

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20360018

研究課題名 (和文) 負イオンパターン注入による基材表面での成体幹細胞の配列・細胞体形状制御と分化誘導

研究課題名 (英文) Control of Orientation and Shape of Adult Stem Cell on Base Surface by Negative-Ion Pattern Implantation and Induction of The Differentiation

研究代表者

辻 博司 (TSUJI HIROSHI)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20127103

研究成果の概要 (和文) : 炭素負イオンを高分子材料にパターン注入することにより、ラット骨髄由来の間葉系幹細胞を注入パターンに沿った自発的な配列接着を形成した。また、パターン配列を保持したままで神経細胞や骨芽細胞に分化することに成功した。パターン幅を狭くすることにより、細胞体形状の伸長方法や細胞核の長軸方向を配列することができた。また、ポリ乳酸に炭素や酸素負イオンを注入することにより、細胞が接着した細胞シートや細胞ストリングを形成した。更に、ガラス上でもプラズマ処理と負イオンパターン注入処理により、幹細胞の配列接着を実現した。

研究成果の概要 (英文) : Mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone-marrow of rat showed their self-aligned adhesion on polymer surfaces along the modified line-region in which carbon negative-ions were implanted through line-pattern mask for improving hydrophilicity. Besides, the adhered cells were differentiated into nerve cells and osteoblast cells with holding their adhesion pattern. By narrowing the width of the line pattern, the orientation of MSC cell body and nuclei were controlled to along with the long direction of the line pattern of the ion implantation. Cell sheet and string were formed by using C and O negative ion implantation into poly-lactic acid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学工学基礎・薄膜 表面界面物性

キーワード：負イオン注入、表面改質、細胞親和性、間葉系幹細胞、神経回路網、細胞チップ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究担当者らは、これまで負イオンを高分子材料に注入することにより、細胞接着性が向上することを見出しており、血管内皮細胞や神経様細胞の PC-12h 細胞、更には間葉系幹細胞の接着性向上を確かめている。

(2) 神経再生用シリコンガイドチューブの内壁に炭素負イオン注入を行うことにより、ラット坐骨神経の再生が未注入材料に比べて、150%と優れており、生体内部でも安定かつ正常に利用できることを証明した。

(3) その過程で、狭い線幅で負イオンを注入

した場合、注入長手方向に細胞体が伸展することを発見した。

## 2. 研究の目的

(1) 各種高分子材料に負イオンパターン注入を行い、間葉系幹細胞のパターン接着を形成する。そして、神経細胞への分化を誘導し、人為的な神経回路網を形成する。

(2) 負イオンのパターン注入に於いて、ラインパターンの線幅と細胞体や細胞核の配向性を調べて、細胞の配向性の制御技術を開発する。

(3) 負イオン注入パターンで接着した細胞を剥離して、細胞チップとして細胞シートや細胞ストリングを得る。

## 3. 研究の方法

(1) ポリスチレン、シリコンラバー、テフロンシート、ポリ乳酸などの高分子材料に炭素負イオンを注入する。注入エネルギーは5-30 keV、注入量は $1 \times 10^{13} - 1 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>とした。表面物性評価用にはマスク無しで注入し、細胞培養用には幅50  $\mu$ mで長さ5mmのラインが多数あるマイクロパターンマスクを介して注入した。

(2) 表面物性評価では、注入した面の濡れ性として水中における水の接触角を気泡法で測定した。また、親水化の要因をX線誘起光電子分光により導入官能基を測定した。

(3) 負イオン注入した試料を滅菌して、その上でラット骨髄の間葉系幹細胞を播種し、有血清培地を加えてインキュベータで培養した。そして、培養1日、3日後に、培養細胞の状態を位相差顕微鏡で観察して、パターン接着特性や配向性を測定した。

(4) 神経細胞への分化誘導は、 $\beta$ メルカプトエタノールを刺激剤とした方法を用い、分化後の様子を位相差顕微鏡で観察した。分化結果は神経特異エノラーゼの検出で行った。

(5) 細胞核は、蛍光抗体法でDAPI染色を行い、蛍光顕微鏡で観測して測定した。

(6) 細胞チップ作製では、種々の条件で負イオン注入を行ったテフロンやポリ乳酸から細胞チップやストリングの摘出を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 負イオン注入による親水性向上

炭素負イオンを注入したポリスチレン、シリコン、テフロンはいずれも水の接触角が未注入に比べて大きく低下し、親水性化を示した。接触角では、ポリスチレンは86°から66°、シリコンは90°から54°、テフロンでは90°から64°

