

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26420714

研究課題名(和文)細胞認識因子を組み込んだインテリジェント型細胞分離基材の開発

研究課題名(英文)Development of Intelligent Cell Separation Materials with Cell Recognition

研究代表者

長瀬 健一 (NAGASE, Kenichi)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授

研究者番号：10439838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、再生医療への応用を目的とし、細胞治療に用いる細胞を温度変化のみで分離するインテリジェント型分離基材の設計を行なった。ガラス基板、微細加工基板、マイクロファイバーの表面に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を修飾し、37℃で細胞を接着させて20℃で細胞を脱着させる基板表面を作製した。この際、細胞種ごとの接着性の差を大きくする基材設計を行なう事で細胞の分離効率の向上を試みた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, thermoresponsive cell separation materials were developed for the application in regenerative medicine. Thermoresponsive polymer, poly (N-isopropylacrylamide), was modified on glass plates, micro structured substrates, and microfibers. Various types of cells were seeded on the prepared substrates at 37℃, and detached at 20℃. Temperature-modulated cell separation was performed using the difference in cell adhesion property on the prepared substrates. Cell separation efficiency using the prepared substrates was improved by increasing the difference in cell adhesion property among cell types.

研究分野：生体材料

キーワード：細胞分離 細胞接着 温度応答性 再生医療 バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

組織・臓器の再生、再構築を目標とする再生医療において、生体に細胞を移植して治療効果を促す細胞移植療法が効果的な治療方法として注目を集めている。この治療方法では、治療効果を促す細胞の細胞懸濁液、もしくは細胞組織を生体内へと移植するが、これらを調製する際に、多種多様の細胞の中から治療効果の高い細胞のみを精製する技術が必要となる。現在、確立されている細胞分離技術として、細胞表面を蛍光標識により染色して分離する方法や、細胞表面に磁気ビーズを修飾し、磁力によって細胞を分離する方法が確立されている。しかし、これらは細胞表面に修飾を施すため、細胞の性質を変化させてしまう可能性や、修飾した蛍光色素、磁気ビーズが移植後に生体内で悪影響を及ぼす可能性がある。そこで、細胞表面を修飾する必要が無く、活性の高い状態で細胞を分離可能な新しい細胞分離方法の創出に大きな期待が寄せられている。

2. 研究の目的

本研究では細胞に特異的な認識を促す細胞分離用基材の設計を行った。温度応答性高分子であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を原子移動ラジカル重合(ATRP)により高密度に修飾した基材への細胞への接着、脱着を温度により制御し、細胞ごとの接着性、脱着性の差により細胞を分離する。また細胞種ごとの接着性、脱着性の差を起こす因子として、正荷電による静電的な相互作用、基板表面の微細構造、および細胞接着基材の構造などを調節し、細胞の分離精度を向上させる。これらの検討により、温度変化のみで細胞を分離する細胞分離方法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 正荷電を有する温度応答性高分子修飾基板の作製

ガラス基板を酸素プラズマの照射により、活性化し、ガラス基板に水酸基を導入した。その後、ATRP 開始剤である *m,p*-クロロメチルフェニルエチルトリメトキシシランのトルエン溶液を作製し、ガラス基板に室温で 18h 反応させた。反応後のガラス基板をトルエン、アセトンで洗浄し、3h, 110 °C で乾燥する事で、ATRP 開始剤をガラス基板に修飾した。その後、2-プロパノールに温度応答性の IPAAm、正荷電を有する *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAAm)、疎水性の *tert*-ブチルアクリルアミド(tBAAm)を溶解し、アルゴンガスを吹き込んで脱酸素を行った。ATRP の触媒である CuCl、CuCl₂、Me₆TREN を添加し、ATRP の反応溶液を作製した。この反応溶液を ATRP 開始剤修飾基板に反応させ、正荷電を有する温度応答性高分子ブラシをガラス基板表面に構築した(図 1)。作製したガラス基板にヒト骨髄由来間葉系

