

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760580

研究課題名(和文)インテリジェントバイオインターフェイスによる選択的細胞接着制御と細胞分離

研究課題名(英文)Temperature-modulated selective cell adhesion and detachment using intelligent bio-interface and application of them to cell separation

研究代表者

長瀬 健一(Nagase, Kenichi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：10439838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、温度変化に応答して物性を变化させる高分子に疎水性のユニットを導入することで、温度変化領域を低温域に調節した共重合体をガラス表面上に修飾した。作製した基板を用いて、細胞の接着、脱着挙動を確認したところ、細胞ごとに脱着に適した温度が異なることがわかった。これらの至適脱着温度の差異を用いて、混合細胞の懸濁液から各細胞を温度変化のみで分離可能な細胞分離用基材を開発した。

研究成果の概要(英文)：For preparing thermally modulated bio-interface that separates cells without the modification of cell surfaces for regenerative medicine and tissue engineering, thermo-responsive hydrophobic copolymer brushes were formed on glass substrate. Prepared copolymer brush surfaces were characterized by observing the adhesion at 37 C and detachment at 20 C or 10 C of four types of human cells. Endothelial cell and fibroblast exhibited their effective detachment temperature at 20 C and 10 C, respectively. Using cells' intrinsic temperature sensitivity for detachment from the copolymer brush, a mixture of endothelial cell and fibroblast was separated.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学 構造・機能材料

キーワード：バイオマテリアル 細胞分離 インテリジェント材料 温度応答性 ポリマーブラシ

### 1. 研究開始当初の背景

組織・臓器の再生、再構築を目標とする再生医療において、生体の主要な構成要素である細胞をその機能を損なわずに分離することが重要な基盤技術として認識されている。しかしながら、現在確立されている細胞分離技術である Fluorescence activated cell sorting (FACS)、Magnetic activated cell sorting (MACS) などは、大規模な装置を用いるものの、細胞表面への修飾が必要であり、処理できる細胞の量も少ない。そのため、細胞表面に修飾する必要が無く、活性の高い状態で細胞を分離可能な新しい細胞分離方法の創出に大きな期待が寄せられている。

### 2. 研究の目的

本研究では、温度応答性高分子を用いたインテリジェント界面を作製し、温度変化という簡便な刺激により細胞の接着、脱着挙動を制御して細胞分離をおこなう細胞分離用インテリジェント界面の設計をおこなう。温度応答性高分子としてポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を用い、また、疎水性モノマーとして *n*-ブチルメタクリレート(BMA)を用いた。これらの共重合体である P(IPAAm-co-BMA)を原子移動ラジカル重合(ATRP)を用いてガラス基板に修飾した。これらの基板を用いて、温度変化による細胞の接着、脱着速度の差異を利用した分離、ならびに細胞脱着温度の差異を利用した分離を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) P(IPAAm-co-BMA)修飾基板の作製

ガラス基板をプラズマ処理により洗浄、活性化した。その後、ATRP 開始剤である *m,p*-クロロメチルフェニルエチルトリメトキシシランのトルエン溶液を作製し、ガラス基板に室温で 18h 反応させた。反応後のガラス基板をトルエン、アセトンで洗浄し、16h 乾燥させて ATRP 開始剤固定化基板を作製した。

精製済みの IPAAm モノマー、BMA モノマーを 2-プロパノールに溶解し、アルゴンガスを吹き込むことで脱酸素をおこなった。その後、CuCl、Me<sub>6</sub>TREN を添加し ATRP 反応溶液を作製した。作製した反応溶液を ATRP 開始剤固定化ガラス基板に室温で 16h 反応させた。この際、固定化した ATRP 開始剤と類似構造を有する開始剤である  $\alpha$ -クロロ-*p*-キシレンを溶液に添加し、溶液中に生成したコポリマーを GPC により測定することで、ガラス基板に修飾されたコポリマーの分子量を推算した。

