

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25560186

研究課題名(和文)三次元パターンによる高分子スキャフォールドの硬さ制御

研究課題名(英文)Control of elastic modulus on polymer scaffold by using three-dimensional micro-patterned substrate

研究代表者

角南 寛 (Sunami, Hiroshi)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・先端生命科学研究院研究員

研究者番号：50374723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず、三次元パターン上へ高分子膜を均一に貼り付ける方法を確立した。この方法は、PVAが水に溶解する性質を利用し、非常に薄いスピンコート膜をパターン上へたわみなく貼り付けることのできる画期的なものである。次に、パターンの凸と凹が埋まっている部分で、パターンに貼り付けられた膜の弾性率が異なることを明らかにした。この膜上で細胞培養を行ったところ、細胞がパターンの凸が埋まっている部分に集まることが確認された。

研究成果の概要(英文)：First, I established the method how to paste homogeneously a thin polymer film on the three-dimensional micro-patterned substrate. In this method, a thin polymer film can be pasted on the pattern substrate without looseness or wrinkles of the film by using solubility of PVA in water. Next, I showed clearly difference in the elastic modulus of the thin film between on the convex and concave of the pattern. The NIH-3T3 cells were cultured on this film, it was observed that the cells gathered for the part of convex.

研究分野：複合領域

キーワード：細胞バイオメカニクス 細胞接着 細胞遊走 3Dマイクロパターン 細胞足場 バイオMEMS 再生医学 弾性率

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ソフトマテリアルの弾性を調節する技術が注目されている。細胞がより硬い表面へ遊走する「走硬性」(Lo et al., *Biophys. J.*, 2000) の発見以降、ソフトマテリアルの弾性は細胞生物学、生物物理学だけではなく再生医学の分野で活発に議論されるようになった。今日までに、この弾性が、細胞の接着や遊走、増殖のみならず分化まで調節していると報告がなされている (Engler et al., *Cell*, 2006, Gilbert et al., *SCIENCE*, 2010 など)。ただし、一枚の高分子膜の中で弾性のみを厳密に調節することは非常に困難である。弾性の調節には架橋法が用いられるため、架橋することによる微細な形状変化や化学的な性質変化が生じてしまうからである。

### 2. 研究の目的

そこで、私は三次元形状を用いて高分子膜の弾性のみを調節する新技術を創り出そうと考えた。これまでに、カバーガラス上に作製された軟らかい高分子膜の厚さを  $10\ \mu\text{m} - 0.5\ \mu\text{m}$  の間で変化させたと、細胞増殖速度に大きな差異が観察された。この結果について、高分子膜の厚さが変化したことによって弾性率が変化したためではないか、と推察した。高分子膜の弾性率を高くすれば、細胞増殖が速くなるのが一般的に知られているからである。本技術は、三次元パターンを用いて一枚の高分子膜の弾性を局所的に調節することで、細胞の増殖をナノ～マイクロメートルの領域で緻密に制御することを目指している。この新技術は化学修飾や架橋反応を必要とせず、あらゆるソフトマテリアルの表面弾性の調節に広く適用できると考えられる。

### 3. 研究の方法

まず、フォトリソグラフィによって三次元的なパターン基板を作製した。レジスト膜がコートされたシリコン基板 ( $10\ \text{mm}$  角、 $900\ \text{nm}$  の熱酸化皮膜付き) 上に、クオーツフォトマスクをセットし、露光した。クオーツフォトマスクには鱗、市松、網目、角通し、格子、放射、縞 (ストライプ)、丸、三角、四角、波、扇、連鱗といった模様がある。露光後のシリコン基板を現像し、シリコン基板のレジスト膜で覆われていない部分の  $\text{SiO}_2$  を反応性イオンエッチング装置 RIE-10NRV (サムコ株) を用いて除去した。シリコン基板に残った  $\text{SiO}_2$  パターンをマスクとして、 $\text{Si}$  をディープエッチング (ICP ドライエッチング装置 MUC-21(住友精密工業株)した。マスクとして用いた  $\text{SiO}_2$  を HF で除去し、FE-SEM JSM-6700FT (日本電子株) およびカラーレーザー 3D 顕微鏡 VK-9700(キーエンス株)を用いて、加工されたシリコン基板の表面形状を観察した。その結果、 $23\ \mu\text{m}$  の深さの市松、網目、角通し、格子、放射、縞 (ストライプ)、

