

機関番号：32653

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700493

研究課題名（和文） 温度応答性ナノ相分離表面の創製と細胞の接脱着制御に関する基礎研究

研究課題名（英文） Creation of thermoresponsive nano-phase separated surfaces for cell adhesion and detachment

研究代表者

中山 正道 (NAKAYAMA MASAMICHI)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00338980

研究成果の概要（和文）：

温度応答性ブロック共重合体を基板表面に被覆することで、細胞の接着・脱着制御することが可能な温度応答性表面の作製について検討した。コーティング層の高分子量、膜厚および温度応答性高分子の鎖長は細胞の接着・脱着制御に重要な因子であることが明らかとなった。これらの因子を最適化することで、培養皿一面に培養した細胞を温度応答性高分子の相転移温度以下の温度で低温処理することで、シート状の組織として回収することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

This study focused on the fabrication of thermoresponsive cell culture surfaces through the deposition of thermoresponsive block copolymers on solid surfaces for thermally regulated cell adhesion and detachment. Grafted polymer amounts, thickness, and the chain length of thermoresponsive polymers significantly affected the temperature-controlled cell adhesion/detachment. By optimizing these factors, confluent cultured cells were successfully harvested as sheet-like cellular architectures by reducing temperatures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医用生体材料

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：温度応答性高分子，ブロックコポリマー，RAFT 重合，細胞コーティング，組織工学，ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）

1. 研究開始当初の背景

（1）研究代表者のグループは、水中で 32℃ に下限臨界溶液温度（LCST）を有する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）を基板表面に 10～30nm の超薄膜状態で化学固定することに成功し、表面の疎水性/親水性変化を温度で制御する

技術を確立した。このインテリジェント表面を用いて、一面に培養した細胞を非侵襲的にシート状に回収する技術「細胞シート工学」を世界に先駆けて実現した。しかしながら、従来の温度応答性表面の作製には電子線照射技術を利用するために、高分子の固定先である基材の材質や形状などに制約が存在す

る。このため、より簡便でかつ、基材の材質・形状に依存しない新しいインテリジェント表面の作製技術の開発が望まれている。

(2) 親水性/疎水性や結晶性/非晶性といった不均質な性質をそれぞれもつブロックコポリマーから形成されるナノ相分離構造表面は、血液の細胞成分である血小板の粘着を制御することで高い抗血栓性を発現し、人工血管をはじめとする医療材料の表面修飾技術としてこれまでに広く適用されてきている。

(3) 近年のリビングラジカル重合法の発展により、さまざまな特性を有するラジカル重合性モノマーから分子量制御されたブロック共重合体を合成することが容易になってきている。この技術を利用することで、機能性高分子鎖を有する分子量制御されたブロック共重合体を調製し、外部からの物理刺激により表面特性が変化するインテリジェント型のナノ相分離構造を構築することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、分子量制御された温度応答性高分子鎖 PIPAAm と疎水性高分子鎖 poly(*n*-butyl methacrylate) (PBMA) からなるブロック共重合体を調製し、温度によりドメイン特性が変化するナノ相分離構造を創製するとともに、温度変化により細胞の接着・脱着を実現する新規インテリジェント型ナノバイオ表面のモデルを提案した。具体的な方針としては、リビングラジカル重合法の一つである可逆的付加-開裂連鎖移動型ラジカル (RAFT) 重合により、分子量制御されたジブロック共重合体である PBMA-*b*-PIPAAm を合成した。このポリマーを基材表面にコーティングすることで、温度応答性ドメインを有するナノ相分離構造を形成する。ここでは、電子線照射を利用する従来の温度応答性培養基板作製法よりも簡便でかつ基材の材質や形状に依存しない新規インテリジェント培養表面作製法の確立を目的として、疎水性高分子鎖である PBMA と温度応答性高分子である PIPAAm 鎖を連結したジブロック共重合体を基材にコーティングする新しい PIPAAm 修飾法を検討した。ブロックコポリマーの化学組成とコーティング条件に焦点を絞り、安定な温度応答性高分子層の形成、および温度変化にともなう細胞とナノ相分離表面との相互作用について検討した。得られた基材表面が細胞の接着・増殖および脱着に与える影響を評価し、細胞の接着・脱着制御のための最適な表面設計について議論した。最終的には、温度変化のみで細胞外マトリックスを維持した細胞をシート状に回収できる表面設計を追求した (図 1)。