#### (2) 細胞分離の検討

作製した P(IPAAm-co-BMA)修飾ガラス基板に、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)、ヒト平滑筋細胞(SMC)、ヒト骨格筋芽細胞(HSMM)をそれぞれ 37 で播種し 24 時間接着挙動を観察した。また、

10、20 で 4 時間脱着挙動を観察することで温度による脱着挙動の差異を観察した。

### 4. 研究成果

作製した P(IPAAm-co-BMA)修飾基板の表面元素組成を XPS により測定した。結果を表 1 に示す。

表 1 XPS による元素組成測定結果

Code <sup>a)</sup>	Atom (%)					N/C ratio
	C	N	O	Si	Cl	
Initiator glass	24.4	0.1	48.7	26.0	0.81	0
IPB-0	66.8	10.3	16.0	6.40	0.46	0.154
IPB-1	65.8	9.57	17.1	7.23	0.37	0.146
IPB-2	68.3	9.37	15.1	7.04	0.23	0.137
IPB-5	69.2	8.05	15.7	6.76	0.24	0.116
Calcd of IPAAm <sup>b)</sup>	75.0	12.5	12.5	-	-	0.17
Calcd of BMA <sup>c)</sup>	80.0	-	20.0	-	-	0

a) IPB-x 中の x:仕込みの BMA のモル比、b) IPAAm モノマーの元素組成 c) BMA モノマーの元素組成

仕込みの BMA 量が増加するに従い、窒素含有量が減少し、炭素含有量が増加する傾向が見られた。BMA の元素組成は IPAAm と比較して窒素が少なく、炭素が多いことから、BMA の仕込みが増加するに従い、表面に修飾されているコポリマー中の BMA が増加していくことが示唆された。また、P(IPAAm-co-BMA)修飾基板のコポリマー修飾量を FT-IR により測定し、分子量、分子量分布を GPC により測定した。結果を表 1 に示す。

表 2 コポリマー修飾量、コポリマー分子量

Code <sup>a)</sup>	Amount of copolymer ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) <sup>b)</sup>	$M_n$ <sup>d)</sup>	$M_w/M_n$ <sup>d)</sup>	Grafted density (chains/ $\text{nm}^2$ )
IPB-0	0.948 $\pm$ 0.175	11200	1.40	0.51
IPB-1	1.30 $\pm$ 0.162	13200	1.31	0.59
IPB-2	1.81 $\pm$ 0.410	14100	1.36	0.77
IPB-5	1.64 $\pm$ 0.272	14400	1.52	0.66

a) IPB-x 中の x: 仕込み BMA のモル比、b) FT-IR により測定、c) GPC により測定

結果より、BMA の仕込み量が増加するに従い、コポリマーの修飾量、分子量が増加する傾向が見られた。これは、BMA の反応性が IPAAm よりも高いため、BMA の仕込みが増えるに伴い、修飾されたコポリマー量も増加するためと考える。また、コポリマー修飾密度は 0.6 chains/ $\text{nm}^2$  と高密度にコポリマーが修飾されていることがわかった。

溶液中に生成したコポリマーを水、およびそれぞれの細胞培養用培地の各温度での濁度変化を紫外・可視分光光度計で測定することで、それぞれのコポリマーの相転移温度を調べた。表 3 にコポリマーの相転移温度を示す。

表3 コポリマーの相転移温度

Code <sub>a)</sub>	Phase transition temperature (°C)				
	Water	EGM <sup>b)</sup>	FGM <sup>c)</sup>	SmGM <sup>d)</sup>	SkGM <sup>e)</sup>
IPB-0	32.7	29.9	30.2	30.1	30.0
IPB-1	24.0	22.1	22.4	22.4	22.6
IPB-2	19.2	18.0	19.1	17.8	19.6
IPB-5	16.6	15.4	15.0	14.7	14.8

a) IPB-x 中の x: 仕込み BMA のモル比、b) 血管内皮細胞培地で測定、c) 繊維芽細胞培地で測定、d) 平滑筋細胞培地で測定、e) 骨格筋芽細胞培地で測定