丸、三角、四角、波、扇、連鱗といった三次元パターンが確認された。

次に、三次元パターン上への高分子膜の貼り付け方法を検討した。まず、丸カバーガラス上に、PVA をスピコートした。次に、PVA がコートされた丸カバーガラス上に、poly( $\epsilon$ -caprolactone)をスピコートした。その結果、丸カバーガラス上に均一な厚さの(約  $50\ \mu\text{m}$ )の poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜を作製できた。この poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜の載ったカバーガラスを、膜面を下に向けて三次元パターンの上に貼り付け、水に一晩浸漬させることにより PVA を溶解させてカバーガラスのみを剥離させた。最後に、ワッシャーを膜に被せることで、三次元パターン上に貼られた poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜の密着性を向上させると共に、剥離しないように固定した。

この poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜の形状と位相差を AFM MFP-3D-BIO (アサイラムリサーチ株) によりマッピングした。このとき、膜の形状と位相差は AFM の AC モードを用いて同時に計測された。AFM 測定 (タッピング・DFM・AC など) において、表面の弾性率が高い場合、AFM 探針の共振周波数の位相の遅れが小さい。逆に、弾性率が小さい場合、位相の遅れは大きくなる。つまり、表面の材質や形状が均一な場合、位相差の変化は表面の弾性率の違いを表す。

最後に、形状および弾性の変化がマッピングされた poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜上で NIH3T3 細胞を培養し、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000D (オリンパス株) で細胞の接着や遊走、増殖を観察した。

### 4. 研究成果

三次元パターン上へ poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜を均一に貼り付ける方法を確立した (Fig. 1)。この方法は、PVA が水に溶解する性質を利用し、高分子膜の支持基板からの剥離とパターンへの貼り付けを同時に行う画期的なものである。三次元パターン上貼り付けられた膜は、水中および培養液中で 72h 以上安定であった。

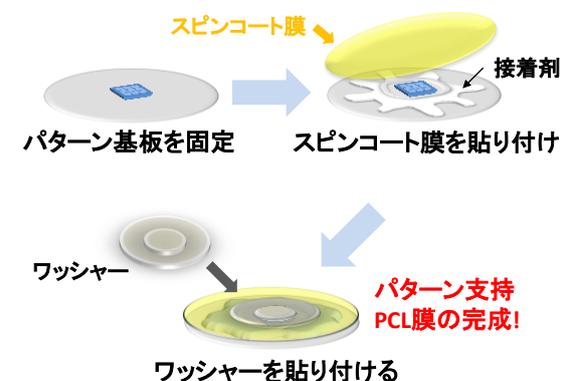
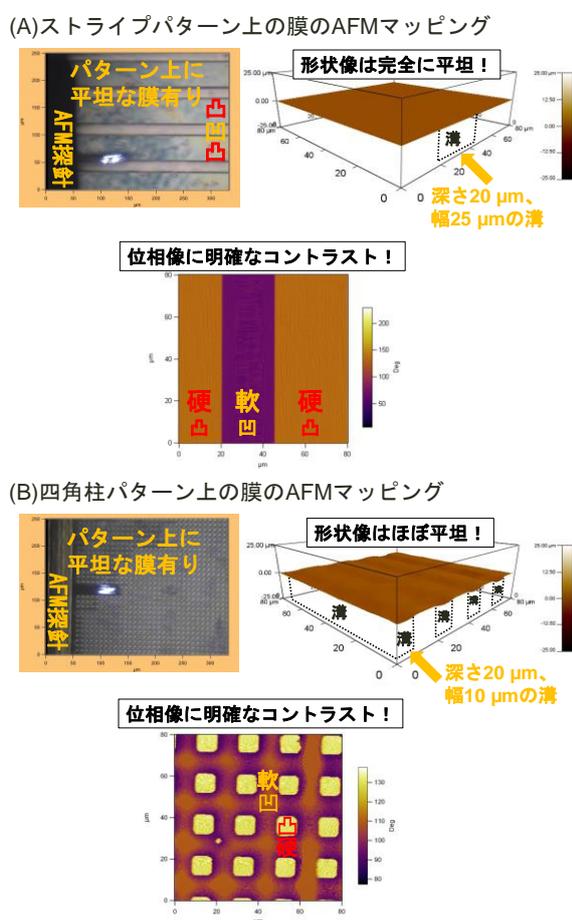


