

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25889060

研究課題名(和文) “細胞接着” 基材表面物性の in situ 光制御による幹細胞分化の動的局所変換

研究課題名(英文) Dynamic conversion of MSC differentiation by photo-regulating surface properties of cell adhered substrate

研究代表者

有坂 慶紀 (Arisaka, Yoshinori)

早稲田大学・理工学術院・助手

研究者番号：70590115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)が接着した基板の表面特性を動的に変化させ、細胞分化システムを動的に転換する光架橋性高分子ブラシ表面(sPDMIM)の開発を行った。sPDMIMは、メタクリル酸メチルと光架橋性ジメチルマレイミドモノマーとの共重合によって作製した。MSCは、sPDMIM上でOCN遺伝子発現量が減少したが、光架橋sPDMIM(cl-sPDMIM)上では増加した。細胞培養中に光架橋した場合、OCNの減少が抑制されるが、cl-sPDMIM上のMSCsとも異なった。これらの結果は、動的に表面構造を変更した基板上のhbmMSCが、表面特性が固定された基板とは異なる分化システムに誘導される可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we designed a photo cross-linkable polymer brush surface having dimethylmaleimide moieties (DMI) for dynamically regulating cell behaviours of hbmMSCs. By UV irradiation, mobility of polymeric chain and nanotopology of these surfaces are able to change with photodimerization reaction of DMI. Photo cross-linkable polymer brush surfaces of poly((dimethyl maleimide ethyl methacrylate)-co-(methyl methacrylate)) [sPDMIM] were prepared by surface-initiated RAFT polymerization. To evaluate the effect of photo-induced alteration of the surface properties on cell behaviours of hbmMSCs, the cells were cultured on the sPDMIM surfaces with or without UV irradiation. hbmMSCs took spindle shape without UV cross-linking, although the cells widely spread on cross-linked sPDMIM surfaces. Furthermore, qRT-PCR assays showed that hbmMSCs on sPDMIM surfaces expressed mRNA of osteocalcin 1.8 times higher than those on cross-linked sPDMIM surfaces at 7-day cultivation.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：光架橋性 高分子ブラシ表面 分化 間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

生体内における細胞の形態、運動性、機能は、静的もしくは動的な微視的細胞周囲環境によって調節されており、幹細胞においては、ニッチと呼ばれる微視環境がその細胞機能や分化を制御していることが知られている。近年、細胞培養足場の剛性などの機械的特性や表面電位および表面濡れ性などの物理化学的特性、表面の微小形状を工学的に設計することで、細胞接着足場環境による細胞挙動制御を目指す研究が盛んに行われている。たとえば、細胞培養足場に2つの異なるヤング率(軟らかさ)を有したパターン化表面の作製によって細胞の未分化維持および特定の分化系統への誘導がすでに報告されている(S. Kidoaki et al., Biomaterials 2011, 32(11), 2725-2733)。しかし、このような研究は、静的に固定された細胞培養足場材料であり、生体が本来持っている動的変化に対応していない。

これまでに研究代表者は、光や温度に応答する刺激応答性バイオマテリアルの開発を行っており、外部刺激による材料の機械的および物理化学的特性の転換にともなって細胞応答挙動を動的に制御する機能性細胞培養表面の構築に着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、“細胞が接着した”足場の表面特性を光刺激によって動的に変化させるために、光架橋性高分子ブラシ表面の構築を行う。光応答性表面には、光分解反応を応用する手法が多いが、副産物の生成による細胞毒性や培養環境の汚染が危惧される。そこで、マレイミド基による光二量化反応を用いて、運動性や柔軟性のある高分子ブラシ表面を、マレイミド基の光架橋によって運動性が束縛された三次元網目構造の高分子ゲル状表面へ誘導する。これによって表面のヤング率(硬さ)などの力学的特性や水に対する濡れ性などの物理化学的表面特性を動的に変化させる(図1)。