と低下した。この親水化は表面に酸素の有極性官能基が導入されたためであることがXPS分析から判明した。親水化の注入条件は10 keV、 $1-3 \times 10^{15}$  ions/cm<sup>2</sup>が最適であった。また、培地に浸漬した注入試料ではタンパク質の吸着が増加していることもXPS N1s面分析で判明した。

(2) 間葉系幹細胞のパター接着

幅50  $\mu$ mのラインパターンで炭素負イオンを注入したポリスチレンやシリコン、テフロンでは、間葉系幹細胞は注入領域に選択的、自発的に接着した。また、注入長手方向への配向性を示した。図1と図2にシリコンおよびテフロン上で培養した接着間葉系幹細胞の例を示す。

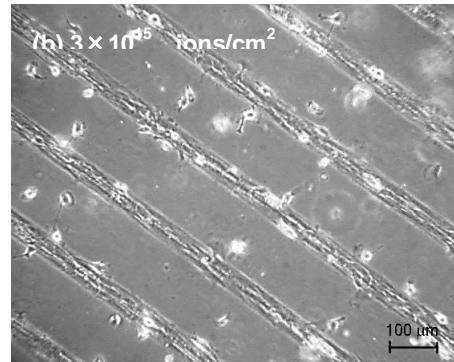


図1 炭素負イオンパターン注入シリコン上で培養した接着間葉系幹細胞の培養結果

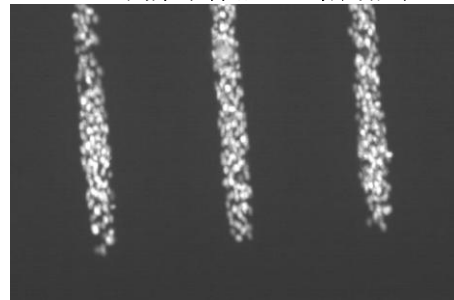


図2 炭素負イオンパターン注入テフロン上で培養した接着間葉系幹細胞の細胞核

(3) パターン配列接着した間葉系幹細胞の分化  
50  $\mu$ m幅のラインパターンで配列接着した間葉系幹細胞を分化誘導した。ポリスチレン上での分化前後の様子を図3(a)と(b)に示す。

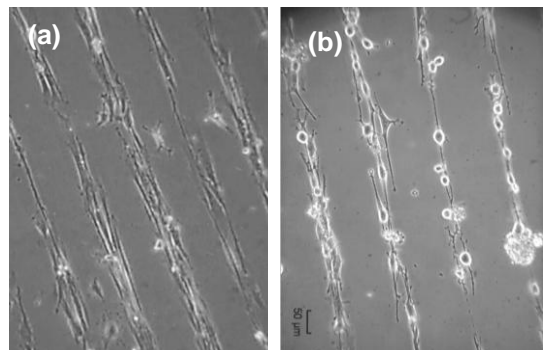


図3 ポリスチレン上で配列接着した間葉系幹細胞の分化前(a)と分化後(b)

分化前ではアメーバ状携帯の細胞体は注入方向に細長く伸展していたが、分化後は、丸い細胞体と細長いフィラメントの形態でニューロンに似た形となった。分化後に蛍光抗体法で神経特異エノラーゼ NSE の検出を行った。一例を図4に示す。NSE は細胞体や補足伸展したフィラメント、つまり、細胞全体に NSE が発現しており、分化細胞は神経細胞であることが判る。

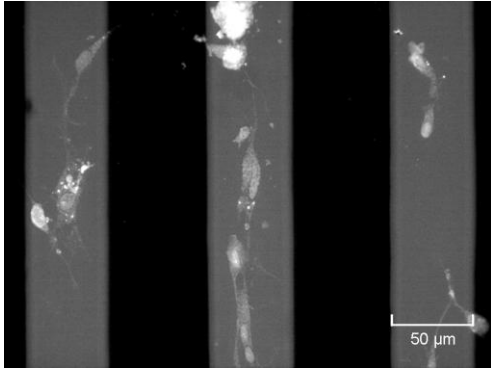


図4 神経特異エノラーゼの検出

(4) 単一細胞の接着制御

パターン幅を  $50\mu\text{m}$  から狭くした場合の接着を調べた。図5に用いたパターンマスクを、また最も細い注入部分に接着した間葉系幹細胞の写真を図6に示す。