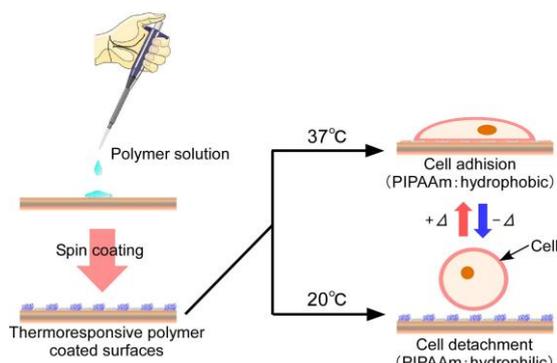


図 1 温度応答性ブロック共重合体コーティング表面における細胞接着・脱着制御

3. 研究の方法

(1) 温度応答性ブロック共重合体の合成

本研究では、分子量制御された温度応答性鎖を有するブロック共重合体 (図 2) を RAFT 重合により合成した。まず、疎水性高分子鎖として、PBMA を RAFT 剤存在下で合成した。次に PBMA をマクロ RAFT 剤とすることで、温度応答性高分子鎖である PIPAAm を連結したブロック共重合体を合成した。得られたポリマーは、¹H-NMR とゲル排除クロマトグラフィーにより、化学組成と分子量分布を決定した。

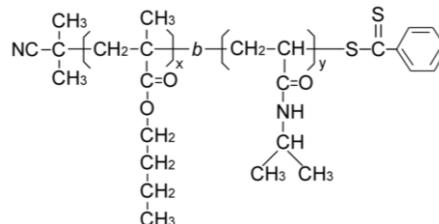


図 2 PBMA-*b*-PIPAAm の化学構造

(2) 温度応答性ブロック共重合体のコーティングと表面キャラクタリゼーション

調製した各ブロック共重合体をアセトニトリル/*N,N*-ジメチルホルムアミド混合溶液 (5/1 in v/v) に溶解した。ポリマー溶液を細胞培養用ポリスチレン (TCPS) 基板 (24 mm x 24 mm 角に成型) 表面に滴下した後、スピコート処理を行った。作製した基板を一晩室温にて乾燥後、純水で洗浄した。全反射型フーリエ変換赤外分光 (ATR/FT-IR) 法を用いて、作製した各基板表面の PIPAAm 修飾量を算出した。サンプルの吸収スペクトルのうち、基材ポリスチレンに含まれる芳香環由来の 1600 cm⁻¹ のピークと、PIPAAm に含まれるカルボニル基由来の 1650 cm⁻¹ のピークとの比 (I_{1650}/I_{1600}) を用いて PIPAAm 修飾量を算出した。基板表面の均一性および形態学的評価を行うために、原子間力顕微鏡 (AFM) による観察を行った。温度応答性ブロック共重合体

PBMA-*b*-PIPAAm をアセトニトリル/DMF 混合溶液 (5/1 in v/v) に溶解、0.1 wt/v% の濃度に調製し、シリコンウエハ上にスピンコーティングし、AFM 測定用の基板を作製した。大気中で室温にて観察し、基板表面の高さ像と位相像を得た。

作製した各基板について、20°C および 37°C における静的接触角測定を水中気泡法により行い、表面ぬれ性を評価した。

(3) 温度変化による細胞の接着性/脱着性の評価

各基板上にウシ頸動脈由来血管内皮細胞 (BAEC) を播種密度が 5.0×10^3 cells/cm² となるように播種した (10% FBS 添加 DMEM)。播種した基板を 5% CO₂ 下 37°C で 3 日間培養し、位相差顕微鏡下で経時的に観察するとともに表面への接着細胞数を計数した。次いで、基板を 5% CO₂ 下 20°C のインキュベーター中で 2 時間静置し、同様に表面への接着細胞数を計数した。

