

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350531

研究課題名(和文) 物理的な伸縮を利用した新規な細胞培養表面基材の開発

研究課題名(英文) Development of a stretchable temperature-responsive cell culture surface by using new temperature-responsive polymers

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規な温度応答性高分子である、p(NMANIproDAP)をPDMS表面に固定化したNMANIproDAP-PDMSを使い細胞培養評価を行った。その結果、基材を伸展(伸展率：20%)させることで細胞接着性が向上することを確認した。接触角の値は、伸展時の表面濡れ性は伸縮時(伸展前)よりも疎水性であることが示された。伸展における細胞接着性向上は、基材表面の接触角測定の結果と同様な傾向を示した。さらに、伸展状態および非伸展状態の基材において細胞は増殖しコンフルエント状となり、温度を20℃付近に低下させることで、細胞をシート状で剥離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A new facile method for the preparation of temperature-responsive cell culture surfaces (TRCS) by using photoinitiator immobilized PDMS surface was developed. First of all, thioxanthone groups, which served as the photoinitiator, were directly formed on PDMS (TX-PDMS) surface. Second, PNNACPM and PNMANIproDAP, which were new types of temperature-responsive polymers, were grafted onto PDMS surfaces by using light-emitting diode irradiation-induced. PNNACPM and PNMANIproDAP grafted PDMS surfaces successfully exhibited temperature dependent cell attachment and detachment properties. In addition, adhered cells were proliferated and became confluency. Cells were detached as a continuous cell sheet from PNMANIproDAP grafted PDMS surface by lowering temperature. By applying uniaxial mechanical stress to PNMANIproDAP grafted PDMS surface, we found that surface properties were more hydrophobic than unstretched PNMANIproDAP grafted PDMS surface.

研究分野：バイオマテリアル 再生医療

キーワード：温度応答性高分子 PDMS 伸展刺激 細胞培養 細胞シート

1. 研究開始当初の背景

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) の超薄膜ゲルを電子線照射重合法により組織培養ポリスチレン (TCPS) に固定化した温度応答性細胞培養表面は細胞シートを基盤とした再生医療を支えるインテリジェント材料として認知され、細胞シートを作製することができる温度応答性細胞培養表面は、培養細胞をシート状で回収できるインテリジェント表面として高い注目を集めている。各種のヒト組織から得られた細胞を温度応答性細胞培養表面で培養し、温度変化により回収した細胞シートを損傷したヒト角膜、ヒト歯周組織、ヒト食道組織、ヒト心筋組織等に移植することで、損傷したこれらの組織再生や治療に成功している。温度応答性細胞培養表面に固定化した高分子膜厚が表面物性や細胞接着および剥離性能に影響を与えることを系統的に調べ、その結果を基に、本提案者らのグループが温度応答性細胞培養表面の機能発現のメカニズムを初めて明らかにした。材料表面に対する細胞の接着性について、同じ組成の材料表面であっても細胞種の違いにより、その接着性が異なることが知られている。温度応答性細胞培養表面への細胞接着性も、細胞種によって接着しにくい場合や、接着しても剥離しない場合が経験的に知られ、特にヒト組織由来の細胞では、このような傾向を示す種類が多い。そのため、PIPAAm 層の膜厚を変化させ、表面物性を変化させることで、目的細胞種に適した温度応答性細胞培養表面を作製する。例えば、臍島細胞を用いて細胞シートを温度応答性細胞培養表面で作製する場合、膜厚が 20nm よりも厚い温度応答性細胞培養表面を使用する。一方、ガラスやシリコン基板を使い、表面開始リビングラジカル重合法で作製した高分子ブラシ表面でも温度応答性細胞培養表面が作製可能である高分子ブラシ層の厚みや、高分子鎖の密度がブラシ表面の物性に大きな影響を与えることが報告されている。たとえば、PIPAAm 鎖の密度が $0.03 \sim 0.04$ chains/nm² の時に温度応答性細胞培養表面として機能する傾向を示す。しかし、PIPAAm 鎖の密度が低い表面では低温処理を行っても細胞は剥離せず、高分子密度が高い場合、細胞は接着しない。C. Xue ら (Adv.Func. Mater.,2012,22,2394) の報告ではフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス (ECM) が高分子ブラシ層に対して ternary adsorption となる場合において、温度変化による細胞の接脱着現象が発現する点を指摘している。上述した結果は、PIPAAm ブラシ表面が温度応答性細胞培養表面として機能するためには、高分子ブラシの密度とその時の高分子鎖のコンフォメーションが重要であることを示唆している。高分子ブラシ表面に対する、細胞の接着性やタンパク質の吸着挙動について