幹細胞(hbmMSC)や他の骨髄由来細胞を播種し、37 °Cでの接着挙動、20 °Cでの脱着挙動を確認した。

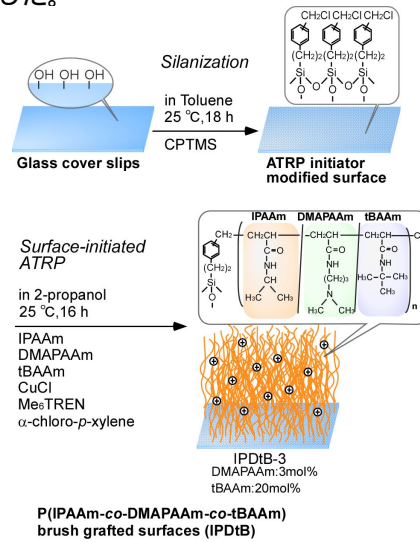


図 1 正荷電を有する温度応答性高分子ブラシの作製

(2) 微細構造を有する温度応答性高分子修飾基板の作製

ガラス基板表面にスチレン(St)とビニルベンジルクロライド(VBC)の共重合体の薄膜を形成し、薄膜に微細構造を有するナノインプリントモールドを押し付けることで、ホール形状、ピラー形状、ライン形状を有する微細構造基板を作製した。その後、溶媒に水とメタノールを 4 : 1 で混合した混合溶媒に NIPAAm を溶解させ、アルゴンガスを吹き込んで脱酸素化し、ATRP の触媒である CuCl、CuCl₂、Me₆TREN を添加し、ATRP の反応溶液を作製した。この反応溶液を微細構造基板表面に反応させ、PIPAAm を修飾し、微細構造基板に温度応答性を付与した(図 2)。作製した基板表面にヒト血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)、ヒト骨格筋芽細胞を播種し、37 °Cでの接着挙動、20 °Cでの脱着挙動を確認した。

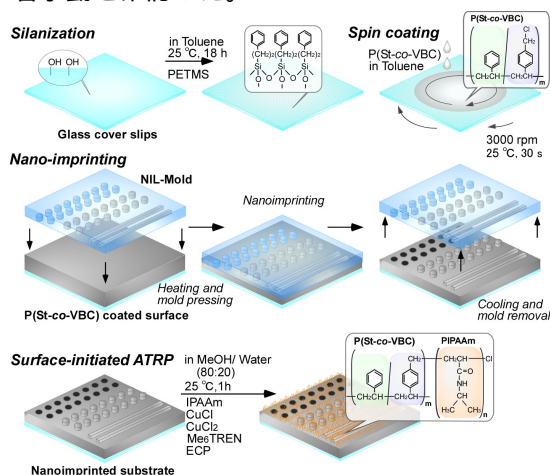


図 2 微細構造を有する温度応答性高分子ブラシの作製

(3) 温度応答性高分子修飾マイクロファイバーの作製

ポリビニルベンジルクロライド(PVBC)をラジカル重合により重合した。作製したPVBCをジクロロメタンに溶解し、エレクトロスピンニング法により、PVBCのマイクロファイバーを作製した。その後、2-プロパノールにIPAAmを溶解し、ATRPによりPIPAAmを修飾することで、温度応答性のマイクロファイバーを作製した(図3)。作製したマイクロファイバーにHUVEC、NHDF、または脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)、脂肪細胞、微小血管内皮細胞(HMVEC)を播種し、37℃での接着挙動、20℃での脱着挙動を確認した。

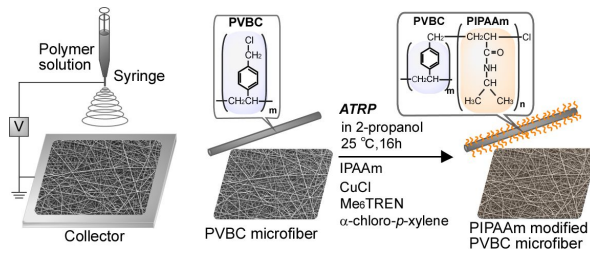


図3 温度応答性マイクロファイバーの作製

4. 研究成果

(1) 正荷電を有する温度応答性高分子修飾基板を用いた間葉系幹細胞の分離

作製した正荷電を有する温度応答性基板を用いて37℃でhbmMSCと対照細胞としてNHDFを播種したところ、hbmMSCは高い接着率を示したが、NHDFは低い接着率を示した。また、他の骨髄由来細胞とhbmMSCの混合細胞懸濁液を播種したところ、hbmMSCのみが接着し、他の骨髄由来細胞は接着しなかった。また温度を20℃に下げたところ、接着していたhbmMSCが基板から脱着することがわかった(図4)。これらの結果から、正荷電を有する温度応答性高分子修飾基板は、間葉系幹細胞のみを選択的に接着させる事ができることが示され、温度変化による骨髄由来間葉系幹細胞の精製が可能である事がわかった。