調製した細胞懸濁液を播種密度が 1.0×10^5 cells/cm² となるよう播種し、全体の液量が 3 mL となるよう培養液を添加した。細胞を播種したディッシュを 5% CO₂ 下 37°C に設定したインキュベーター内で細胞がコンフルエント状態になるまで培養した。37°C における培養時間が 3 日間を超過する場合、培養開始から 3 日目に 32°C 以上に加温した培地を用いて培地交換を行った。続いて、ディッシュを 5% CO₂ 下 20°C に設定したインキュベーター内へ移動し、低温処理を行い細胞シートの回収を試みた。37°C において 7 日間以上培養しても細胞がコンフルエント状態に至らない場合も同様に低温処理を行った。

4. 研究成果

(1) 温度応答性ブロック共重合体の合成

RAFT 重合により PBMA-*b*-PIPAAm を調製した。数平均分子量 25100 であり、ポリマー 1 分子を形成する BMA ブロックおよび IPAAm ブロックはそれぞれ 79 量体および 120 量体であった。

(2) 温度応答性ブロック共重合体のコーティングと表面キャラクタリゼーション

PBMA-*b*-PIPAAm コーティング基板の表面固定化量と高分子膜の安定性について ATR/FT-IR を用いて検討した。表面には $0.7\text{--}1.8 \text{ g/cm}^2$ の PIPAAm 鎖が固定化されていることが明らかとなった。また、ポリマーコーティング基板を 37°C の水中で 24 時間、4°C の水中で 24 時間振とうしながら浸漬させたところ、処理前後で PIPAAm 修飾量に変化はほとんど観察されなかった。このことから、水中における LCST を境とした温度変化でポリマーは基板上に安定にコーティングされ

た状態にあることが分かった。この結果は、疎水性高分子鎖である PBMA がポリスチレン基材と疎水性相互作用により安定的に物理吸着しているためであると考えられる。

分光エリブソメトリーにより基板上に形成した高分子層の膜厚を評価した。ポリマー濃度の増加にともない、膜厚は増加することが明らかとなった。

表 1 ブロック共重合体コーティング表面のキャラクタリゼーション

サンプル	ポリマー濃度 (wt/v%)	PIPAAm 量 ($\cdot \text{g/cm}^2$)	膜厚 (nm)
B/IP-0.1	0.1	0.84	7.0
B/IP-0.3	0.3	1.44	15.4
B/IP-0.5	0.5	1.81	23.3

PBMA-*b*-PIPAAm をコーティングした基板について表面モルホロジー観察を AFM 測定により検討した。高さ像では、高低差が約 2 nm でありほぼ平滑な表面であることが確認できた。また、位相像では、1つのドメインサイズが 40~50 nm であるナノ相分離構造とみられる形態が観察された。今回作製した PBMA-*b*-PIPAAm は、ポリメタクリレート系の PBMA とポリアクリルアミド誘導体である PIPAAm からなる不均質なブロックから形成されたブロック共重合体である。したがって、今回得られた位相差像はナノ相分離構造であり、コーティングに用いるブロック共重合体の種類を変えることで得られるナノ相分離構造の形態は同様に変化すると推測される。

またポリマーコーティング基板について PIPAAm 鎖の LCST を挟んだ温度における表面ぬれ性の違いについて、水中気泡法による静的接触角測定で評価したところ、PBMA-*b*-PIPAAm コーティング基板においても変化が見られなかった ($\cos \theta = 0.79$)。このことは従来の温度応答性表面のような基板表面全体が温度応答性鎖である PIPAAm に覆われている状態と異なり、PBMA-*b*-PIPAAm コーティング基板では、PBMA 鎖と PIPAAm 鎖が相分離してそれぞれのドメインを基板表面上に形成するため、マクロな環境変化を追跡する表面ぬれ性測定では顕著な変化は観察されないのではないかと考えられる。