(PHEMA) ブラシ表面でも同様な傾向が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では材料表面に固定化した新規温度応答性高分子である poly(*N'*-(*N'*-alkylcarbamido)propyl methacrylamide (PNNACPM) の水和、脱水和を温度変化を用いることなく、固定化した基材の伸縮で水和、脱水和を制御しうる表面を開発し、これを新しい伸縮・温度応答性細胞培養基材として利用することで、従来の温度応答性細胞培養表面では培養が困難であったヒト細胞種の培養さらには細胞シート作製を実現しながら、本研究コンセプトを実証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) チオキサントン基を固定化したポリスチレン表面の作製

チオサリチル酸を 20 mM の濃度で濃硫酸に溶解させ、市販のポリスチレン製ペトリディッシュのこれを添加し、室温で 1 時間静置した後で 3 時間加温した。その後、洗浄・乾燥させ目的の表面を得た。

(2) チオキサントン基固定化表面への高分子の固定化

N-メチルジエタノールアミン (100 mM) の水溶液に IPAAm もしくは NNACPM (適量) を適量の水もしくは水/メタノール系の溶媒に溶解させた後、窒素ガスで置換した。この水溶液を、チオサリチル酸-濃硫酸で処理したポリスチレン製ペトリディッシュに 2 mL、滴下し、低温チャンバー内 (10 °C) で LED (波長: 405 nm) を照射し、PIPAAm および PNNACPM を固定化した。

(3) 高分子を固定化するためのポリジメチルシロキサン (PDMS) 表面の修飾

市販の PDMS 表面にクラッキングが発生しにくい条件下で O₂ プラズマ処理を行った。プラズマ処理直後、3-アミノプロピルトリメトキシシラン (APTMS) を溶解させた水溶液 (APTMS 1.0 vol%) に浸し、60 °C で 1 時間反応させ、PDMS 表面上にアミノ基を導入した。また、市販の Silpot184 (Dow Corning Toray の製品名) を使い、プラスチックシャーレ上に反応液を適量、滴下し 80 °C で硬化させ、膜状の PDMS を作製した。同様に PDMS 表面にフェニル基を導入するために、ジフェニル基を有するポリシロキサン系の試薬を Silipot184 のポリジメチルシロキサン溶液と混合し、フェニル基を有する PDMS 膜を作製した。

(4) NNACPM の合成

既報に従い目的のモノマーを合成した (Y. Akiyama, et al., Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 46, 5471.). 具体的には、3-アミノプロピルメタクリルアミド塩酸塩 (東京化成) 5g とトリエチルアミン (5g) をメタノール (50ml) に溶

解させ、イソ酪酸無水物 (7g) を溶解させたメタノール溶液 (10ml) を氷冷条件下で、攪拌しながら、ゆっくりと1時間かけて滴下した。滴下後、室温で30分間、攪拌し、溶媒を除去後、アセトン (50ml) を添加し、析出物をろ過し、アセトンが適量になるまへエバポレーターで溶媒を除去した。その後、カラムクロマトグラフィーにより目的の成分を含む溶出液を分取し、溶媒除去、再結晶させ目的とする NNACPM を得た。

(5) 伸展デバイスの開発

一軸伸展用のデバイスを設計し3次元プリンターを用いて自作した。一軸伸展・伸縮用デバイスのモデルとして、2種のプロトタイプを作成した。また、2軸方向に伸展可能なモデルの設計も行い、プロトタイプの作製も試みた。さらに、精密に一軸方向に伸展、制御させるため、ステップワイズモータを組み入れた一軸伸展用デバイスの開発も行った。

4. 研究成果

(1) チオキサントン基を導入したポリスチレン表面の作製と PIPAAm および PNNACPM の固定化の確認

チオキサントン基を固定化したポリスチレン表面を利用し、PIPAAm および PNNACPM の固定化の確認を行い、チオキサントン基が光重合開始剤として機能し、同時に高分子の固定化に寄与するかどうかを確認した。IPAAm および触媒となるアミン存在下で光照射を行った所、PIPAAm が固定化されていることを FT-IR/ATR および XPS で確認した。また、10 の低温条件下で光照射を行うことで、短時間にかつ、表面均一に PIPAAm を固定化できることも確認した。この時、電子線照射重合で PIPAAm を固定化した場合は超薄膜状のゲルであるが本手法で固定化された高分子は直鎖状であることが予想される。PIPAAm で最適化された固定化条件を基に PNNACPM についても固定化を試みた。その結果、PNNACPM も固定化されていることを確認した。

