

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 11日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21790038

研究課題名（和文） 培養細胞利用技術を支援する培養器材開発のための高分子表面の複合機能化

研究課題名（英文） Multifunctionalization of polymer surfaces for developing advanced cell culture substrate to support cell culture applications

研究代表者

笹井泰志（SASAI YASUSHI）

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60336633

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能性細胞培養基板の開発を目的として、化学的に不活性なポリスチレン基板表面にカルボキシル基を導入する方法を2種類確立した。それらは、生体適合性高分子であるビニルメチルエーテル マレイン酸共重合体を固定化する方法、および、鎖長の制御されたポリアクリル酸グラフト層を構築する方法である。それらの表面に固定化されたペプチドは細胞表面によって特異的に認識されることが示され、細胞の接着や増殖が効果的に制御されることが示された。

研究成果の概要（英文）：In order to prepare the functional substrate surfaces used in advanced cell culture applications, two methods were developed to introduce a large amount of carboxyl groups onto the chemically-inert polystyrene (PS) substrate. In one method, the biocompatible vinylmethylether-maleic acid copolymer (VEMAC) was immobilized on PS substrate through a coupling between carboxyl groups of VEMAC and hydroxyl groups on argon plasma-irradiated PS. In the other method, the well-defined poly (acrylic acid) brushes were fabricated on PS substrate by surface-initiated atom transfer radical polymerization of sodium acrylate. The surface carboxyl groups thus introduced were used for introducing a bioactive peptide interacting with cell surface. The immobilized peptide was specifically recognized by cell membrane receptors to stimulate cell adhesion and proliferation on the surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ポリスチレン、高分子表面機能化、表面界面物性、原子移動ラジカル重合、プラズマ加工、バイオインターフェイス、生体分子固定化、細胞接着、細胞培養、X線光電子分光法

### 1. 研究開始当初の背景

生体内において細胞外マトリックス(ECM)は、細胞接着の足場や細胞骨格の維持として機能するとともに、増殖や分化の制御にも深く関与している。生体外の培養系でも細胞の生存や機能発現を制御し、かつそのようにして培養した細胞を有効に利用できれば、再生医療などの高度な培養細胞利用技術の発展にも貢献できると期待される。このような背景のもと、人工的な ECM を構築し、培養細胞の増殖や分化を制御しようとする試みがある。

現在、細胞培養に用いられる器材には、物理化学的特性や生物学的に不活性化ことからポリスチレン (PS) 製のものが汎用されている。したがって、PS 基板表面に ECM 様の合成物を構築することは有益であると言える。しかしながら、PS 表面は化学的に不活性であり、また、多くの汎用有機溶媒に溶解してしまうことから、化学修飾による機能化は容易ではない。一方、高分子基板表面の機能化には機能性高分子のコーティングによる方法があるが、使用中における溶解や剥離が懸念されることから、細胞を使用するデリケートな実験・研究への適用は避けることが望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究は、培養細胞の有効活用技術の開発を目指し、一般的な培養器材に用いられているポリスチレン(PS)表面に、人為的に細胞を操作するための人工 ECM 構築を目的としたものである。求められる技術要素としては、まず、化学的に不活性化 PS 表面に化学修飾可能な官能を導入、そして、それに続く人工 ECM の基礎の構築である。

### 3. 研究の方法

本研究は、化学的に不活性化 PS 表面に、化学修飾可能な官能を導入する方法として、まず、弱電離気体の放電特性を利用したプラズマ表面処理による PS の表面修飾を行った。プラズマ照射された高分子表面には多量のラジカルが生成する。また、PS は、プラズマ照射によって生成したラジカルの再結合が進行しやすいプラズマ架橋型の高分子であり、その結果、PS 表面には、空気中でのラジカルの酸化による水酸基の導入、および、プラズマ誘起ラジカルのランダムな再結合反応の過程で形成される非共役型の不飽和結合の形成が進行すると考えられる。このような、これまでの報告例に基づく予想に基づき、本研究では、次の(1)(2)の方法により、PS 表面に高分子グラフト層を構築することによる表面機能化を行った。

(1) 人工 ECM の基礎として、生体適合性

高分子であるビニルメチルエーテル - マレイン酸共重合体 (VEMAC) に着目し、プラズマ照射 PS 表面に導入される水酸基と VEMAC のカルボキシル基間での縮合反応により、PS 表面に VEMAC 層を構築した。図 1 は、その構築法を模式的に示したものである。

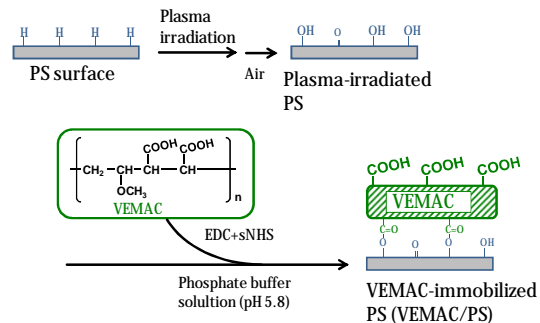


図 1 VEMAC 固定化 PS の調製法

(2) もう一つの表面機能化法として、PS 表面から原子移動ラジカル重合法 (ATRP) によるアクリル酸ナトリウムの重合鎖を伸長させ、ポリアクリル酸ナトリウム (PSA) グラフト層を構築した。ATRP はリビングラジカル重合法の一つで、ハロゲン化アルキル基を重合開始剤とし、鎖長の制御された高分子の合成が可能である。本研究では、プラズマ照射 PS 表面において、非共役不飽和結合が形成されていると想定し、臭素化剤として一般的に用いられる N-プロモコハク酸イミド (NBS) を反応させることにより、PS 表面の臭素化を行った。そして、その表面臭素化 PS から ATRP により PSA を伸長させた。図 2 は、その構築法を模式的に示したものである。なお、PSA は酸処理することにより、ポリアクリル酸に容易に変換される。

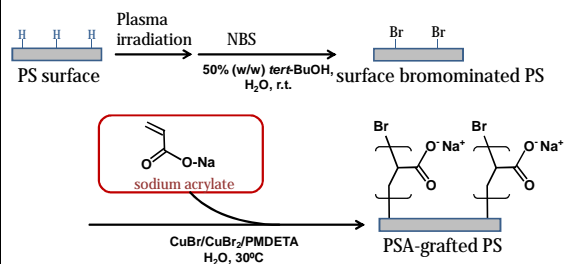


図 2 PSA グラフト化 PS の調製法

上記、(1)(2)のいずれの方法によっても PS 表面に多量のカルボキシル基の導入が可能である。本研究では、これらの表面の物理化学的特性を評価するとともに、PS 表面のカルボキシル基を細胞表面と直接相互作用するペプチドで修飾することにより、PS 表面における固定化ペプチドと細胞表面との特異的相互作用について検討した。細胞培

養実験におけるモデル細胞としては、マウス胎児由来の NIH3T3 を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) プラズマ技術を基盤とする PS 表面の機能化

###### ・方法(1)による表面機能化

図3は、図1に従い調製した VEMAC 固定化 PS 表面の X 線光電子分光 (XPS) スペクトル ( $C_{1s}$  ナロウスキャン) 測定ならびに解析結果を示している。比較の目的で、未処理 PS およびプラズマ照射 PS のスペクトルもともに示すが、プラズマ照射 PS では未処理の PS と比較して C-O 結合に由来するスペクトル構成比の増大が認められ、この結果は、プラズマ照射 PS 表面では酸化反応が進行していることを示すものである。また、VEMAC 固定化 PS 表面では、さらに、C=O 結合に由来するスペクトル構成比の顕著な増大も認められ、それに伴い、C-C、C-H 結合等に由来する 286 eV 付近にピークトップを持つ成分スペクトルの構成比の著しい減少が認められた。これらの結果は、PS 表面が VEMAC で覆われていることを強く示唆しており、期待通り、本方法によって、PS 表面に VEMAC を固定化することに成功した。

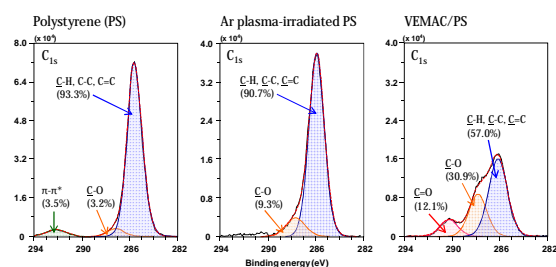


図3 VEMAC 固定化 PS(VEMAC/PS)の XPS スペクトル ( $C_{1s}$  ナロウスキャン)