Fig. 1 パターン上への poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜の貼り付け方法の確立

AFM を用いて、ストライプパターン上に貼られた poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜の形状と位相差をマッピングした結果、膜がほとんど平坦であるにもかかわらず、パターンの凸と凹の部分で、位相差が大きく異なることが分かった。この位相差の違いは、パターンの凸と凹の部分で弾性率が異なることを示している (Fig. 2A)。別の形状の三次元パターンでも、パターンの凸と凹の部分で弾性が異なることが分かった (Fig. 2B)。これらの上で細胞培養を行ったところ、細胞が三次元パターンの凸が埋まっている部分に集まることが確認された (Fig. 3)。高分子膜の弾性率を高くすれば、細胞が集まることが一般的に知られているため、Fig. 3 の細胞の局在は、細胞が十分な弾性を求めて、比較的硬い部分に集まったためと考えられる。



**Fig. 2** 20  $\mu\text{m}$  の深さのパターン上に貼られた poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜の形状と位相差の AFM 観察 (A) ストライプパターン上および (B) 四角柱状パターン上に貼り付けられた poly( $\epsilon$ -caprolactone)膜の形状像と位相像

生体材料として良く用いられる合成高分子、poly( $\epsilon$ -caprolactone)の表面弾性をナノ～数マイクロメートルスケールの分解能で緻密に調節できること、その弾性変化を利用して NIH3T3 細胞の遊走や増殖を制御し、その局在を制御できることが分かった。

膜は平坦だが、細胞は凸の埋まった部分に！



下地のパターンの反射像と細胞の蛍光像の重ね合わせ画像

**Fig. 3** ストライプパターンに貼られた平坦な膜上の細胞

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① H. Sunami, I. Yokota, Y. Igarashi, Estimation of the angles migrating cells turn on three-dimensional micro-patterned scaffolds by live cell imaging with an inverted microscope. *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, 査読有, 2014; in press.
- ② H. Sunami, I. Yokota, Y. Igarashi, Influence of the pattern size of micropatterned scaffolds on cell morphology, proliferation, migration and F-actin expression. *Biomaterials sci.*, 査読有, 2(3), 399-409, 2014.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 角南 寛, 材料物性によって変化する細胞機能の最前線, 第 3 回ナノシステム若手交流会, 2013 年 9 月 21 日, 兵庫県大姫路工学キャンパス (姫路)
- ② 角南 寛, 三次元パターンを利用した新規細胞走性の開発, プロセスインテグレーションによる次世代ナノシステムの創製, 2013 年 10 月 17 日, コクヨホール(品川)
- ③ H. Sunami, I. Yokota, Y. Igarashi, Influence of the pattern size of three-dimensional micropatterned scaffolds on cell functions, 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013), 2013 年 11 月 8 日, Kyushu Institute of Technology (Kitakyushu)

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：動物細胞の運動方向の制御基材、当該基材を用いた細胞の識別方法及び細胞の分離方法

発明者：角南 寛、横田育子

権利者：科学技術振興機構（JST）

種類：特許

番号：特願 2013-229898

出願年月日：2013年11月6日

国内外の別：国内

名称：三次元形状を用いた動物細胞用構造体及び動物細胞用構造体表面の弾性調節方法

発明者：角南 寛、横田育子

権利者：科学技術振興機構（JST）

種類：特許

番号：特願 2013-261677

出願年月日：2013年12月18日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角南 寛 (SUNAMI, Hiroshi)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・研

究員 研究者番号：50374723