そのような光による力学的・物理化学的表面特性変化によってヒト骨髄由来間葉系幹細胞の形態および機能、分化の動的制御を目指す。

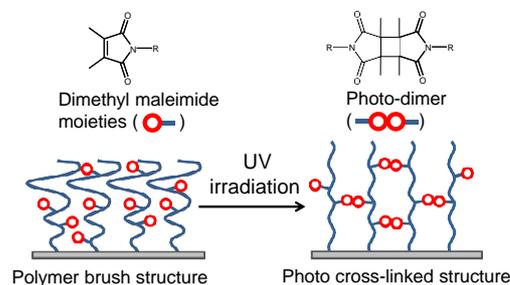


図1. 光架橋性高分子ブラシ表面による細胞挙動制御。

### 3. 研究の方法

#### 光架橋性高分子ブラシ表面の作製

光架橋性高分子ブラシ表面は、表面開始可逆的付加開裂連鎖移動(*si*-RAFT)重合によって作製した(図2)。連鎖移動剤である  $\alpha$ -methyl trithiocarbonate-*S*-phenylacetic acid (MTPA) および光架橋性モノマーである

2-(3,4-dimethyl-2,5-dioxo-2,5-dihydropyrrol-1-yl)-ethyl methacrylate (DMIMA)は、既往研究に従い合成した。

カバーガラス(24 mm × 24 mm)表面をピラニア溶液( $H_2O_2$ :  $H_2SO_4$  = 3: 7)によって洗浄した後、3-aminopropyl triethoxysilane (APTES)/トルエン溶液を用いて気相法によってシラン処理を施し、ガラス表面にアミノ基を導入した(sAPTES)。つぎに、MTPA のカルボキシル基と sAPTES のアミノ基をカップリングすることで、表面に連鎖移動剤を有したガラス基板(sMTPA)を作製した。開始剤である 4,4'-azobis(4-cyanopentanoic acid) (CPA)お

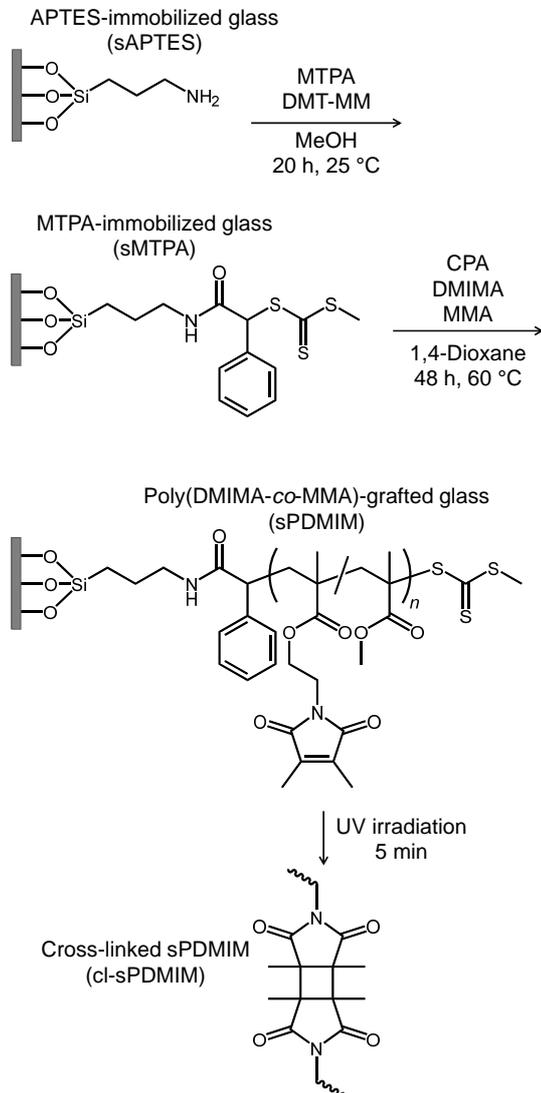


図2. 光架橋性高分子ブラシ表面の作製方法

よび MTPA、methyl methacrylate (MMA)、DMIMA を混合した 1,4-dioxane 溶液に sMTPA を浸漬させ、60°C で 48 時間重合を行った。重合後、十分量のメタノールで基板を洗浄し、精製した P(DMIMA-co-MMA) 修飾基板 (sPDMIM) を得た。今回の重合方法では、遊離の MTPA が重合系に含まれているため、反応溶液中にも P(DMIMA-co-MMA) が合成される。そこでこの遊離の P(DMIMA-co-MMA) を、ジエチルエーテルを用いた再沈殿法によって精製し、回収した。紫外線ランプ (波長: 254 nm, 強度: 2.3 mW/cm<sup>2</sup> at 1 cm) を用いて 2 分間光照射することで、光架橋した sPDMIM (cl-sPDMIM) 表面を作製した。