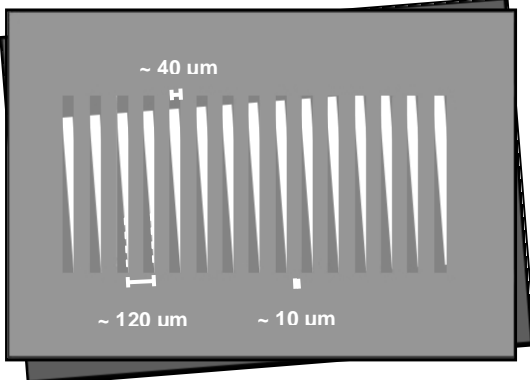


図5 楔形状の注入マスク

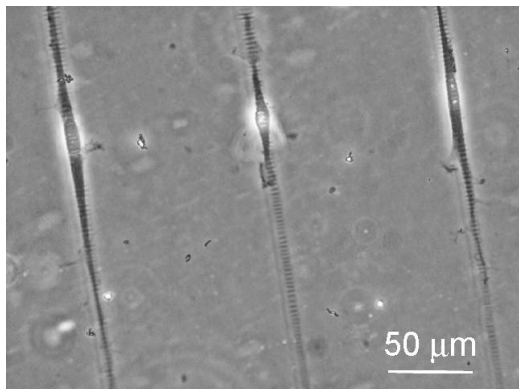


図6 最先端に接着した間葉系幹細胞

細胞体は  $1\mu\text{m}$  以下の最も狭い線幅領域まで伸展しているが、細胞核は線幅  $3\mu\text{m}$  で接着して

いることが判る。これよりも広い幅のパターンでは複数の細胞がほぼ同じ部位に接着していた。図7にパターン幅による接着細胞のヒストグラムを示す。1個の細胞接着は  $3\mu\text{m}$  からあるが、適した注入線幅は  $8\mu\text{m}$  と言える。

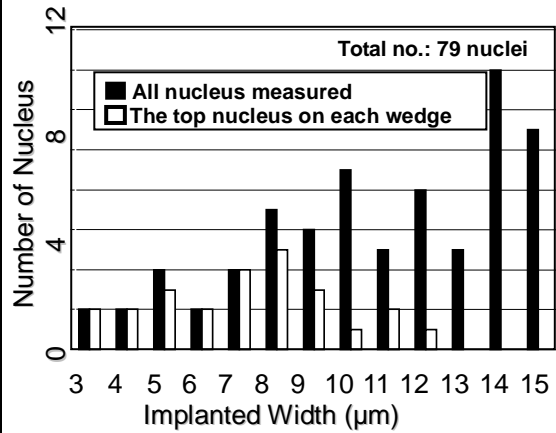


図7 注入線幅と接着した細胞数の関係

(5) 細胞体と細胞核の配向性制御

細胞体が注入ラインに沿って細長く伸展し、配向性を示すことは  $50\mu\text{m}$  幅でもあきらかであることは図1、図2、図4、図6から判る。

種々の線幅注入における細胞核を図8に示す。線幅が狭くなると、楕円形の細胞核は注入方向にその長軸を配向させていることが判る。また、長軸とライン長手方向との角度を測定して、 $10^\circ$  以下の細胞数を評価した表1に示す。

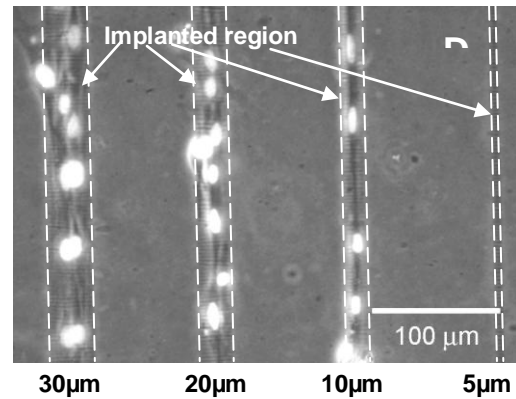


図8 各種の線幅における細胞核の様子

表1 細胞核が成す角度が  $10^\circ$  以下の細胞数と線幅の関係

Line-width ( $\mu\text{m}$ )	Percentage at $0 - 10^\circ$	Remark
50+5 (control)	28 %	- Cluster of nucleus
40+5	45 %	- Cluster of nucleus
30+5	46 %	"
20+5	55 %	"
10+5	79 %	- Alignment of one nuclei
5+5	50 %	- Rarely adhesion

