

## 温度応答性超薄膜グラフトゲルを 利用した新規細胞培養床の開発

秋山 義勝

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所



Poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) を組織培養皿ポリスチレン (TCPS) 表面にグラフトした温度応答性培養皿 (PIPAAm-TCPS) はグラフトした PIPAAm 層の厚みを超薄膜状 (約 20 nm) とした時にはじめて、温度変化により細胞接着および脱着能を制御することができる。PIPAAm 層の厚みが 40 nm 程度にした場合、より親水性な表面となり細胞は接着しない。本研究では、超薄膜高分子グラフトゲルの高分子鎖の分子運動性の観点から、グラフト層の厚みの違いによる細胞接着性への影響について考察した。さらに、PIPAAm 層の水和の迅速化が、細胞剥離の迅速化につながると考え、2-carboxylisopropylacrylamide(CIPAAm)モノマーと PIPAAm の共重合、polyacrylamide (PAAm) の親水性表面を利用した温度応答性培養表面を作製し、PIPAAm 層の水和を加速する CIPAAm、PAAm の役割について考察した。

1 : 細胞接着および剥離を制御する温度応答性培養皿の特徴について

(1) 作製した温度応答性培養皿 (Dish A および Dish B) の表面物性について

電子照射重合合法により、Dish A (IPAAm モノマー濃度を 55wt% で作製した温度応答性培養皿) および Dish B (80wt% で作製した温度応答性培養皿) の PIPAAm の PIPAAm グラフト量はそれぞれ  $1.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $2.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であった。37°C および 20°C における細胞接着性について評価を行ったところ、Dish A は 37°C では細胞接着性、20°C では細胞非接着性を示した。一方、Dish B は 37°C、20°C のいずれの温度においても細胞非接着性を示した。液中において、それぞれの表面接触角を測定し

たところ、Dish B の温度応答性培養皿は Dish A の温度応答性培養皿よりも親水性を示した。フィブロネクチン (FN) の吸着量

(37°C) は Dish A において  $150\pm 50\text{ ng}/\text{cm}^2$  であったのに対し、Dish B では FN の吸着は認められなかった。Dish B の細胞非接着性は FN が吸着しにくい、親水性表面に起因することが考えられる。膜厚を測定した結果、Dish A は 15.5nm 程度、Dish B は 29.3nm の超薄膜状の PIPAAm 層をそれぞれ有することが示された。

(2) PIPAAm 層の膜厚と細胞接着および剥離性への影響。

膜厚の測定結果から、温度応答性培養皿が示す細胞接着、剥離能は 15~20nm 程度の均一

な厚みで PIPAAm をグラフトすることではじめて実現できる。これは、PIPAAm と固体表面の界面で起こる強い疎水性凝集が PIPAAm グラフトゲル層の最表層に影響することに起因する。その結果、最表面の分子の凝集性は通常のゲルに比べ強く、より疎水的になり、細胞を接着・増殖させることができる (Figure 1)。30nm 以上の厚さのグラフト層では、固体表面の強い疎水性凝集が厚さと共に緩和されるため、15–20nm の厚みの場合と比較すると、より親水性となり細胞は接着しない。

## 2：細胞剥離の迅速化を実現する温度応答性表面の開発

### CIPAAm モノマーを利用した細胞シート剥離の迅速化

短時間での細胞シート剥離は細胞生存率、細胞活性を維持した組織構築にも重要である。細胞シートを利用した臨床応用を展開する場合、細胞シートの剥離の迅速化の手法の確立は、患者や術者の負担を軽減が期待できる。低温処理時、PIPAAm 鎖への効率的な水分子供給が実現できれば、PIPAAm 鎖の水和が促進され、迅速な細胞シートの剥離が可能であると考えた。CIPAAm ユニットが温度応答性ゲルネットワーク内において水分子を保持、誘導するため、CIPAAm を含む温度応答性ゲルは迅速な膨潤、収縮過程を示す。この特徴を温度応答性培養皿にも応用し、細胞シート剥離の迅速化を試みた。その結果、CIPAAm ユニットを含む温度応答性培養皿表面からの低温処理による細胞シート剥離は、通常の温度応答性培養皿からの剥離と比較して短時間

であった (Figure 2)。一方、細胞接着、増殖性は市販の TCPS や通常の温度応答性培養皿と同等であった。これらの結果から、CIPAAm のような親水性成分をグラフトゲル内に導入することで、TCPS や通常の温度応答性培養皿と同等な細胞接着性を維持したまま、より迅速な細胞剥離能を有する表面が作製できることを示した。

