPAAm-PDMS の表面の疎水性、親水性を制御し、細胞種に適する細胞接着表面および剥離表面を提供することを目的とする。そのコンセプトを図 2 に示す。これまでにリビングラジカル重合法により PDMS 表面を直鎖状の PIPAAm で修飾し、さらに細胞培養、細胞のシート化に関する報告がなされている (D. Ma et al, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 2009, 85)。しかしながら、PDMS の伸縮による PIPAAm 鎖の脱水和、水和の制御の着想には至っていない。一方で、同様な手法で PDMS 表面にポリアクリルアミド (PAAm) を導入し、PDMS を伸縮することで PAAm の密度が変化することが報告されている (T. Wu et al,

Macromolecules, 2001, 684) が、表面物性に関する実験、議論についてはなされていない。

2. 研究の目的

生体を構成する細胞種の特性にあわせ機械的な刺激により最適な培養表面を提供し、温度変化により細胞のシート化ができる温度応答性細胞培養表面を開発する。開発アプローチとして、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) 鎖が温度変化によって水和、脱水和をとめないながら高分子鎖を伸縮する特徴に着目した。温度応答性高分子鎖を物理的な力で伸張させることで高分子鎖の水和、脱水和の程度を制御し、細胞種の特性にあった疎水性、親水性を 1 つの温度応答性細胞培養表面で提供できる、新しい温度応答性培養表面を構築ができるのではないかと考えた (Fig. 1)。このような表面を開発することで、従来の温度応答性培養表面で細胞シート化が困難であった、細胞種の細胞シート化を目指す。

3. 研究の方法

市販の PDMS (ストレックス社製) を 2cm 角に切断し、既報の手法 (JA. Vickers et al., *Anal. Chem.* 2006, 78, 7446-7452) にしたがって未反応の PDMS 成分を除去した。その後、酸素プラズマ処理を行った後 (Plasma-PDMS)、ただちに 3-アミノプロピルトリメトキシシラン (APTMS) (1.0 vol%) 水溶液に入れ反応を行い (70 °C, 30 min)、PDMS 表面にアミノ基を導入した (APTMS-PDMS)。反応後、水で十分に洗浄を行い、窒素ガスを吹き付けることで表面上の水滴を除去した。その後、アミノ基を 2-プロパノール溶媒に溶解させた PIPAAm 溶液 (10wt%~60wt%) を滴下、塗布し電子線重合法により PIPAAm を PDMS 表面に固定化した。得られたサンプルは FT-IR/ATR、XPS、接触角、細胞接着および剥離性の評価を行った。

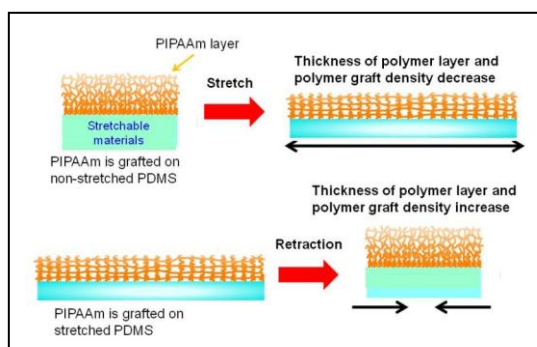


Fig. 1. Schematic drawing of controlling PIPAAm thickness and density on PDMS surfaces by using mechanical stretch and retraction.

4. 研究成果

Fig. 2 に種々の仕込みモノマー条件で作製した PIPAAm 固定化 PDMS 表面 (50IP-PDMS は 50 wt% の IPAAm モノマーの仕込み条件で作製した PIPAAm-PDMS を示す) の FT-IR/ATR のスペクトルを示した。電子線照射重合後、 1650 cm^{-1} 付近に PIPAAm のカルボニル基由来の吸収ピークが仕込みモノマー濃度の増加とともに増大した。また、XPS の表面分析の結果からも同様に、N 原子の割合が増加したことから、電子線照射重合により PIPAAm が PDMS 表面に固定化され、

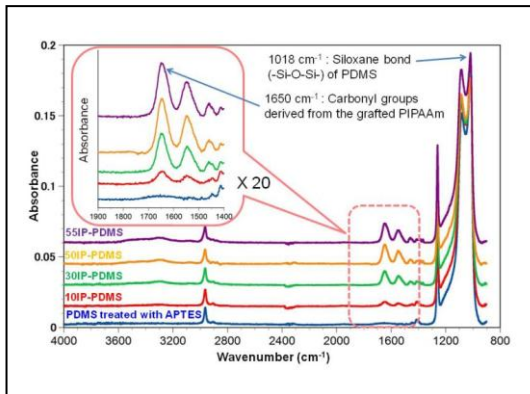


Fig. 2. FT-IR / ATR spectra of PIPAAm modified PDMS

その固定化量は仕込みモノマー濃度の増加により増加することが示唆された。PIPAAm 固定化の際、アミノ基を導入していない PDMS 表面を利用した場合、導入した場合と比較して、FT-IR / ATR のカルボニルの吸収ピークが極めて小さいことから、PDMS 表面に PIPAAm を固定化するには、アミノ基などの官能基が必要であることも示唆された。 1650 cm^{-1} および 1019 cm^{-1} のピーク比より、50, 30, 10 wt% の仕込み IPAAm モノマー濃度で作製したサンプルの PIPAAm 固定化量はそれぞれ、 9.0 ± 0.5 , 4.9 ± 0.7 , $1.1 \pm 0.3 \cdot \text{g/cm}^2$ であった。各サンプルの PIPAAm 固定化量をもとに、9.0PI-PDMS, 4.9PI-PDMS, 1.1PI-PDMS と表記した (Table 1)。