線幅が  $10\ \mu\text{m}$  以下の領域では80%以上の細胞が細胞核の方向を揃えており、配向性制御ができることが判る。

#### (6) 細胞チップの形成

ポリ乳酸に幅  $50\ \mu\text{m}$  のラインパターンで炭素負イオンを  $15\ \text{keV}$  で注入し、間葉系幹細胞を培養した結果を図9に示す。培養1日目から細胞が接着した注入部分が剥離し始めた。2mm 四方の格子パターンで注入した結果を図10に示す。そして、摘出した太さが  $0.3\ \text{mm}$  程度で長さ  $5\ \text{mm}$  の細胞ストリングを図11に示す。



図9 幅  $50\ \mu\text{m}$  の細胞が接着したポリ乳酸

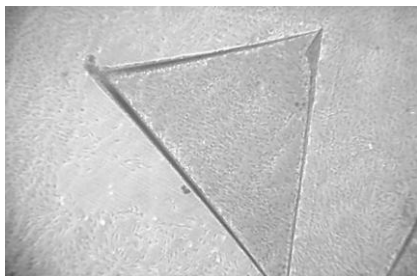


図10 正方形に細胞が接着したポリ乳酸片

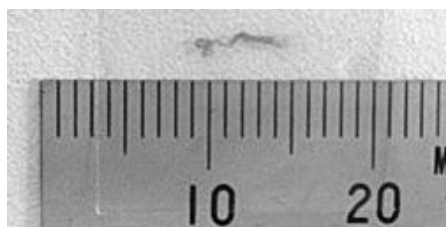


図11 摘出した細胞ストリング

なお、テフロンへの注入条件を変えて行った細胞剥離試験では、細胞はバラバラになり、細胞集合体として剥離することは出来なかった

以上、ポリ乳酸に炭素負イオンを注入しても同様な細胞接着した細胞チップの取り出しができることが判明した。

#### 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 H. Tsuji, P. Sommani, Y. Hayashi, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh, G.H. Takaoka, J.

Ishikawa, “Surface Modification of Silica Glass by  $\text{CHF}_3$  Plasma Treatment and Carbon Negative-Ion Implantation for Cell Pattern Adhesion”, Surface and Coatings Technology 査読有, (to be published in 2011)

- ② P. Sommani, H. Tsuji, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh, and J. Ishikawa, “Line-Width of Ion Beam-Modified Polystyrene by Negative Carbon Ions for Fine Adhesion Pattern of Mesenchymal Stem Cells”, Surface and Coatings Technology, 査読有, (to be published in 2011)
- ③ P. Sommani, H. Tsuji, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa, “Irradiation effect of carbon negative-ion implantation on polytetrafluoroethylene for controlling cell-adhesion property”, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 査読有, Vol. B 268, 2010, 3231-3234.
- ④ J. Ishikawa, H. Tsuji, and Y. Gotoh, “Surface Modification by Negative-Ion Implantation”, Surface and Coatings Technology 査読有, Vol. 203, 2009, 2351-2356.
- ⑤ H. Tsuji, P. Sommani, M. Hattori, T. Yamada, H. Sato, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Negative Ion Implantation for Patterning Mesenchymal Stem Cell Adhesion on Silicone Rubber and Differentiation into Nerve Cells with Preserving Their Adhesion Pattern”, Surface and Coatings Technology 査読有, Vol. 203, 2009, 2562-2565.
- ⑥ P. Sommani, G. Ichihashi, H. Ryuto, H. Tsuji, Y. Gotoh, G.H. Takaoka, “Surface Modification of Silicone Rubber for Adhesion Patterning of Mesenchymal Stem Cells by Water Cluster Ion Beam” Ion Implantation 2010, (Eds: J. Matsuo, M. Kase, T. Aoki, and T. Seki, American Institute of Physics, 2010), 査読有, Vol. IIT2010, 2010, pp. 302-305.
- ⑦ H. Tsuji, P. Sommani, M. Hattori, T. Yamada, H. Sato, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Adhesion Patterning of Mesenchymal Stem Cells on Polystyrene Surface by Carbon Negative-Ion Implantation and Neuron Differentiation on the Position”, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research 査読有, Vol. B 266, 2008, 3067-3070 .