(2) PDMS 表面へのチオキサントン基導入の試み

次に、フェニル基を有する PDMS 表面にチオキサントン基の導入を試みた。チオキサントン基導入後は、PDMS の強度が減少しているように見受けられた。これは、チオキサントン基の導入が濃硫酸条件下での反応条件であったため、シロキサン結合が一部、加水分解を受けたためであると考えられる。実際に PDMS 膜を一晚、濃硫酸溶液に浸すだけで分解されている事実からのこの点は示唆された。チオキサントン基を導入する条件は室温より高い温度で、短時間で処理することにした。また、フェニル基のような疎水性基が入ること加水分解を受けにくくなる可能性も考えられた。

(3) 一軸方向および二軸方向へ伸展させるためのデバイス開発

伸展時における表面物性の変化や細胞石接着性を確認するために、一軸方向へ伸展させるためにデバイスの開発を行った。本研究では、当研究所が所有する三次元プリンターを利用し、伸展デバイスのプロトタイプの自作から着手した (図1)。

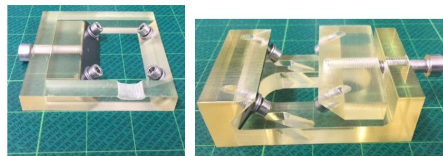


図1. 三次元プリンターで作製した PDMS 基材を一軸方向で伸展させるためのデバイスのプロトタイプ。左) FT-IR/ATR 用の基材伸展デバイス。右) 接触角測定用の伸展デバイス。写真中のサンプルステージの四角形の1辺は2cm。

これらの知見を基に、x y の二軸方向に伸縮可能なデバイスの作製を行った。作製したデバイスはx軸方向を固定化しながら、y軸方向を固定化し、その後、デバイスを各軸方向に伸展するデバイスとなった。しかしながら、手動での伸展機構を取り入れた点、また、扱うサンプルのサイズが1.5cm各の正方形のサンプルをターゲットとしたため、複雑な機構となり、目的のサンプルを伸展することは可能であったが、細胞培養や伸展しながらの AFM、FI-IR/ATR や XPS などの表面物性評価には適さないデバイスとなった。その点を改良するために、3Dプリンターで把持部を作製しステップワイズモータ機構を取り入れた xy 軸方向に伸展・伸縮可能なデバイスを改めて作製した。本デバイスにより細胞培養が可能な伸展デバイスを作製することができた。また、把持部だけを利用することで伸展させたまま、FT-IR/ATR での評価が行えることを確認した。

(4) 温度応答性高分子を固定化した PIPAAm 固定化 PDMS 表面と PNNACPM 固定化 PDMS 表面の物性評価

PIPAAm 固定化 PDMS (PIPAAm-PDMS) の結果について述べる。伸展率が0%および20%の11.4PIPAAm-PDMS (PIPAAm 固定化量11.4ug/cm²) の接触角は、20 に比べて37の方が高い値を示した。これは、固定化した PIPAAm 鎖の脱水和を示す。一方、37、20 の温度変化にかかわらず伸展状態の方がより疎水的な表面であることが確認できた。PIPAAm-PDMS の基材を伸展することで PIPAAm ゲル層の厚みが薄くなるとともに、PIPAAm 鎖も伸展し、分子運動性も抑制され、結果的に疎水性が向上したと考えられる。BAEC の初期接着は、伸展率0%の12.7PIPAAm-PDMS 表面に比べ、伸展率20%の12.7PIPAAm-PDMS 表面の方が良い細胞接着率

を示した。細胞 1 個あたりの面積はそれぞれ 879 μm^2 , 1394 μm^2 (細胞 60 個の平均)であり、伸展させた 12.7PIPAAm-PDMS 上で BAEC はより伸展・接着した。次に、12.7PIPAAm-PDMS 上で 37 °C で 24 時間培養後、低温処理時に基材を収縮したときの BAEC の脱着挙動を評価した。その結果、低温処理時に伸展率 20%を維持した場合よりも、伸展率を 20%から 0%にした場合において、速やかに脱着した。

PIPAAm固定化領域と非固定化領域からなる 13.5PIPAAm-PDMS を用いて、基材伸縮による固定化PIPAAmゲル層の厚みの変化の比較、評価を行った。その結果、伸展率 0%の時では、PIPAAmゲル層は約 700nm の厚みであったのに対し、伸展率 20%の時にはPIPAAmゲル層の厚みは 480nm 程度まで減少した。

