

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07893

研究課題名(和文)細胞培養技術への応用を指向した機能性ハイドロゲル薄膜の合成とその評価

研究課題名(英文) Synthesis and characterization of functional hydrogel thin films for cell culture application

研究代表者

笹井 泰志 (Sasai, Yasushi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60336633

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)：スルホベタインおよびホスホベタインタイプのメタクリル酸系双性イオン高分子ブラシを市販のポリスチレンシャーレ表面に合成し、超親水性の細胞非接着表面を構築した。その表面で進行するプラズマ誘起反応をESRおよびXPSにより解析した結果、プラズマ照射によるメタクリル酸系高分子の脱エステル化反応とそれに伴う主鎖切断反応の進行が示唆された。その知見を基に、細胞非接着性高分子ブラシ表面への所定の細孔径を有するマスクシートを介したプラズマ表面処理を実施し、選択的に細胞が集合する領域をアレイ状に配列することで、サイズが制御されたスフェロイド様の細胞塊が培養可能な機能性細胞培養基板表面を構築した。

研究成果の概要(英文)：Highly hydrophilic and non-cell adhesive polymer brush layer was fabricated on a commercial polystyrene dish by surface-initiated atom transfer radical polymerization of sulfobetaine- and phosphobetaine-type zwitterionic methacrylic monomers. Plasma surface treatment was effective to change surface properties of the polymer brushes as the results of plasma-induced reactions. ESR analysis suggested that tertiary end-chain radicals generated by polymer main-chain scission were mainly observed in polymer brushes by plasma-irradiation. In addition, XPS analysis indicated that plasma-irradiation caused rapid de-esterification of methacrylic polymer brushes. By patterning plasma-exposed area on non-cell adhesive zwitterionic methacrylic polymer brushes using a masking sheet, the specific areas which promote the formation of size-controlled spheroid-like cell aggregates were successfully prepared.

研究分野：薬品物理化学、高分子化学

キーワード：高分子ブラシ プラズマ化学 細胞培養 表面化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞培養材料の開発

培養細胞を利用した実験システムが創薬や環境評価の分野において欠かせないものになっている。また、近年、再生医療に大きな期待が寄せられており、多分化能を有する幹細胞に関連する研究が大変注目されている。このような背景から、効率的に細胞が培養でき、そして、培養細胞を有効に利用するためのより機能的な培養器材の開発も重要な研究課題の一つとなっている。

一般的な細胞培養法は、細胞培養器材表面において、細胞を単層に並べる方法である。その目的で使用される培養器材は、表面親水性処理したポリスチレンやその表面をポリリン等でコーティングしたものである。単層培養法は、その簡便さや培養細胞の評価のしやすさから、一般的な細胞培養法として生命科学の発展に大きな貢献をしてきた。一方、細胞は、生体の組織や器官において、細胞同士が3次元的に相互作用して機能している。その結果、近年、細胞の種類によっては、生体から取り出し2次元での単層培養に移すと生体内環境との違いのために、しばしば、生体内で認められる機能を発現していないことが分かってきた。そのような細胞種の場合、細胞が凝集塊を形成する3次元での培養により、*ex vivo* においても生体により近い微小環境が再現できていると考えられている。実際、生体で認められる機能の発現とその長期間維持に有利である。

そこで細胞塊の大きさを制御しつつ、3次元での細胞培養を可能にする培養材料の開発は、再生医療などの培養細胞利用技術の発展に重要であると考えられる。

(2) 高分子ブラシを利用した表面修飾

材料表面に高密度で高分子鎖層を導入した高分子ブラシは、数十 nm 程度もしくはそれ未満の超薄膜でも材料表面の物性を劇的に変化させることから、その合成法は各種材料の優れた表面改質法として注目されている。その表面物性は、ブラシを構成する高分子の構造だけでなく、高密度の高分子鎖層に起因する排除体積効果にも起因することが知られている。特に、各種親水性高分子のブラシは、材料表面へのタンパク質など生体由来成分の吸着を強く抑制することから、生体成分と接触するバイオマテリアルの表面改質への応用が積極的に検討されている。

高分子ブラシの合成法はいくつかあるが、精密重合法を用い、材料表面から重合速度を制御しつつ、高分子鎖を伸長させる方法がもっとも効果的である。我々は、これまでに、細胞培養器材として最も一般的なポリスチレンシャーレの表面から精密ラジカル重合法である原子移動ラジカル重合(ATRP)を用いたポリアクリル酸の高分子ブラシの合成について報告している(引用文献)。得られた高分子ブラシは吸水によりハイドロゲル薄膜層を形成し、細胞の接着を強く抑制し