各サンプルの接触角を Table 1 に示す。表面接触角の結果から、仕込みモノマー濃度が高いほど、より顕著な表面接触角の変化が確認できた。これにより、固定化した PIPAAm は温度変化により水和、脱水和することが示唆された。また、伸展させた際に 9.0PI-PDMS, 4.9PI-PDMS の接触角は伸展させていない時の接触角の値よりも大きいことが確認された。この結果は伸展によりみかけの固定化密

度が減少していることを示唆した。

Table 1 Contact angles of PDMS, APTMS-PDMS and PIPAAm-PDMS

		Contact Angle (°)	
		37 °C	20 °C
PDMS	Non-St	111.4 ± 1.8	110.7 ± 1.9
APTMS-PDMS	Non-St	103.5 ± 4.9	102.6 ± 1.1
	St	99.5 ± 2.2	101.4 ± 2.4
1.1PI-PDMS	Non-St	82.7 ± 1.2	85.9 ± 1.2
4.9PI-PDMS	Non-St	80.9 ± 5.0	80.9 ± 2.8
	St	86.4 ± 3.3	88.0 ± 4.3
9.0PI-PDMS	Non-St	75.6 ± 1.4	70.5 ± 2.1
	St	77.2 ± 1.2	72.8 ± 1.5

Non-St: Non-Stretched state, St: Stretched state (PIPAAm-PDMS was stretched to 114%)

Table 2 Cell attachment and detachment behavior from non-stretched and stretched PDMSs surfaces

	Non-Stretched		Stretched (114%)	
	37 °C (24h)	20 °C (1h)	37 °C (24h)	20 °C (1h)
APTMS-PDMS	67.2 ± 14.5 (cells / mm ²)	53.3 ± 12.8	74.2 ± 12.8	58.7 ± 11.8
9.1PI-PDMS	63.0 ± 12.6	3.1 ± 3.6	62.3 ± 11.2	11.7 ± 6.9

* Cell attachment and detachment assay: Cells attachment assay was carried out after culturing cells at 37 °C for 24 hours. After the assay, cell detachment assay was further carried out after leaving cells at 20 °C for 1 hour. *Type of the cell: Bovine aortic endothelial cells. *Cell culture condition: DMEM supplemented with 10% FBS. *Initial cell seeding density: 78.1 cells / mm²

これらの結果をもとに、得られたサンプルの細胞接着および剥離性について評価を行った (Table 2)。比較として APTMS-PDMS、TCPS を用いた。9.0PI-PDMS, 4.9PI-PDMS および 1.1PI-PDMS において、仕込みモノマー量が増加するにしたがい、37 °C における細胞接着性能は低下し、20 °C における細胞剥離性能は向上する傾向を示した。APTMS-PDMS においても細胞剥離挙動が観察されたが、PIPAAm 固定化 PDMS 表面と比較すると剥離性能は極めて低いものであった。これらの結果をもとに、細胞接着性は TCPS には劣るが、細胞剥離性が最も良かった 50IP-PDMS を使い、50IP-PDMS を伸展させた場合の細胞接着性および剥離性について評価、比較を行った。伸展実験用に同等の PDMS 素材で作製した細胞培養用の PDMS チャンバーを用い、50IP-PDMS と同等な表面を作製した。専用の伸展デバイスを使用し、非伸展 (Non Stretched) 時と比べ、x 軸方向に 1.14 倍の長さになるように 50IP-PDMS を伸展させた時 (Stretched) の、それぞれの細胞接着性および剥離性を示した (Table 2)。非伸展、伸展に関わらず、APTMS-PDMS の細胞接着性および剥離性は同等であった。これに対し、50IP-PDMS 表面では、37 °C における細胞接着性は同等であったが、伸展した 50IP-PDMS 表面からの細胞剥離性能は、非伸

展のそれよりも低かった。この違いは、固定化した PIPAAm 層の膜厚および密度が基材の PDMS の伸展により低下し、その結果、伸展した 50IP-PDMS 表面が非伸展のそれよりも疎水性となったため、細胞剥離性能に影響を与えたものと推測した。

これらの結果より、本研究提案で期待したように、固定化高分子の密度が PDMS 基材のような伸縮性を有する基材に固定化することで、高分子密度や膜厚を変化させることができるとともに、これにより接触角などのような表面物性を変化させるとともに、細胞剥離性能に影響を与えることを明らかにした。このような伸縮性を有する基材を利用すれば、細胞に適した濡れ性を示す表面を、伸縮性による提供することができると期待できる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

①秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、“伸縮性を有する基材を利用した温度応答性細胞培養表面の特性” 2011, 11, 21、第 33 回日本バイオマテリアル学会、京都

②秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、“伸縮性を有する温度応答性細胞培養表面の開発” 2011, 9, 30、第 60 回高分子討論会、岡山

③秋山義勝、大和雅之、岡野光夫、“伸縮性を有する基材を利用した温度応答性細胞培養表面の開発” 2010, 9, 16、第 59 回高分子討論会、北海道 (札幌)

[図書] (計 1 件)

岡野光夫、秋山義勝、小林純、大和雅之、Elsevier, Comprehensive Biotechnology (Second Edition) Editor-in-Chief: Murray Moo-Young, Elsevier, volume 5, (2011). Medical Biotechnology and Healthcare, Chapter 436. Biomaterials / Temperature sensitive polymer.

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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし