

次世代型インテリジェント培養皿



小林 純

東京女子医科大学 先端生命医学研究所

温度応答性高分子のポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）を利用した第1世代型培養皿を発展させ、次世代型のインテリジェント培養皿を開発した。まず、ナノメートルのレベルで厚みを制御した温度応答性高分子層に細胞接着因子あるいは細胞増殖因子を導入し、細胞接着基質を模倣したインテリジェント表面を作製した。この表面を利用することにより、無血清条件下における細胞培養を可能とし、温度低下による細胞および細胞シートを回収することができる新しい無血清化培養システムを開発した。また、表面微細加工技術を利用して、複数種の細胞を任意の位置に配置させる共培養用マイクロパターン化表面の開発をおこなった。これにより、生体臓器に近い機能を発現する共培養細胞シートやその重層化組織の構築が期待できる。組織工学、再生医療のような新領域において、次世代型インテリジェント培養皿のような新たな組織工学的手法の開発のためには、集学的な取り組みが必要である。

これまでに我々は、ナノメートルのレベルで厚みを制御した温度応答性高分子のポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）(PIPAAm)を固定化した温度応答性培養皿を用いて、移植可能な細胞シートを作製し、組織再生をおこなう技術（細胞シート工学）を世界に先駆けて開発した。この第1世代型温度応答性培養皿をさらに発展させ、細胞や組織中に観察される細胞接着構造や細胞成長因子受容体等のシグナル分子のクラスタリングなどに代表されるナノ構造を模倣し、積極的に制御することにより、新たな組織再構成技術の開発を目的とした次世代型インテリジェント培養皿の研究をおこなった。

代表的な細胞ナノドメインである細胞接着

基質との接着構造（接着斑やデスモソームなど）を人工的に操作することを目的として、細胞接着分子由来の細胞接着性ペプチドを温度応答性高分子鎖に分子配向や分子間距離を制御しながら固定化する技術を開発した。グラフト表面を作製する際に、種々官能基をもったモノマーとイソプロピルアクリルアミド (IPAAm)を共重合することにより、相転移温度を任意に制御でき、イオン性の付与で表面荷電変化を起こす温度応答性表面を得ることができる。特に、IPAAm とカルボキシル基をもつ2-カルボキシイソプロピルアクリルアミド(CIPAAm)の共重合体を固体表面にグラフトすると、表面に反応性基が導入でき、ペプチドや生体分子を容易に導入することがで

きる。細胞接着因子の RGDS ペプチド (Arg-Gly-Asp-Ser) を温度応答性表面に結合すると、ウシ血清やフィブロネクチンなどの細胞接着因子を添加することなく、良好な細胞接着性を示す。同様に温度応答性が維持され、温度を低下するだけで細胞を回収することができる (Figure 1)。また、細胞増殖加速化による細胞シート作製日数の短縮を目的として、複数種の細胞成長因子を固定化した温度応答性培養皿を調製し、細胞培養をおこなった¹⁾。細胞接着因子の RGDS ペプチドとインスリンを共固定化した表面上において、RGDS 固定量の増加にともない初期接着性が向上し、固定化インスリンは培地中へのインスリン添加の効果と比べて増殖能を亢進していることが示唆された^{2,3)}。細胞培養にはウシ血清がよく使われているが、ウシではプリオンの問題がありできれば無血清で細胞培養することが強く望まれている。この意味で、細胞接着性あるいは細胞増殖性のペプチドの導入で、新しい無血清化培養システムによる細胞シートの作製が期待されている。

実際の組織・器官は、異なる機能をもつ細胞が、パターン状に配列して形成されている。よって、高度な細胞組織の再構成のためには、生体組織構造を模倣した多種類の細胞から成るマイクロメートル規模での組織化技術が必要不可欠である。生体外で生体組織構造模倣を達成する手法として、微細加工技術を利用したマイクロパターン化培養基材での細胞培養が注目されているが、ここでは高い細胞密度の組織を再構築する上で有効な細胞シート工学への応用を目指し、温度応答性マイクロ