###### ・方法(2)による表面機能化

プラズマ照射 PS 表面に、所定条件下 NBS を反応させた表面では、XPS 測定により、Br が検出され、期待通り、PS 表面の臭素化に成功した。そこで、図2に示す通り、アクリル酸ナトリウムの ATRP を実施し、PSA グラフト層の調製を試みた。図4は、ATRP 時間を変えて調製した PS 表面におけるカルボキシル基密度を示している。図4に示す通り、4時間の ATRP まで、ATRP 時間に比例してカルボキシル基量も増大しており、この結果は、ATRP 時間依存的に PSA グラフト鎖が伸長していることを示しており、本方法によって、PS 表面に鎖長の制御された PSA グラフト層を構築することに成功した。また、重合時間 0.5 時間以上の表面では、水接触角が  $10^\circ$  の超親水性を示すことを明らかにした。これは PSA の高い水溶性に起因する表面特性が得

られていることを示している。

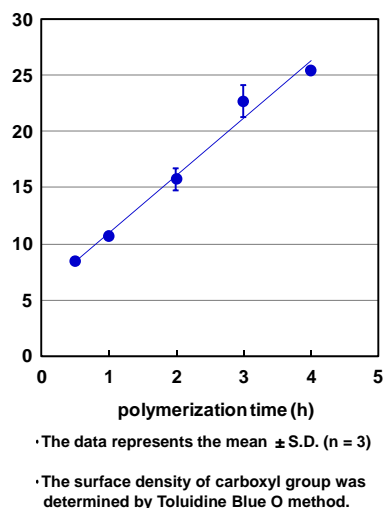


図4 PSA グラフト化 PS 表面における表面カルボキシル基密度の ATRFT 時間依存性

以上、本研究では、(1)(2)の方法により、化学的に不活性な PS 表面に高密度のカルボキシル基を導入することに成功した。これらの方法は、低温かつドライプロセスで表面処理が可能なプラズマ表面処理を基盤としている点、および、水系の反応条件で PS 表面にダメージを与えることなく高密度のカルボキシル基の導入が可能な点で独創性の高い有益な研究成果と言える。

##### (2) 表面機能化 PS へのペプチド導入による細胞接着制御

本研究では、モデルペプチドとして、細胞膜に存在するインテグリンの ECM における接着ドメインであるアルギン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) アミノ酸配列を含むペプチドを表面機能化 PS のカルボキシル基に結合させて、その固定化ペプチドと細胞との相互作用について検討した。

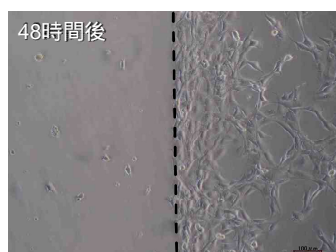
###### ・VEMAC 固定化 PS 表面へのペプチド固定化とその機能

所定条件下にて調製した VEMAC 固定化 PS 表面のカルボキシル基と GRGDS ペプチド末端のアミノ基との縮合反応により、VEMAC 層に GRGDS ペプチドを導入した。固定化反応時における未反応のペプチドの定量から、固定化量を算出したところ、約  $3.0 \text{ nmol/cm}^2$  であった。本ペプチド固定化表面において、NIH3T3 の培養実験を行ったところ、GRGDS ペプチド固定化表面においては、無血清培養時においても細胞接着および細胞増殖が認められた。また、比較の目的で GRGDS のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換された GRGES ペプチド固定化表面も調製し、NIH3T3 の接着特性と評価したところ、GRGDS 固定化表面で認められた細胞接着は

観察されなかった。無血清培地にて培養実験を行っていることを考えると、これらの結果は、VEMAC に固定化された GRGDS のアミノ酸配列は細胞表面によって特異的に認識されており、細胞接着の足場として機能していることを示している。

・PSA グラフト化 PS 表面の機能性細胞器材としての応用

PSA グラフト化 PS 表面は超親水性を示し、このような表面においては、血清添加時の細胞培養においても、血清中の細胞接着に係わる成分の吸着が抑制される結果、細胞接着が完全に抑制されることが示された。この結果を受け、PSA グラフト化 PS 表面の一部に GRGDS ペプチドを導入することにより、図 5 に示す通り、ペプチド固定化部位においてのみ、細胞の接着が認められ、同一基板表面において、細胞接着部位と非接着部位を明確にパターンニングすることが可能であった。