[学会発表] (計 39 件)

- ① H. Tsuji, “Ion Patterned Adhesion for Neuron Network Synthesis”, European Material Research Society Spring Meeting, E-MRS 2011, B4-1(Invited) May 10, 2011, Nice,

- France
- ② P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa and G.H. Takaoka, “Osteoblast Patterning on Silicone Rubber by using Mesenchymal Stem Cells and Carbon Negative-Ion”, 21st International Academic Symposium of Materials Research Society of Japan, MRS-J2010, S-12-G, Dec. 22, 2010, Yokohama, Japan.
  - ③ H. Tsuji, P. Sommani, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa, G.H. Takaoka, “Pattern modification of polymer surface by negative ion beam for neuron network formation”, International Negative Ion Beam Symposium, NIBS2010, O-42, Nov. 18, 2010, Takayama, Japan.
  - ④ H. Tsuji, P. Sommani, T. Yamada, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh, and J. Ishikawa, “Ion Beam Modification of Polymers for Self-Aligned Adhesion of Mesenchymal Stem Cells and Control of Nuclei Orientation”, 10th European Conference on Accelerators in Applied Research and Technology, ECAART 10, PI-14, Sept. 13, 2010, Grifada, Greek.
  - ⑤ H. Tsuji, P. Sommani, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa and G.H. Takaoka, “Negative-ion beam degradation of proteins for adhesion patterning of brain neuronal cells”, 17th International Conference on Ion Beam Modification of Materials, IBMM2010, #336, August 24, 2010, Montreal, Canada.
  - ⑥ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, T. Yamada, H. Kojima, Y. Gotoh, J. Ishikawa, “Negative- ion beam modified polymeric surfaces for controls of individual cell arrangement and cell-nucleus orientation”, 17th International Conference on Ion Beam Modification of Materials, IBMM2010, #455, August 24, 2010, Montreal, Canada.
  - ⑦ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa, and G.H. Takaoka, “Surface Modification of Silicone Rubber for Adhesion Patterning of Mesenchymal Stem Cells by Water Cluster Ion Beam”, 18th International Conference on Ion Implantation Technology, IIT2010, P2-58, June 7, 2010, Kyoto, Japan,.
  - ⑧ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa and G.H. Takaoka, “Carbon Negative-Ion Implantation for Positive-Pattern of Avidin on Polystyrene”, 20th International Academic Symposium of MRS-J2009, R-17-G,, Dec. 9, 2009, Yokohama, Japan
  - ⑨ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa and G.H. Takaoka, “Cell Adhesion Patterning on Polystyrene by Using Avidin Coating and Carbon Negative-Ion Implantation”, 20th International Academic Symposium of MRS-J2009, R-P05-G, Dec. 8, 2009, Yokohama, Japan
  - ⑩ H. Tsuji, P. Sommani, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa and G.H. Takaoka, “Degradation of Proteins for Neuronal-Cell-Adhesion Patterning by Carbon Negative-Ion Implantation”, 20th International Academic Symposium of MRS-J2009, R-P06, Dec. 8, 2009, Yokohama, Japan
  - ⑪ H. Tsuji, P. Sommani, Y. Hayashi, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh, G.H. Takaoka and J. Ishikawa, “Surface Modification of Silica Glass by CHF<sub>3</sub> Plasma Treatment and Carbon Negative-Ion Implantation for Cell Pattern Adhesion”, 16th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beam, SMMIB 2009, PC-06, Sept 16, Tokyo, Japan
  - ⑫ P. Sommani, H. Tsuji, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh, and J. Ishikawa, “Line-Width of Ion Beam-Modified Polystyrene by Negative Carbon Ions for Fine Adhesion Pattern of Mesenchymal Stem Cells”, 16th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beam, SMMIB2009, PC-13, Sept 16, 2009, Tokyo, Japan.
  - ⑬ H. Tsuji, P. Sommani, T. Yamada, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Carbon Negative-Ion Implantation on Silicone Rubber with Narrower Line Width for Pattern Adhesion of Mesenchymal Stem Cells and Control of Nuclei Orientation”, 15th International Conference on Radiation Effects in Insulators, REI-15, C20, Sept. 3, 2009, Padova, Italy
  - ⑭ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, T. Yamada, H. Kojima, Y. Gotoh, J. Ishikawa, “Radiation Effect of Carbon Negative-Ion Implantation on Polytetrafluoroethylene for Controlling Cell-Adhesion Property”, 15th International Conference on Radiation Effects in Insulators, REI-15, C22, Sept. 3, 2009, Padova, Italy.
  - ⑮ H. Tsuji, “Adhesion Patterning of Mesenchymal Stem Cells on Silicone Rubber by Carbon Negative-Ion Implantation for Artificial Nerve-Cell Network Formation” (invited talk), Huntsville Ion Beam Institute, HIBI2009, July 14, Huntsville, AL USA.