た。

(3) プラズマ表面処理

弱電理気体であるプラズマに曝された高分子表面では、化学結合の切断に伴い、ラジカルが生成する。また、その生成ラジカルの反応によって、酸素含有官能基が導入されたり、架橋反応が進行したりするため、プラズマ表面処理は、高分子材料表面の物性改質によく用いられている。プラズマ表面処理の効果は、プラズマに曝された表面のみで得られるので、フォトマスクを介したプラズマ処理では、マスクのデザインを反映したパターンニング表面が得られる。

以上の背景より、高分子ブラシ表面にプラズマ表面処理のパターンニングを施すことで、細胞非接着性ハイドロゲル薄膜層のパターンニングを行うことができ、材料表面での細胞集合部位を制御し、アレイ状に細胞塊を配列、培養可能な表面の調製が可能と考え、本研究を企図した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ポリスチレン基板表面の機能化によるサイズが制御された3次元細胞凝集体の培養を可能にする機能性細胞培養器材の開発である。その達成のために、ポリスチレン基板表面での細胞非接着性を有する高分子ブラシからなるハイドロゲル薄膜の合成、および、その表面のプラズマ処理加工により、アレイ状に細胞が受動的に集合し、3次元で培養可能なパターンニングについて検討を行う。

3. 研究の方法

高分子ブラシは、ポリスチレン基板、シリコン基板、および、シリカ粒子表面から双性イオン構造を有するビニルモノマー[2-(methacryloyloxyethyl)dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide) (MEDSAH)、および 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) の ATRP により合成した。シリコン基板表面での高分子ブラシの膜厚は光干渉膜厚計により測定した。

プラズマ表面処理は、放電ガスにアルゴンガスを用い、13.56 MHz の高周波電源装置を用いた誘導結合方式により実施した。プラズマ表面処理による高分子ブラシの構造変化は、X線光電子分光法(XPS)により評価し、親水性の変化は水接触角測定により評価した。その他、ウシ血清由来のタンパク質吸着特性の評価、および、HepG2 を用いた細胞培養試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 双性イオン高分子ブラシの合成

基板として用いた各材料表面を既報の方法に従い、ATRP 開始剤で修飾後、MEDSAH および MPC の ATRP を実施し、polyMEDSAH (PMEDSAH) および polyMPC (PMPC) の高分子ブラシを合成した。得られた表面の

XPS 分析により、各高分子ブラシ層が構築されていることを定性的に確認した。5 時間の ATRP により、シリコン基板上に形成された高分子ブラシの厚さは、PMEDSAH が 86.5 ± 1.7 nm、PMPC については、 67.4 ± 5.6 nm であった。また、水接触角は、ATRP 開始剤で修飾したシリコン基板が $64.3 \pm 0.4^\circ$ であったのに対し、PMEDSAH および PMPC ブラシで修飾後は、それぞれ、 $9.6 \pm 0.4^\circ$ 、および、 $11.1 \pm 0.6^\circ$ まで低下した。このような 10° 程度の低い水接触角は、測定時、滴下した水滴が速やかに表面で薄く広がる状態であり、両高分子ブラシ表面が超親水性であることを示している。

(2) 高分子ブラシのプラズマ反応特性

高分子ブラシのプラズマ表面処理により進行する反応の化学的知見を得る目的で、各高分子ブラシを合成したシリカ粒子表面へのアルゴンプラズマ照射を実施し、その電子スピン共鳴スペクトル (ESR) 測定により、観測されるラジカルの構造およびラジカルの生成挙動、また、プラズマ照射後の残存高分子量を熱重量分析 (TGA) により評価し、高分子の分解挙動を評価した。(図 1) なお、ここでは、比較の目的で ESR によるプラズマ誘起ラジカルの詳細な構造解析が報告されている poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) の高分子ブラシにおいても同様に評価した。

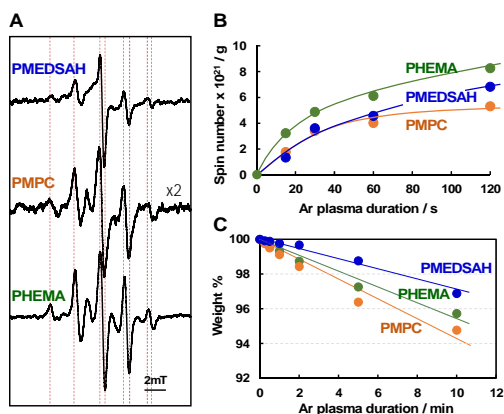


図 1 シリカ粒子表面の高分子ブラシのプラズマ反応特性:(A) 60 秒間アルゴンプラズマ照射高分子ブラシの ESR スペクトル、(B) プラズマ照射時間による観測ラジカル量の経時変化、(C) プラズマ照射時間による高分子ブラシ重量の経時変化

