

## 自己評価報告書

平成23年 4月27日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20106012

研究課題名（和文）分子認識バイオインターフェースのナノ構築と  
細胞機能診断デバイスへの展開研究課題名（英文）Nano-fabrication of Molecular Recognition Bionterfaces and  
Application to Cell Analysis Micro-biodevices

研究代表者

高井 まどか (TAKAI MADOKA)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：40287975

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：生体材料，ナノバイオ，分子認識，細胞・組織，表面・界面物性

## 1. 研究計画の概要

再生医療や組織工学の発達において、細胞と材料間の相互作用を解析することは、細胞の材料表面への初期接着挙動が、増殖、伸展、分化およびアポトーシスなどの後の細胞挙動に大きな影響を与えるため重要である。細胞は、材料表面に吸着したタンパク質を介して表面と相互作用する。そこで、細胞-細胞間、細胞-マテリアル間の相互作用を独立に評価し、細胞とマテリアル間の相互作用を、一個の細胞を対象として解析するマイクロ流体デバイスの創製を目指す。細胞の接着/非接着を制御する分子認識バイオインターフェースとしては、ナノインプリント技術、リソグラフィ技術、自己組織化技術等を駆使して構築する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 分子認識バイオインターフェースの構築と細胞機能解析

① 表面開始原子移動ラジカル法 (SI-ATRP) によるバイオインターフェースの構築と細胞接着挙動の QCM-D による解析

SI-ATRPにより、モノマーにMPC(生体親和性)、HEMA(親水性)、MEMA(カチオン性)およびMPS(アニオン性)を用いて、QCM-Dの金基板に形成させたSI-ATRPの開始剤の自己組織化単分子(SAM)膜上にポリマーグラフト基板を作製した。各ポリマーブラシ表面上およびSAM膜上の細胞形態観察から、poly(MPC)ブラシ基板では細胞はほとんど接着せず、poly(HEMA)ブラシ基板では細胞は接着したが形態が丸いままで伸展しておらず、COOH-SAM表面では積極的な接着および伸展が見られた。さらに、QCM-Dを利用することにより細胞の接着と伸展プロセスを追跡す

るシグナルを得ることが可能となった。

② PDMS/PMPC ジブロックポリマーを用いたナノドメイン構造表面における細胞接着挙動の解析

ブロックポリマーの自己組織化技術を用いて、親疎水性のブロック共重合体により形成されたナノサイズの相分離構造表面での細胞接着挙動の解析をおこなった。化学組成のほぼ等しいブロック共重合体およびランダム共重合体を用いて、ポリマー表面のナノドメイン構造の存在、およびポリマーの化学組成を複合的に評価し、ブロック共重合体における細胞接着において支配的な条件での比較を行った。ほぼ同じ化学組成の表面でも、ナノドメイン構造を有する表面では、細胞接着が促進され、ナノドメイン構造をもたない均一表面では、細胞接着が抑制されることを明らかにした。

(2) 細胞操作、生化学分析用マイクロ流体デバイスの創製

PDMS 製のマイクロ流体チップを作製し、3次元ナノ粒子構造表面に抗体を固定化した高感度、低ノイズのイムノアッセイチップ、さらに PDMS の気体透過性を利用した酸素呼吸量の測定チップを作製した。

## 3. 現在までの達成度

(1)分子認識バイオインターフェースの構築と細胞機能解析に関しては、②おおむね順調に進展している。

(2)細胞操作、生化学分析用マイクロ流体デバイスの創製に関しては、細胞からの代謝物質を測定するマイクロ流体デバイスは計画どおりに進んだが、細胞と材料の相互作用をQCM-Dを用いて解析するシステムのシステムデザイン変更に伴い③やや遅れている。