これらの知見を基に、PNNACPM 固定化 PDMS (PNNACPM-PDMS) についても同様な評価を行った。今回、伸展に耐えうるものが PNNACPM-PDMS の作製が困難な点もあり、伸展率が 0%のもので評価を行うことにした。細胞の XPS や FT-IR/ATR の結果から目的の高分子が固定化されていることを確認した。PNNACPM-PDMS にウシ血管内皮細胞を播種することで細胞は 37 °C で接着した。しかしながら、低温処理 (10 °C および 20 °C) を行っても 40%-50%程度の細胞の接着が確認された。この結果から、PNNACPM の相転移温度がこれよりも低い所にあると考え、新規な温度応答性高分子である、p(N-methacryoyl-N'-isopropynoly-1,3-diaminopropane) (PNMANPIproDAP) を PDMS 表面に固定化した PNMANPIproDAP-PDMS を使い細胞培養評価を行った。同様に 37 °C において細胞は接着した。予備的な検討、評価として伸展前後における細胞の接着性の評価を行った (n=1)。その結果、基材を伸展 (伸展率: 20%) させることで細胞接着性が向上することを確認した。一方、接触角の値は、伸展時の表面濡れ性は伸縮時 (伸展前) よりも疎水性であることが示された (n=1)。伸展における細胞接着性向上は、基材表面の接触角測定の結果と同様な傾向を示した。さらに、伸展状態および非伸展状態の基材において細胞は増殖しコンフルエント状となり、温度を 20 °C 付近に低下させることで、細胞をシート状で剥離することに成功した。当初、伸展によって表面接触角の向上を期待していたが、今回の結果から、十分な PNMANPIproDAP が固定化されていない可能性が示唆された。また、伸展・収縮により PDMS 表面の粘弾性変化や形状変化の可能性も残されており、細胞の接着および剥離はこのような物理的な要因の変化が寄与している可能性も残されている。今後、このような点に着目しながら、ベンゾフェノン等のような光重合開始剤を利用した PDMS 表面での温度応答性表面の構築を検討したい。

新規に開発した温度応答性高分子を付与した PDMS 表面は連続的な伸展・収縮培養法

への応用や、高機能化した細胞シートの作製への応用が期待できる。

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 1 件)

FUKUMORI Kazuhiro, AKIYAMA Yoshikatsu, YAMATO Masayuki, Okano Teruo, A Facile Method for Preparing Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces by Using a Thioxanthone Photoinitiator Immobilized on a Polystyrene Surface, ChemNanoMat, 2016, 2(5), 454-460. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

AKIYAMA Yoshikatsu, Takeda Naoya, YAMATO Masayuki, Okano Teruo, Characterization of poly(N-isopropylacrylamide) gel grafted polydimethylsiloxane as temperature-responsive cell culture substrate, 3rd International Conference of Biomaterials in Tokyo, 2016/11/29, Tokyo University (Tokyo, Hongo).

Matsuyama Miki, AKIYAMA Yoshikatsu, Takeda Naoya, YAMATO Masayuki, Okano Teruo, Characterization of poly(N-isopropylacrylamide) gel grafted polydimethylsiloxane as temperature-responsive cell culture substrate, 27th International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2016/11/4, Nagoya University (Nagoya, Aichi).

Yoshikatsu AKIYAMA, New temperature-responsive cell culture surfaces for cell-sheet based tissue engineering, 27th 2016 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, Nagoya University (Nagoya), 2016/9/19, EMRS 2016 Fall Meeting, Warsaw (Poland) (Invited).

Matsuyama Miki, AKIYAMA Yoshikatsu, Takeda Naoya, YAMATO Masayuki, Okano Teruo, Mechanical Stretching induced alternation of cell attachment and detachment character of poly(N-isopropylacrylamide) gel grafted PDMS surface, 2016/5/20, 10th World Biomaterials Congress, Montreal (Canada).

Yoshikatsu AKIYAMA, A facile method for temperature-responsive cell culture surfaces by using thioxanthone photo-initiator immobilized

polystyrene surfaces, 2016 EMN Bioinspired Materials Meeting, 2016/3/15, Kaohsiung(Taipei) (Invited).

Yoshikatsu AKIYAMA, Nano-intelligent biomaterial surface for cell-sheet based tissue engineering, BIT's 2nd Annual Congress of Smart Biomaterial 2016/3/4, Singapore (Singapore) (Invited).

Yoshikatsu AKIYAMA, Recent Development of temperature-responsive cell culture surface (Invited), E-MRS Fall Meeting 2014, 2014/9/16, Warsaw (Poland).

秋山義勝、松山未希、武田直也、大和雅之、岡野光夫、伸縮可能な温度応答性細胞培養基材の物性評価と細胞シート剥離への応用、2014/9/25, 第63回高分子討論会、長崎大学(長崎県、長崎市)

〔図書〕(計1件)

細胞社会学 大和雅之(編著) 第2章2項目2節担当 細胞シート作成技術 p 26 - p 35 (担当).

6. 研究組織

(1)研究代表者

東京女子医科大学・医学部・講師

秋山 義勝 (AKIYAMA, Yoshikatsu)

研究者番号: 20349640

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

東京女子医科大学・医学部・特任講師

原口 祐次 (HARAGUCHI, Yuji)

研究者番号: 80272251