図 1A に示すように、PMEDSAH と PMPC ブラシへのプラズマ照射で観測された ESR スペクトルは見かけ上異なるが、PHEMA と同様の特徴を有するスペクトル外形であった。したがって、両高分子へのプラズマ照射により主に観測されるラジカルは、PHEMA と同様、脱エステル化反応後、逐次的に進行する主鎖切断反応により生成する 3 級炭素ラジカルであることが示唆された。スペクトル外形の違いは、両高分子のエステル側鎖の

構造により、異なる表面反応を誘起している可能性を示唆している。一方、図 1B および図 1C より、プラズマ照射時間によるラジカルの生成および高分子の分解は、PMEDSAH と PMPC で同様の挙動を示した。

以上より、PMEDSAH と PMPC 高分子ブラシへのアルゴンプラズマ照射では、脱エステル化反応とその後の主鎖切断反応の進行が示唆された。なお、両高分子のプラズマ照射に伴う脱エステル化反応の進行は XPS 分析結果も支持するものであった。

(3) プラズマ表面処理が高分子ブラシの細胞接着性に与える影響

高分子ブラシ表面への細胞接着性を HepG2 細胞を用いて評価した。図 2 は、HepG2 細胞を播種後、24 時間経過してから、高分子ブラシ修飾ポリスチレンシャーレ表面に接着した細胞数を市販の細胞培養用ポリスチレンシャーレ (TCPS) 表面に接着した細胞数の相対値としてまとめたものである。また、高分子ブラシにプラズマ照射したときの細胞接着性におけるプラズマ照射時間の効果も示している。

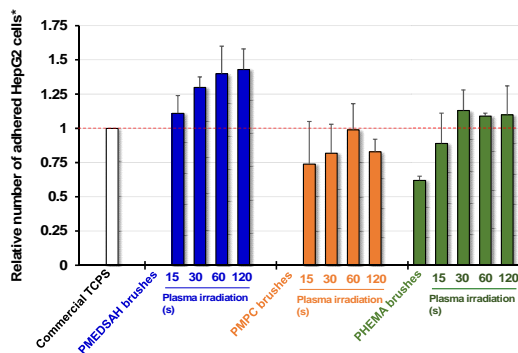


図 2 各高分子ブラシへの細胞接着性におけるプラズマ表面処理の影響

図 2 に示す通り、PMEDSAH および PMPC ブラシ表面における細胞の接着は検出されなかった。比較の目的で同様に検討した PHEMA 表面では、TCPS の約 65% の細胞接着が認められたことを考えると、図 2 の結果は、PMEDSAH および PMPC の分子構造に起因するものと示唆される。PMEDSAH および PMPC の双性イオン構造を有するエステル側鎖はカチオンとアニオンが分子内塩を形成し、高度に水和されるとともに、高密度ブラシの効果による排除体積効果でタンパク質の吸着を強く抑制する。その結果、細胞接着の足場となる血清成分のブラシ表面への吸着が抑制され、細胞の接着を不可能にしていると考えられる。一方、その表面にプラズマ表面処理を実施すると 15 秒間以上のプラズマ照射により、PMPC ブラシでは TCPS と同等まで細胞接着性が回復した。また、興味深いことに、PMEDSAH ブラシ表面では、プラズマ照射により TCPS より接着細胞数が増大した。この結果については、プラズマ照射 PMEDSAH ブラシ表面が細胞接着、または、

細胞増殖、あるいはその両方を促進している可能性があり、その詳細は現在検討中であるが、前項で示唆された PMEDSAH と PMPC のわずかなプラズマ反応特性の違いが影響しているものと考えられる。なお、この細胞接着性の結果は、ウシ血清由来のタンパク質の吸着性と良い相関を示した。