パターン化インテリジェント培養皿および共培養細胞シートの作製を検討した。

金属製マスクを用いて電子線照射し、PIPAAm およびその共重合体を 2 次元的パターン状に重合、グラフトした温度応答性培養皿を開発した。相転移温度の異なる 2 種類の温度応答性高分子⁴⁾を、同一表面上にマイクロパターンニングした培養皿で温度を変えながら細胞を播種すると、肝実質細胞と血管内皮細胞がお互いに接しながらパターン状に共培養することができる (Figure 2)。また、温度をそれぞれの相転移温度以下にすることで、細胞-細胞間の接着を維持したまま肝実質細胞と血管内皮細胞のパターン構造を有する細胞シートを剥離、回収することができる (Figure 3)⁵⁾。さらに、このマイクロパターン共培養下で血管内皮細胞と接している肝実質細胞が特異的にアルブミン産生等の分化機能を高度に発現することを明らかにした (Figure 4)。また、パターンサイズを変化させ、肝実質細胞と血管内皮細胞の接触面積が増加するのにもない、アルブミン産生能とアンモニア代謝能が亢進した⁶⁾。パターンサイズの最適化、細胞の組み合わせなどを検討し、生体臓器に近い機能を発現する共培養細胞シートやその重層化組織が構築できると考えられる。今後、大きく厚い組織構築を実現する新手法としてその発展が期待できる。

高分子化学と医学、生物学など様々な学問が融合した組織工学、再生医療の領域では、医学と工学が融合した次世代型医工連携システムによってのみ実現が可能である。このような新領域で、次世代型インテリジェント培

養皿の開発は次々に新しい組織工学的手法を生み出すに至った。

主要論文

1. H. Hatakeyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, "Influence of insulin immobilization to thermoresponsive culture surfaces on cell proliferation and thermally induced cell detachment", *Biomaterials* 26, 5167–5176 (2005)
2. H. Hatakeyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, "Bio-functionalized thermoresponsive interfaces facilitating cell adhesion and proliferation", *Biomaterials* 27, 5069-5078 (2006)
3. H. Hatakeyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, "Patterned biofunctional designs of thermoresponsive surfaces for spatiotemporally controlled cell adhesion, growth, and thermally induced detachment", *Biomaterials* 28, 3632-3643 (2007)
4. Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, M. Umezu, and T. Okano "Control of cell adhesion and detachment using temperature and thermoresponsive copolymer grafted culture surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.* 69A, 70 (2004)
5. Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, A. Nakao, Y. Sakurai, M. Umezu, T. Okano, "The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets", *Biomaterials* 26, 1885 (2005)
6. Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, G. Chen and T. Okano, "Heterotypic cell interactions on a dually patterned surface", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 937-944 (2006)

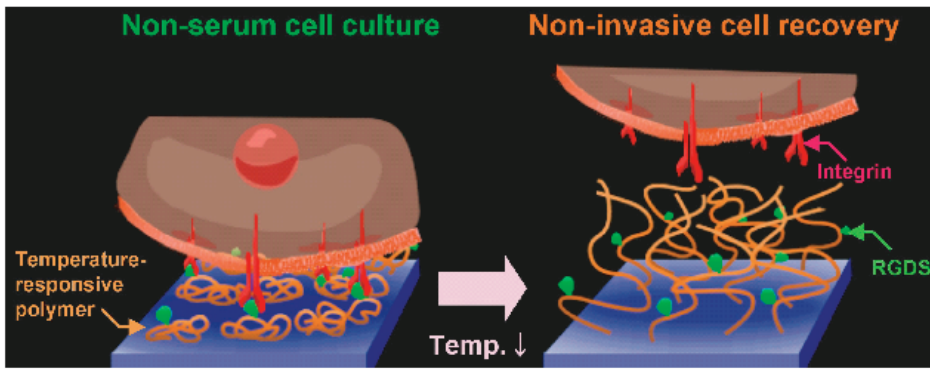


Figure 1 細胞接着因子固定化インテリジェント培養皿表面上での細胞接着／脱着変化.