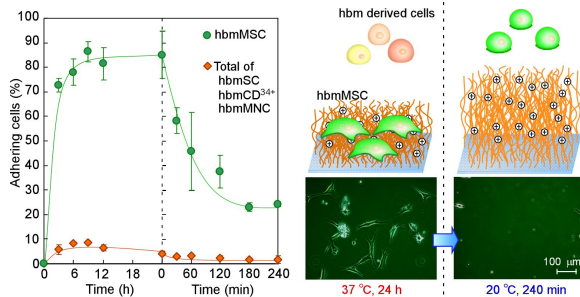


図4 正荷電を有する温度応答性高分子修飾基板を用いた間葉系幹細胞の分離

(2) 微細構造を有する温度応答性高分子修飾基板を用いた細胞分離

作製した微細構造を有する温度応答性基

板にHUVEC、NHDF、HSMMを播種し、温度37℃、20℃での接着挙動を確認したところ、微細構造の形状、大きさによって異なった接着挙動が示された。特に大きさ2μmのホール形状の基板では、37℃でHUVECが接着しにくく、NHDF、HSMMは接着しやすいことがわかった。また、基板の温度を20℃に変化すると接着していたNHDFが脱着し、HSMMは細胞に残っていることがわかった(図5)。また温度37℃で三種類の細胞の混合懸濁液を基板に播種し、20℃で脱着すると、細胞培養液の中に高い組成でNHDFが含まれていることがわかった。これらの結果より、温度応答性微細構造基板に37℃で細胞を播種し、20℃で脱着させると、細胞懸濁液の細胞組成を変化させることができ、細胞分離への応用が可能であることが示された。

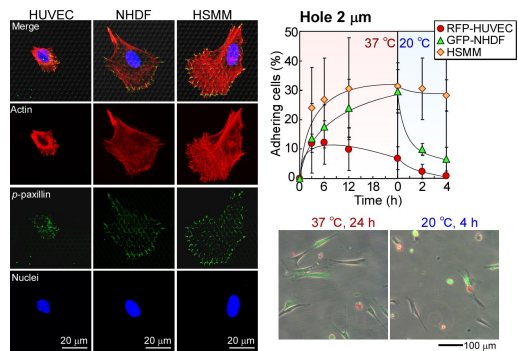


図5 正荷電を有する温度応答性高分子修飾基板を用いた間葉系幹細胞の分離

(3) 温度応答性高分子修飾マイクロファイバーを用いた細胞分離

作製した温度応答性マイクロファイバーに37℃でHUVEC、NHDFを播種したところ、NHDFはマイクロファイバーに沿って伸展するように接着し、HUVECは接着しない挙動を示した。また温度を20℃に低下させたところ、接着していた細胞が脱着したことがわかった。これら二種の細胞の混合懸濁液を37℃で播種し、20℃で回収したところ、37℃ではHUVECが多い組成の細胞懸濁液が回収でき、20℃ではNHDFの多い組成の細胞懸濁液が回収できた。また、脂肪組織に含まれているADSC、脂肪細胞、HMVECを温度37℃でマイクロファイバーに播種したところ、ADSCのみが細胞に接着し、他の細胞種は接着しなかった。また、これら三種類の細胞の混合懸濁液をマイクロファイバーに温度37℃で播種し、温度を20℃にしたところ、高い組成のADSCが得られた(図6)。これらの結果から、温度を変化させるだけで、脂肪組織由来の細胞からADSCを精製できる可能性が示された。

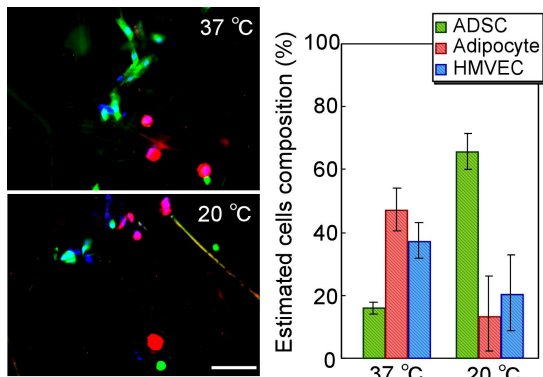


図 6 温度応答性高分子修飾マイクロファイバーを用いた間葉系幹細胞の分離

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7件)