表面の物理化学的特性および力学特性評価  
 作製した sPDMIM および cl-sPDMIM 表面について、接触角計を用いた濡れ性評価を行った。また原子間力顕微鏡 (AFM) によって、フォースカーブを測定し、表面の硬さ変化について評価した。

#### ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hbmMSC) は、 $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で基板に播種し、7 日間細胞培養を行った。培地は、10% 血清および 1% 抗生物質を含む DMEM を用いた。培養 4 日目および 7 日目の細胞を回収し mRNA を抽出した後、リアルタイム PCR によって osteocalcin (OCN) および sex determining region Y (SRY)-box 9 (SOX9) の遺伝子発現量を定量した。ハウスキーピング遺伝子として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

#### 4. 研究成果

Si-RAFT 重合によって、P(DMIMA-co-MMA) 修飾基板 (sPDMIM) を作製した。ガラス表面に P(DMIM-co-MMA) が修飾できたことを XPS 測定によって確認した。sAPTES や sMTPA と比較して、表面の炭素割合が増加し、ケイ素の割合が減少した。これは、P(DMIMA-co-MMA) によって基板表面が覆われていることを示している。また、表面に修飾された P(DMIMA-co-MMA) の分子量および DMIMA/MMA 比を求めるために、遊離の P(DMIMA-co-MMA) の分子量および DMIMA/MMA 比を吸収スペクトルによる末端定量および <sup>1</sup>H-NMR 測定より算出した結果、分子量が 11400、DMIMA/MMA 比は、7.8/1.0 であった。この表面を用いて、表面の濡れ性および硬さを評価した。光照射前後における水に対する基板の接触角は、 $65.8 \pm 0.9^\circ$  (光照射前)、 $66.5 \pm 1.4^\circ$  (光照射後) であった。また、AFM より得られたフォースカーブの傾きは、sPDMIM 表面では  $40.7 \pm 1.1$  mN/m であったが、cl-sPDMIM 表面で

は  $35.5 \pm 3.4$  mN/m であった。この結果は、光架橋によって表面の硬さを任意領域のみで変化させられることを示している。

このような光架橋性高分子ブラシ基板の表面構造がおよぼす hbmMSC への影響について評価するために、sPDMIM および cl-sPDMIM 表面を用いて hbmMSC の培養を行った。hbmMSC を播種してから細胞培養 1 日目において、sPDMIM 表面上の細胞は、一方向に細長く伸長した形態を示し、cl-sPDMIM 表面上の細胞は、ランダム方向に広く伸展する傾向を示した (図 3)。この結