(4) 高分子ブラシのパターニングとその表面での細胞培養実験

これまでの結果より、双性イオン高分子ブラシ表面では、高度に水和されたハイドロゲル薄膜層の形成とその排除体積効果により、血清成分の吸着、細胞の接着が強く抑制されることを明らかにした。また、その表面へのプラズマ照射では、双性イオンエステル側鎖の分解に伴い、細胞接着抑制効果を減少・消失させることが可能であった。そこで、図3Aのように、高分子ブラシ表面に細孔を配列させたマスクシートを介してプラズマ表面処理を実施し、ポリスチレン細胞培養器材表面に細胞接着領域と非接着領域のパターニングを試みた。

図3Bは、図3Aに従い、PMEDSAH ブラシ表面に直径 200 μm のプラズマ照射領域をパターニングした表面に HepG2 を播種し、5日間培養後に撮影した写真を示している。細胞はプラズマ照射領域のみに集合し、直径 200 μm の3次元の細胞集合塊を形成した。5日までの経過を観察したところ、播種した細胞は、培養初期からプラズマ照射領域に選択的に集合し、増殖も伴いながらスフェロイド様の細胞集合塊を形成した。これは、非プラズマ照射領域では、細胞培養環境下、高分子ブラシが高度に水和し、膨潤するのに対し、プラズマ照射領域では、高分子ブラシが側鎖の分解により水和能が低下するため膨潤度が大きく減少する結果、プラズマ暴露部位では、非プラズマ領域の膨潤した高分子ブラシ層に囲まれた微小空間が形成され、播種した細胞が受動的に集合した状態で培養されるためと考えられる。また、得られた細胞塊は、2週間以上、サイズを維持した状態で培養可能であった。

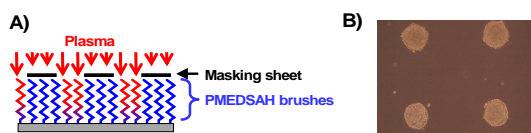


図3 (A) 高分子ブラシ表面におけるプラズマ照射領域のパターニング、(B) HepG2 細胞の5日間培養後の写真

以上の結果より、本研究では、高分子ブラシのプラズマ反応特性を利用したアレイ状3次元細胞培養を可能とする簡便な機能性細胞培養表面の構築法を確立した。今後、培養した細胞の機能評価も行うことで、機能性細胞培養器材としての適性を明らかにしていきたい。

<引用文献>

Y. Sasai, A. Komatsu, S. Kondo, et al., Fabrication of hydrophilic polymer brushes on polystyrene substrate by plasma-based surface functionalization, J. Photopolym. Sci. Technol., 25, 2012, 551-554

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Yasushi Sasai, Hiroshi Kanno, Naoki Doi, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Shin-ichi Kondo, Synthesis and Characterization of Highly Stabilized Polyme-Trypsin Conjugates with Autolysis Resistance, Catalysis, 査読有, 7, 2016, 4/1-4/10
DOI: 10.3390/catal7010004

〔学会発表〕(計 6件)

笹井泰志、中牟田浩平、平松千秋、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一、メタクリル酸系双性イオン高分子ブラシの合成とその生体適合性および安定性の評価、日本薬学会第138年会、2018年3月28日、TKP金沢カンファレンスセンター(石川・金沢)

笹井泰志、中牟田浩平、平松千秋、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一、Plasma-induced Surface Reactions on Methacrylic Polymer Brushes、第27回日本MRS年次大会、2017年12月6日、横浜情報文化センター(横浜・神奈川)

笹井泰志、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一、Synthesis and Characterization of Thermo-Responsive Polymer-Trypsin Conjugates、IUMRS-ICAM 2017: The 15th International Conference on Advanced Materials、2017年8月30日、京都大学(京都)

笹井泰志、中牟田浩平、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一、生体適合性メタクリル酸系高分子のプラズマ誘起反応におけるエステル基の効果、第34回国際フォトポリマーカンファレンス、2018年6月28日、幕張メッセ(千葉)

笹井泰志、土井直樹、近藤伸一、Polymer-enzyme conjugate strategy for improving stability and performance、EMN Meeting on Polymer 2017、2017年3月15日、オークランド(ニュージーランド)

笹井泰志、土井直樹、山内行玄、葛谷昌之、近藤伸一、Fabrication of zwitterionic polymer brush surfaces on polystyrene substrate via surface-initiated ATRP and their functionalization by plasma techniques、The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016)、2016年12月15日、福岡国際会議場(福岡)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 泰志 (SASAI, Yasushi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60336633

(2) 研究分担者

山内 行玄 (YAMAUCHI, Yukinori)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：10461378

(3) 連携研究者

近藤 伸一 (KONDO, Shin-ichi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90240944