GRGDS非固定化領域 | GRGDS固定化領域

図 5 PSA グラフト PS 表面の GRGDS 固定化領域における選択的細胞接着

本結果は、PSA グラフト化 PS 表面のカルボキシル基に特定のリガンドを導入することにより、その基板表面で固定化リガンドと細胞との特異的な相互作用を評価することが可能であることを示唆しており、ポリスチレンを基板とするアレイ型細胞機能評価システムの構築へ向けた有益な知見と考えられる。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yasushi Sasai, Yuko Tanaka, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Fabrication of scaffold for cell adhesion on plasma-irradiated polystyrene, J. Photopolym. Sci. Technol., 24, 417-420, 2011, 査読有, DOI: 10.2494/photopolymer.24.417

Yasushi Sasai, Yuko Tanaka, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Plasma-based surface functionali-

zation of polystyrene substrate for cell culture application, Proc. ISPC-20, 454, 2011, 査読無

Yasushi Sasai, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Plasma surface modification of polymer substrate for cell adhesion control, J. Photopolym. Sci. Technol., 23, 595-598, 2010, 査読有, DOI: 10.2494/photopolymer.23.595

Yasushi Sasai, Natsuko Matsuzaki, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Surface modification of polystyrene dishes using plasma techniques to enhance cell adhesion and proliferation, Proc. ISPC-19, P3.13.11, 2009, 査読無

Yasushi Sasai, Shin-ichi Kondo, Yukinori Yamauchi, Masayuki Kuzuya, Immobilization of bioactive molecules onto polymer substrate functionalized by plasma techniques and its application to cell culture, J. Photopolym. Sci. Technol., 22, 503-506, 2009, 査読有, DOI: 10.2494/photopolymer.22.503

〔学会発表〕(計 11 件)

笹井泰志, 選択的細胞接着表面の構築を目的とした原子移動ラジカル重合法によるポリスチレン基板の表面機能化, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 札幌

笹井泰志, Surface modification of polystyrene substrate with well-defined poly(acrylic acid) brushes by atom transfer radical polymerization for cell culture application, 12<sup>th</sup> International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2012 年 1 月 26 日, 名古屋

笹井泰志, Plasma-based surface functionalization of polystyrene substrate for cell culture application, 20<sup>th</sup> International Symposium on Plasma Chemistry, 2011 年 7 月 26 日, フィラデルフィア(米国)

笹井泰志, プラズマ照射ポリスチレン表面を利用する細胞接着の足場構築, 第 28 回国際フォトポリマーコンファレンス, 2011 年 6 月 23 日, 千葉

笹井泰志, Fabrication of extracellular matrix-like peptide conjugate on plasma-irradiated polystyrene dish, 11<sup>th</sup> International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2011 年 1 月 25 日, 名古屋

笹井泰志, Fabrication of artificial extracellular matrix on plasma-functionalized polystyrene substrate to control cell behavior, 10<sup>th</sup> Asia-Pacific

Conference on Plasma Science and Technology & 23<sup>rd</sup> Symposium on Plasma Science for Materials, 2010年7月7日, 済州島(韓国)

笹井泰志, 細胞接着制御を目的としたプラズマ技術を利用する高分子表面修飾, 第27回国際フォトポリマーコンファレンス, 2010年6月24日, 千葉

笹井泰志, プラズマ技術を利用したポリスチレン基板の表面機能化による細胞接着制御, 日本薬学会第130年会, 2010年3月28日, 岡山

笹井泰志, Plasma-assisted functionalization of polystyrene surface to enhance cell adhesion and proliferation, 10<sup>th</sup> International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2010年1月26日, 名古屋

笹井泰志, Surface modification of polystyrene dishes using plasma techniques to enhance cell adhesion and proliferation, 19th International Symposium on Plasma Chemistry, 2009年7月30日, ボーフム(ドイツ)

笹井泰志, プラズマ技術により機能化した高分子表面への生理活性分子の固定化とその細胞培養への応用, 第26回国際フォトポリマーコンファレンス, 2009年7月2日, 千葉

## 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