- ①⑥ H. Tsuji, P. Sommani, H. Kojima, Y. Hayashi, H. Sato, Y. Gotoh, J. Ishikawa and G.H. Takaoka, “Minimum Line-Width on Silicone Rubber Modified by Carbon Negative-Ion Implantation for Self-Aligned Adhesion of Mesenchymal Stem Cells and Orientation Control of Nucleus”, 2nd Asian Biomaterials Congress 2009 in conjunction with IUMRS-ICA2009, ABMC-1-06P, June 26, 2009, Singapore.
- ①⑦ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, T. Yamada, H. Yamada, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Mesenchymal Stem Cell Patterning and Its Differentiation into Neuron on Silicone Rubber Modified by Carbon Negative-Ion Implantation”, 2nd Asian Biomaterials Congress 2009 in conjunction with IUMRS-ICA2009, ABMC-1-07P, June 26, 2009, Singapore
- ①⑧ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, H. Kojima, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Nuclei Orientation of Mesenchymal Stem Cells on Narrow Regions of Silicone Rubber Modified by Carbon Negative-Ion Implantation”, IUMRS International Conference in Asia 2008, IUMRS-ICA2008, MO-3, Dec. 10, 2008, Nagoya, Japan.
- ①⑨ H Tsuji, P Sommani, T Yamada, H Kojima, H Sato, Y Gotoh, and o Ishikawa, “Comparison of Implantation Conditions of Carbon Negative Ions for Pattern Adhesion of Mesenchymal Stem Cells on Polymeric Surfaces”, IUMRS International Conference in Asia 2008, IUMRS-ICA2008, MP-3, Dec. 10, 2008, Nagoya, Japan.
- ②⑩ H. Tsuji, P. Sommani, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Effect of Decreasing Line-Width in Carbon Negative-Ion Pattern- Implantation into Polystyrene Surface upon Adhesion of Mesenchymal Stem Cells”, 4th Vacuum and Surface Sciences Conference of Asia and Australia, VASSCAA-4, 28P100, Oct. 28, 2008, Matsue, Japan.
- ②⑪ P. Sommani, H. Tsuji, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh, and J. Ishikawa, “C<sup>-</sup>-implantation for Avidin Patterning on Polystyrene”, The 4th Vacuum and Surface Sciences Conference of Asia and Australia, VASSCAA-4, 28P099, , Oct. 28, 2008, Matsue, Japan.
- ②⑫ H. Tsuji, P. Sommani, T. Yamada, H. Kojima, H. Sato, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Modified Minimum Line-Width in Carbon Negative-Ion Implantation for Self-Aligned Adhesion of Mesenchymal Stem Cells on Silicone Rubber and Orientation Control of Nucleus”, 16th International Conference on Ion Beam Modification of Materials, IBMM 08, PB14-03, Sept. 3, 2008, Dresden, Germany.
- ②⑬ P. Sommani, H. Tsuji, H. Sato, T. Yamada, H. Kojima, Y. Gotoh and J. Ishikawa, “Negative-Ion Beam Modified Silicone Rubber for Patterning Adhesions of Mesenchymal Stem Cell and Its Differentiated Neurons”, 16th International Conference on Ion Beam Modification of Materials, IBMM08, PB14-04, Sept. 3, 2008, Dresden, Germany.
- ②⑭ J. Ishikawa, “Principal Concepts in Development of Ion Sources in Kyoto University (invited)”, 9th International Conference on Applications of Nuclear Techniques, CRETE08, , June 12, 2008 , Crete, Greek.
- ②⑮ H. Tsuji, P. Sommani, M. Hattori, T. Yamada, H. Sato, Y. Gotoh, and J. Ishikawa, “Neuron Arrangement on Silicone Rubber by Using Differentiation from Mesenchymal Stem Cells and Carbon Negative-Ion Implantation”, 9th International Conference on Applications of Nuclear Techniques, CRETE08, June 12, 2008, Crete, Greek.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

辻 博司(TSUJI HIROSHI)  
京都大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号:20127103

### (2)研究分担者

石川 順三 (ISHIKAWA JUNZO)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号:80026278  
(H21→H22:退職により分担者から除外)  
高岡 義寛(TAKAOKA GIKAN)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号:90135525  
(H21～H22:研究分担者)  
佐藤 弘子(SATO HIROKO)  
京都大学・大学院工学研究科・研究員  
研究者番号:00093345  
ソムニ ピヤヌット(SOMMNI PIYANUCH)  
京都大学・大学院工学研究科・研究員  
研究者番号:40512968

### (3)連携研究者

無し