コポリマーの相転移温度は BMA の仕込み比が増加するに従い減少した。これはコポリマー中の BMA の疎水性が相転移を促進するためと考える。また、それぞれの相転移温度は培地中では 2 程度減少することがわかった。これは、培養液中に含まれている塩により、コポリマーの脱水和が促進されているためと考える。

作製したコポリマー修飾ガラス基板上に細胞を播種し、接着挙動、脱着挙動を確認した。それぞれの細胞の 37 での接着挙動、20 での脱着挙動を図 1-4 に示す。

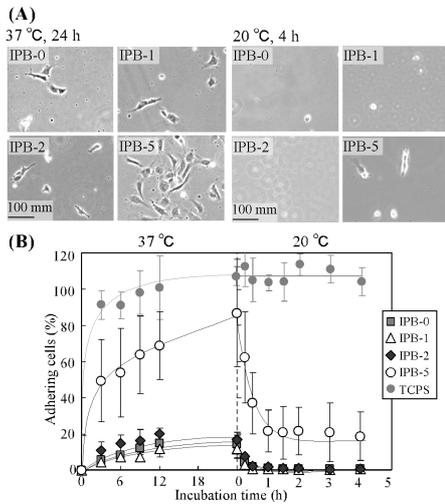


図1 HUVEC の接着挙動、脱着挙動

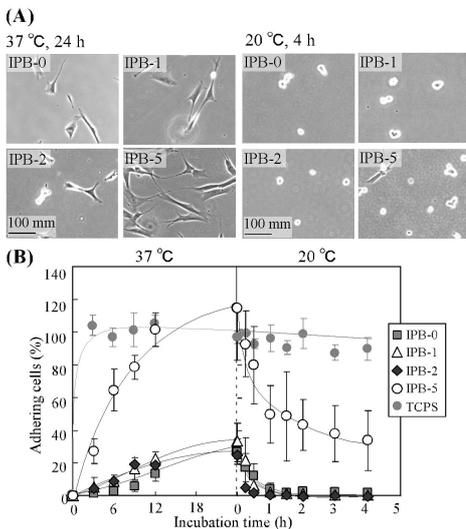


図2 NHDF の接着挙動、脱着挙動

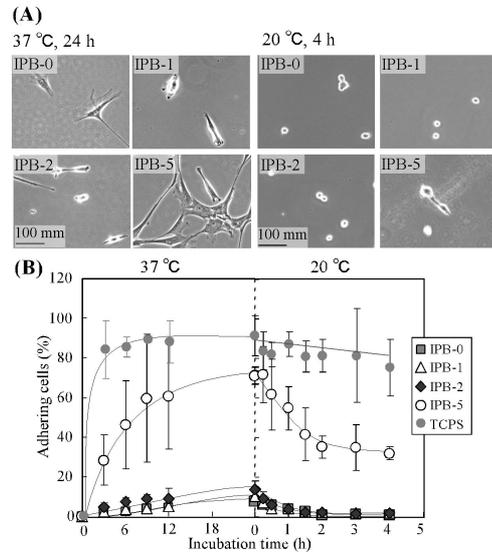


図3 SMC の接着挙動、脱着挙動

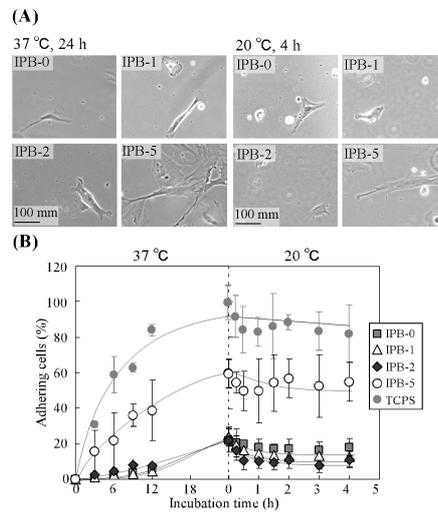


図4 HSMM の接着挙動、脱着挙動

全ての細胞においてコポリマー中の BMA の含有量が多くなるほど、細胞が接着しやすくなることがわかった。特に BMA の仕込みを 5mol% で導入した基板では、Tissue Culture Polystyrene (TCPS) と同程度の接着性を示した。