- 1) K. Nagase, T. Okano, H. Kanazawa, Poly(*N*-isopropylacrylamide) based thermoresponsive polymer brushes for bioseparation, cellular tissue fabrication, and nano actuators, *Nano-Structures & Nano-Objects* **16** 9-23, (2018). 10.1016/j.nanoso.2018.03.010, 査読 有
 - 2) K. Nagase, M. Yamato, H. Kanazawa, T. Okano, Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications, *Biomaterials* **153**(Supplement C) 27-48, (2018). 10.1016/j.biomaterials.2017.10.026, 査読 有
 - 3) K. Nagase, R. Shukuwa, T. Onuma, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, Micro/nano-imprinted substrates grafted with a thermoresponsive polymer for thermally modulated cell separation, *J. Mater. Chem. B* **5**(30) 5924-5930, (2017). (Selected Front Cover Article) 10.1039/C7TB01251A, 査読 有
 - 4) K. Nagase, Y. Sakurada, S. Onizuka, T. Iwata, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, Thermoresponsive polymer-modified microfibers for cell separations, *Acta Biomater.* **53** 81-92, (2017). 10.1016/j.actbio.2017.02.033, 査読 有
 - 5) K. Nagase, T. Okano, "Thermoresponsive-polymer-based materials for temperature-modulated bioanalysis and bioseparations", *J. Mater. Chem. B*, **4** (39), 6381-6397, (2016). 10.1039/c6tb01003b, 査読 有
- 6) K. Nagase, T. Onuma, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, Enhanced Wettability Changes by Synergistic Effect of Micro/NanoImprinted Substrates and Grafted Thermoresponsive Polymer Brushes, *Macromolecular Rapid Communications* **36**(22) 2015 1965-1970 (Selected Front Cover Article) 10.1002/marc.201500393, 査読 有
 - 7) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, Thermoresponsive Cationic Copolymer Brushes for Mesenchymal Stem Cell Separation, *Biomacromolecules*. **16** (2) 532-540 (2015) 10.1021/bm501591s, 査読 有
- [学会発表](計9件)
- 1) K. Nagase, R. Shukuwa, T. Onuma, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, "Thermoresponsive Polymer Modified Nanoimprint Substrates for Cell Separation", The 6th Asian Biomaterials Congress: ABMC6, 2017 10
 - 2) K. Nagase, Y. Sakurada, S. Onizuka, T. Iwata, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, "Thermally-Modulated Cell Separations using Microfibers", ESB2017, 2017 09
 - 3) K. Nagase, Y. Sakurada, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, "Thermally Modulated Cell Separation using Thermoresponsive Micro Fibers" The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2016), Fukuoka, 2016.12
 - 4) 長瀬健一 "再生医療・バイオ創薬のための高機能分離技術の開発", 第27回クロマトグラフィー科学会議, 2016.11
 - 5) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, "Thermally-modulated stem cell purification using thermoresponsive ionic copolymer brush", 10th World Biomaterials Congress (10th WBC), Montreal, Canada, 2016.05
 - 6) K. Nagase, "Thermoresponsive Polymer Brushes for Bioseparations" The 96th CSJ Annual Meeting, Asian International Symposium -Advanced Nanotechnology, 2016.03
 - 7) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K.

Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano,
“Thermoresponsive polymer brush
possessing cationic group for purification of
human bone marrow derived mesenchymal
stem cell”, The International Chemical
Congress of Pacific Basin Societies 2015
(Pacifichem2015), Honolulu, Hawaii, USA,
2015.12

8) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K.
Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano,
“Thermally Modulated Mesenchymal Stem
Cell Separation Using Thermoresponsive
Cationic Copolymer Brush” 27th European
Conference on Biomaterials, ESB2015
Krakow, Poland, 2015, 09

9) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K.
Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano
“Preparation of Thermoresponsive Cationic
Copolymer Brushes for Stem Cell
Separation”, 250th American Chemical
Society National Meeting & Exposition,
Boston, USA, 2015. 08

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長瀬 健一 (NAGASE, Kenichi)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：10439838