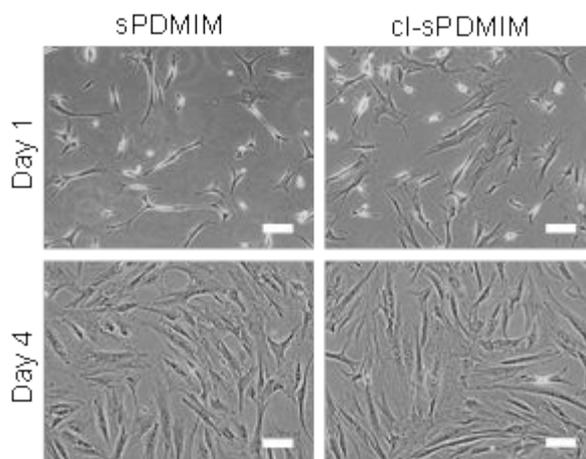


図 3. sPDMIM 表面および cl-sPDMIM 表面上における hbmMSC の細胞形態。Scale bar: 100 μm

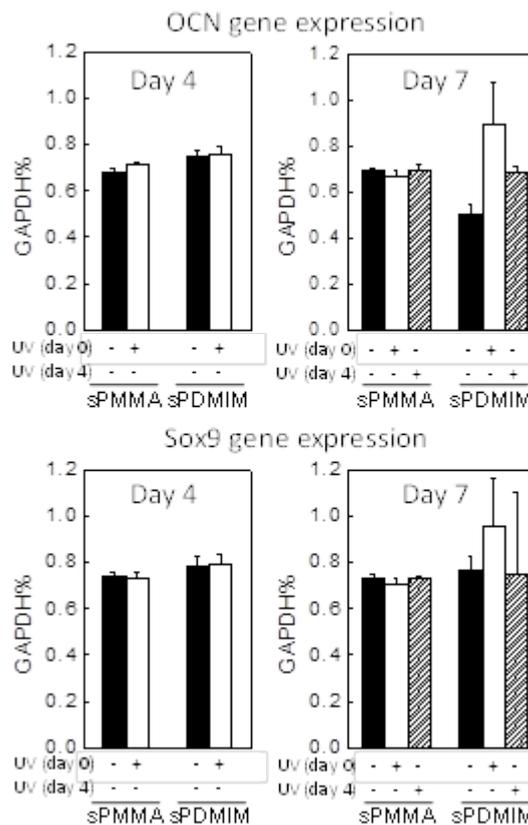


図 4. 光照射前後における OCN および SOX9 遺伝子の発現量変化。

果より、hbmMSC が基板表面の微小な変化を認識したことを示している。このように初期接着において2種の基板間で細胞形態が大きく異なることを確認できたが、培養日数の経過にともない細胞が基板表面を完全に覆ったため、それぞれの基板上で細胞形態を個々に識別することが困難となった。そこで、培養4日目および7日目における細胞のOCNおよびSOX9遺伝子発現量を測定し、解析した(図4)。コントロール基板としてDMIMAを含まないPMMA修飾基板(sPMMA)を用いた。培養4日目、すべての基板においてOCNおよびSOX9遺伝子の発現量に大きな差異は認められなかった。培養7日目、SOX9の遺伝子発現量はsPDMIMおよびcl-sPDMIM表面において有意差を確認できなかったが、cl-sPDMIM上で培養されたhbmMSCのOCN発現量は、sPDMIM上の1.8倍であった。この結果より、sPDMIMおよびcl-sPDMIM表面は、hbmMSCをそれぞれ異なる分化系統へ誘導できる可能性を有していることが明らかになった。

最後に、光照射による表面構造の転換がおよぼすhbmMSCへの影響について評価するために、4日間sPDMIM表面上でhbmMSCを培養した後、同表面に光架橋処理を行い、続けて3日間細胞培養を行った。この基板上における培養7日後のSOX9の遺伝子発現量は、sPDMIMおよびcl-sPDMIM表面上で7日間培養した場合と同様にほとんど変化なかったが、OCNの発現量は、sPDMIM表面上より1.4倍増大し、cl-sPDMIM表面上より0.8倍減少した結果であった。さらに長期間培養したが、OCNの遺伝子発現量は、そのまま一定であった。この際、光照射によるOCNおよびSOX9の遺伝子発現量への影響が懸念されるが、sPMMA表面を用いて培養したhbmMSCにおいて光照射前後においてOCN、SOX9の遺伝子発現量に変化ないことを確認している。これらの結果は、表面特性の動的変化によって細胞の分化系統を転換できることを示唆している。

以上の結果より、高分子ブラシ表面と高分子ゲル状表面で培養されたhbmMSCは、それぞれの分化系統が異なり、さらに培養中において動的に表面構造が変更された基板上のhbmMSCは、それら2種の基板上とも異なる第3の分化系統に誘導される可能性を有している。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

1. Yoshinori Arisaka、Yuka Nishijima、Naoya Takeda、<sup>†</sup> Preparation of photo

cross-linkable polymer brush surface toward dynamically regulating hbmMSCs behaviors』、A3 Foresight International Symposium on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine、2014年10月、東京、ポスター発表

2. 有坂慶紀、西島有香、武田直也、『表面開始RAFT重合による光架橋性高分子ブラシ表面の構築および細胞培養基材への応用』、第36回日本バイオマテリアル学会大会、2014年11月、東京、ポスター発表

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

有坂 慶紀 (ARISAKA YOSHINORI)

早稲田大学 理工学術院 助手

研究者番号：70590115

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：