細胞の脱着温度を 10、20 で変化させてそれぞれの細胞の脱着挙動を調べた結果を図 5 に示す。

HUVEC は 20 で効率の良い脱着挙動を示したのに対し、NHDF は 10 で効率の良い脱着を示した。P(IPAAm-co-BMA)修飾基板表面のコポリマーは温度が下がるほど水和が促進され、親水性が増加する。一方、脱着の際の細胞活性は温度が下がると減少する。これらより、HUVEC は細胞の活性が低温では低下しているため、20 の方が効率の良い脱着を示したと考える。一方、NHDF の場合は 10 でも細胞の活性が維持され効率の良い脱着挙動を示したと考える。

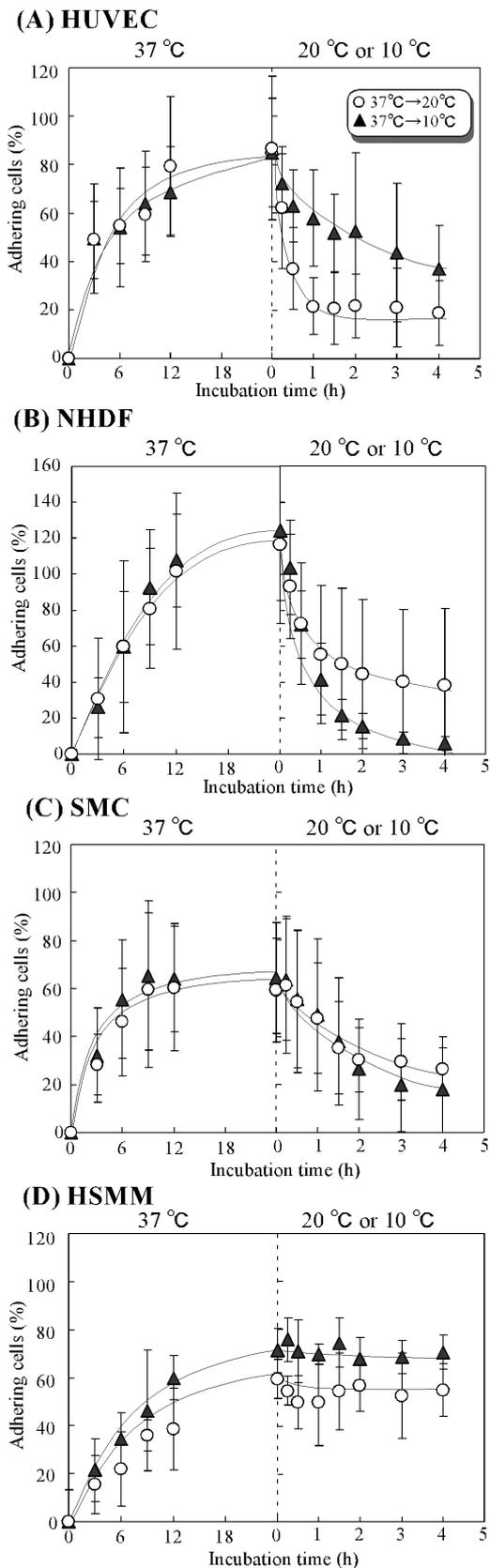


図 5 20、10 での各種細胞の脱着挙動の違い

これらの結果から得られた細胞の至適脱着温度の差異を用いた細胞分離を検討した。図 6 にその結果を示す。

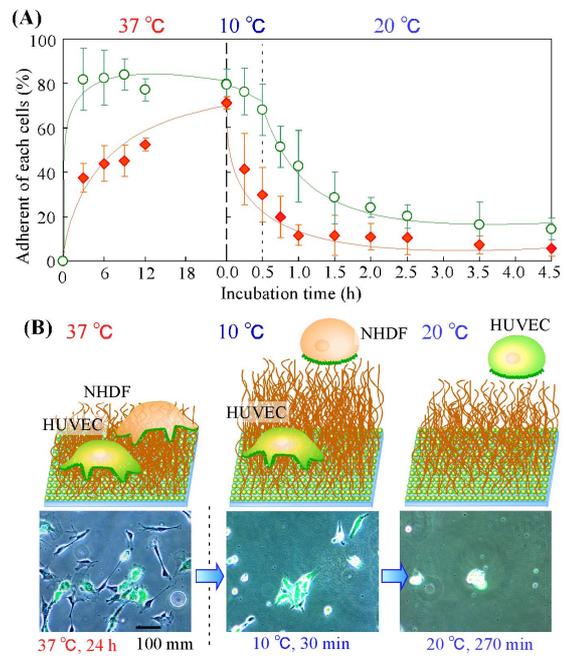


図 6 P(IPAAm-co-BMA)を用いた多段階温度変化による細胞分離

37 で HUVEC、NHDF の両細胞を接着させた後、10 に温度を低下させることで、NHDF を脱着させた。次に温度を 20 に変化させ、接着していた HUVEC を脱着させた。これにより温度 10 で NHDF を回収し、温度 20 では HUVEC を回収できることがわかった。

これらの結果から、温度を多段階に変化させる事で二種類の細胞の混合懸濁液から細胞を分離することが可能であることがわかった。

#### 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 1 件)

- 1) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, T. Okano, Hydrophobized Thermoresponsive Copolymer Brushes for Cell Separation by Multistep Temperature Change, *Biomacromolecules* **14** (2013) 3423-3433.

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 長瀬健一, 畠山由梨, 清水達也, 松浦勝久, 大和雅之, 武田直也, 岡野光夫: 荷電を有する温度応答性高分子による細胞分離の検討. 第 13 回日本再生医療学会総会, 京都, 2014/03

- 2) 長瀬健一, 畠山由梨, 清水達也, 松浦勝久, 大和雅之, 武田直也, 岡野光夫, ”細胞分離を目的とした温度応答性コポリマーブラシの調製と性能評価”, 第 35 回 日本バイオマテリアル学会大会. 2013. 11