#### 4. 今後の研究の推進方策

##### (1) バイオインターフェースの構築と細胞機能解析

細胞の結合部位、非結合部位をもつパターン化基板を、表面開始グラフト重合法を用いてポリマーブラシを構築し、水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて細胞—材料表面間の相互作用の解析を行う。ここで、非結合部位を2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマー、その他、アニオン性、カチオン性、非イオン性といった異なる性質のポリマーを基盤材料として形成する。最近の我々の研究から、分子レベルでの局所的な揺らぎや、膜の面内均一性がQCMの検出感度に大きな影響を与えることが解ってきた。さらに、QCMの測定感度は、表面近傍の数 $\mu\text{m}$ の領域に限定されるため、界面形成のポリマー膜合成プロセス選択が最も重要となる。ポリマー鎖長制御が可能なこと、細胞の非接着表面から第2層目のポリマーブラシ層 (細胞接着性表面) を構築することを目的としていることから、ここでは原子移動ラジカル重合法を用いてパターン化界面創製を行う。細胞接着表面としては、疎水性相互作用、静電相互作用、水素結合や、タンパク質を介した相互作用など、各種相互作用を独立に評価することを目的として設計する。構築したバイオインターフェースを用いて、細胞とマテリアル間の相互作用を粘弾性評価と重量変化を、QCMと顕微鏡観察によって同時にリアルタイムで行いながら解析する。

##### (2) 細胞操作、生化学分析用マイクロ流体デバイスの創製

生体内に近い環境での流体力学的要因を制御しながら細胞成長過程を観察することを目的とし、マイクロ流路を用いた細胞操作デバイスを構築する。昨年度にマイクロチップの設計を計画変更した。本年度は、その計画変更に伴って、QCMセンサーでの流体制御デバイスを構築する。特に、ここでは、流体制御機能、電気化学的な生化学分析機能を持たせたQCM流体デバイスを構築することを目的とする。流体制御機能、電気化学測定装置システムに関しては、昨年度に動作確認ができていたため、今年度は、細胞機能解析システムとしてQCMセンサーと組み合わせた解析を実施する。

#### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計19件) (全て査読有)

- ① N. Tajima, M. Takai, and K. Ishihara Significance of Antibody Orientation Unraveled: Well-Oriented Antibodies Recorded High Binding Affinity, *Anal. Chem.*, 83, 1969–1976(2011).
- ② K. Nishizawa, T. Konno, M. Takai and K.

Ishihara, Stabilization of phospholipid polymer surface with three-dimensional nanometer-scaled structure for highly sensitive immunoassay, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 77, 263-269(2010).

- ③ Y. Xu, M. Takai, and K. Ishihara, Protein adsorption and cell adhesion on cationic, neutral, and anionic 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine copolymer surfaces, *Biomaterials*, 30, 4930-4938 (2009).
- ④ J.-H. Seo, R. Matsuno, M. Takai, and K. Ishihara, Cell adhesion on phaseseparated surface of block copolymer composed of poly-(2-methacryloyloxyethyl phospholcholine) and poly(dimethylsilixane), *Biomaterials*, 30, 5530-5540(2009).
- ⑤ Y. Xu, M. Takai, K. Ishihara, Suppression of Protein Adsorption on a Charged Phospholipid Polymer Interface, *Biomacromolecules*, 10, 267-274(2009).

[学会発表] (計40件)

- ① M. Takai et al., The Effect of Nanophase-separated Hydrophic-Hydrophobic Copolymers to Cell Adhesion Behavior, BMMP-11, Nagoya, Japan, 2011.1.26
- ② M. Takai et al., A novel high-sensitive immunoassay interface with orientation-controlled antibodies, Pacificchem 2010, Honolulu Hawaii, 2010.12.16
- ③ M. Takai et al., Microchip Immunoassay with 3D Nanostructured Phospholipids Polymer Biointerface, Micro-TAS 2009, Jeju, Korea, 2009.11.3
- ④ M. Takai et al., Initial cell attachment behavior on various response surfaces analyzed by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D), 16<sup>th</sup> Congress on European Society for Biomaterials, Lausanne, Switzerland, 2009.9.9
- ⑤ M. Takai et al., Microchip Analysis of Cellular Respiratory Activity on PDMS Membrane having Gas Permselective Property, Micro-TAS 2008, San Diego, USA, 2008.10.13

[図書] (計3件)

- ① 高井まどか (共著), NTS, バイオチップ 実用化ハンドブック (血液分析チップ), 2010, 共著, p.223-231
- ② 高井まどか (共著), 丸善, ソフトマター (細胞機能診断チップ), 2009, p.244-253
- ③ 高井まどか (共著), シーエムシー出版, 次世代医療のための高分子材料工学 (微量血液診断チップ), 2008, p.263-373