(3) 細胞の接着性/脱着性の温度依存性評価

ポリマー濃度が異なる PBMA-*b*-PIPAAm 溶液をコーティングした基板上において 37°C、72 時間培養したところ、いずれのポリマー細胞の接着・伸展を確認した。しかしながら、膜厚の増加にともない、膜厚の増大にともない、細胞の増殖性が減少することが確認された。一方、細胞が接着した基板を 20°C で低温処理

した結果、15 nm 以上のポリマー膜厚で被覆した基板においてのみ、細胞が自発的に脱着することが明らかとなった。これは、基板表面に導入された PIPAAm 鎖が LCST 以下の低温処理により水和することで、基板表面の特性が変化し、細胞の剥離が生じたものと考えられる。

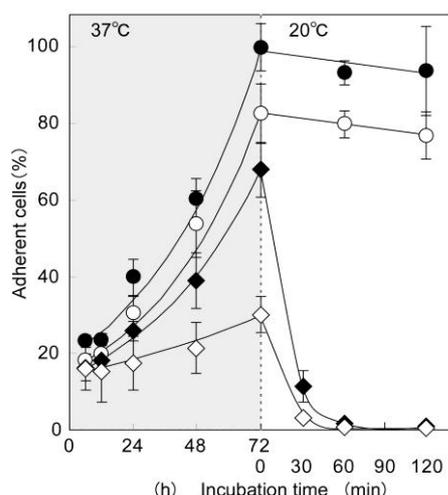


図3 高分子層の膜厚と細胞の接着・増殖挙動と細胞剥離挙動の関係

●: TCPS, ○: B/IP-0.1, ◆: B/IP-0.3, ◇: B/IP-0.5

PBMA-*b*-PIPAAm を 0.3wt/v% でコーティングした基板 (B/IP-0.3) について、細胞の良好な増殖性および低温処理にともなう剥離性が示されたことから、この表面を用いて細胞シートの作製を試みた。その結果、細胞をコンフルエント状態まで培養することが可能であり、20°C の低温処理により 15 分以内で細胞をシート状の組織として回収することに成功した。また、免疫染色の結果、得られた細胞シートは、細胞外マトリクスを維持した状態で回収されており、ポリマーコーティング基板にはフィブロネクチンの残存は観察されなかった。

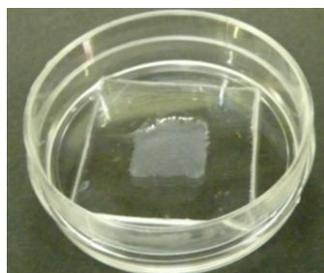


図4 回収した細胞シートの写真

以上のように、温度応答性ブロック共重合体の化学組成とそのコーティング条件によって、細胞の表面の接着・増殖性および低温処理による脱着性を制御することに成功し

た。今後、コーティング濃度およびブロック共重合体の種類の組み合わせた条件検討により、表面への接着性が異なる細胞種に適した温度応答性培養表面を作製し、対象とする組織の細胞シートを作製することを検討する予定である。本手法では、特殊な装置を用いず、簡便な方法で温度応答性表面を作製できることが示された。この手法により従来法と比較して、短期間に大量の温度応答性培養表面を構築することが可能となり、培養基板の低コスト化が実現できると考えられる。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山田奈央子, 中山正道, 金澤秀子, 岡野光夫, “細胞の接着・脱着を制御する温度応答性ブロック共重合体コーティング表面の構築”, 第 59 回高分子討論会, 2011. 9. 16, 北海道札幌市
- ② 中山正道, 山田奈央子, 金澤秀子, 岡野光夫, “インテリジェント細胞培養表面のための温度応答性ブロック共重合体コーティング技術の確立”, 第 20 回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 2011. 1. 6, 東京都新宿区
- ③ Masamichi Nakayama, Yayoi Kawahara, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, “Outermost surface functionalized thermoresponsive polymeric micelles for biomedical applications”, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010. 12. 17, ホノルル (アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 正道 (NAKAYAMA MASAMICHI)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00338980