- 3) K. Nagase, A. Kimura, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, N. Takeda, M. Yamato, T. Okano, “Thermoresponsive polymer brushes for therapeutic cells separation”, The 25th European Conference on Biomaterials (ESB2013), Madrid, Spain, 2013. 09
- 4) K. Nagase, A. Kimura, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, N. Takeda, M. Yamato, T. Okano, “Thermally-Modulated Cell Separation using Precisely Designed Thermo-responsive Polymer Brush Surfaces”, The 4th Asian Biomaterials Congress, Hong Kong, China, 2013. 06
- 5) 長瀬健一, 畠山由梨, 清水達也, 武田直也, 岡野光夫, ”温度応答性高分子とその共重合体を用いたインテリジェント界面による細胞分離の検討”, 第 12 回 日本再生医療学会総会. 2013. 03
- 6) K. Nagase, A. Kimura, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, N. Takeda, M. Yamato, T. Okano, “Precisely-designed temperature-responsive polymer brushes for label-free cell separation”, 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba (ICBS2013), Tsukuba, Japan, 2013. 03
- 7) K. Nagase, A. Kimura, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, N. Takeda, M. Yamato, T. Okano, “Precisely-designed temperature-responsive polymer brushes for label-free cell separation”, The 9th International Polymer Conference (IPC 2012), Kobe, Japan, 2012. 12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長瀬 健一 (NAGASE, Kenichi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号： 10439838