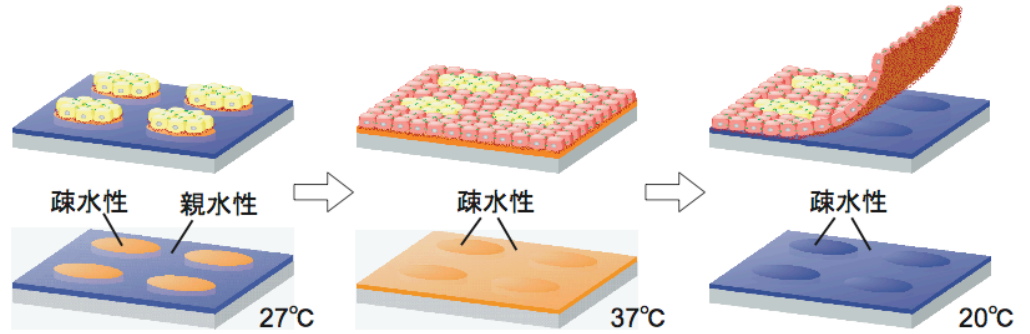


Figure 2 相転移温度の異なる2種類の温度応答性高分子をパターン状に固定化したインテリジェント培養皿.

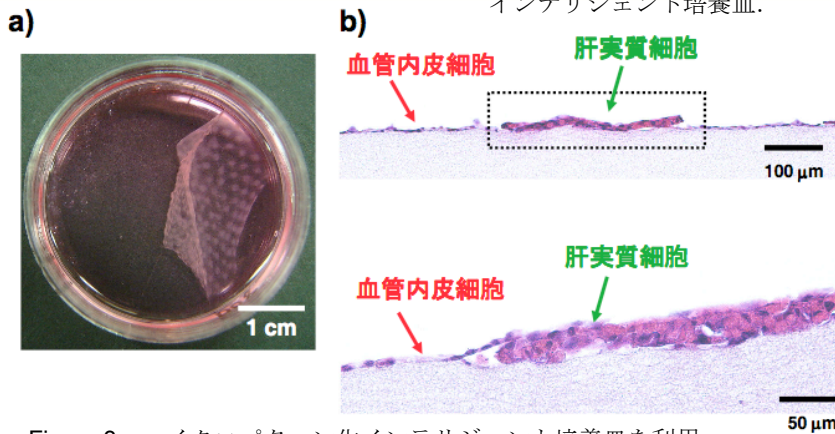


Figure 3 マイクロパターン化インテリジェント培養皿を利用した共培養細胞シートの回収. a) 回収した細胞シートのマクロ像. b) 回収した細胞シートの断面像.

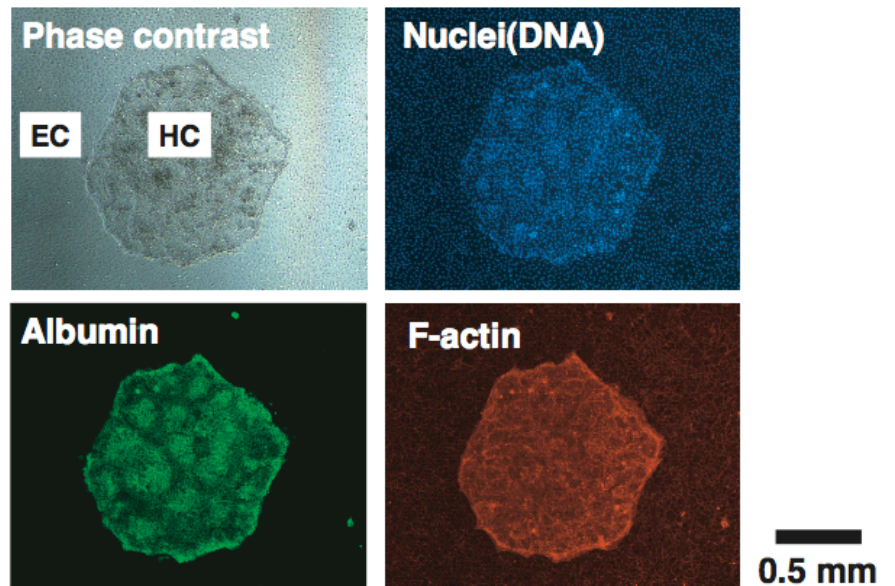


Figure 4 マイクロパターン化共培養細胞シートの位相差および蛍光顕微鏡像.