## 3：親水性基材表面を利用した温度応答性培養表面と迅速な細胞剥離への応用

温度応答性培養皿の特徴はすでに考察した通りであり (Figure 1)、基材界面の物性がグラフトした高分子鎖の運動性、水和状態に影響を与えることを推測している。本考察を基に親水性基材表面上にグラフトした PIPAAm 高分子鎖は疎水性である TCPS 表面とは異なり、水分子の供給を受けやすく、また、分子運動性の抑制も小さいと考えられる。この考えから、親水性表面上に PIPAAm をグラフトした場合、低温処理により、膨潤しやすく、接着した細胞も迅速に剥離できると推測した。PAAm を親水性高分子のモデルとして選び、電子線重合法で TCPS 上にグラフトし、さらに PIPAAm をグラフトした表面を作製し、その細胞接着性、剥離性を調べた。その結果、085PIPAAm-022PAAm-TCPS ( $0.22\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $0.85\mu\text{g}/\text{cm}^2$  の PAAm と PIPAAm をグラフトした表面) と 120PIPAAm-022PAAm-TCPS は市販の TCPS と同等な細胞接着性を示した。シングルセルの細胞剥離評価では、120PIPAAm-022PAAm-TCPS は 160PIPAAm-TCPS や 120PIPAAm-TCPS よ

りも迅速な細胞剥離を示した (Figure 3)。細胞シートの回収においても同様な傾向を示した。すなわち、適度な PAAm および PIPAAm 量をグラフトすることで細胞接着性能を維持したまま、細胞剥離を迅速化させる表面が作製できることを実証し、当初のコンセプトを支持する結果を得た。微量の PAAm 層から PIPAAm 層への水分子の効率的な供給、PAAm 層近傍の PIPAAm 鎖の分子運動性が TCPS 近傍の PIPAAm 鎖と比べ高いために起こることで、PIPAAm の水和促進により、細胞剥離も促進される (Figure 4)。

#### 主要論文

1. Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T.Okano, "Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) Grafted Layer on Polystyrene Surfaces for Cell Adhesion/Detachment control" *Langmuir*, 5506, 20, (2004).
2. M. Ebara, M. Yamato, M. Hirose, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano "Copolymerization of 2-Carboxyisopropylacrylamide with N-isopropylacrylamide Accelerates Cell Detachment from Grafted Surfaces by Reducing temperature" *Biomacromolecules*, 344, 4, (2003).

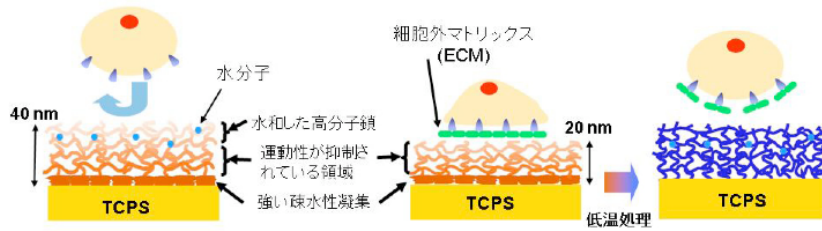


Figure 1

PIPAAm層の厚みと細胞接着および剥離への影響

PIPAAm層の厚みが基材界面のPIPAAm鎖は分子運動性が抑制されており、また、TCPSの疎水性により、強く脱水和、凝集している。(右) 20nmの場合、この凝集が再表面のPIPAAm鎖も脱水和させ、細胞接着性を示す。(左) 40nmの場合、再表面のPIPAAm鎖は基材界面での凝集による影響を受けにくい。その結果、PIPAAm鎖は水和し細胞非接着性を示す。

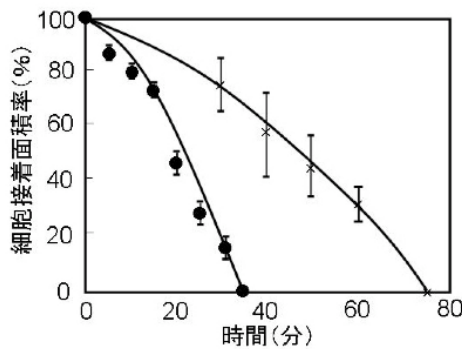


Figure 2

20°Cにおける、温度応答性培養皿表面からの細胞シート剥離挙動  
 ×：温度応答性培養皿、●：CIPAAmモノマーを導入した温度応答性培養皿

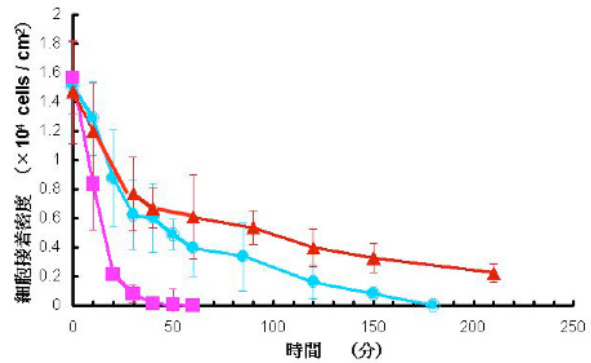


Figure 3

温度応答性培養表面からの細胞剥離挙動  
 ●：120 PIPAAm-TCPS, ▲：160 PIPAAm-TCPS, ■：120 PIPAAm-022 PAAm-TCPS

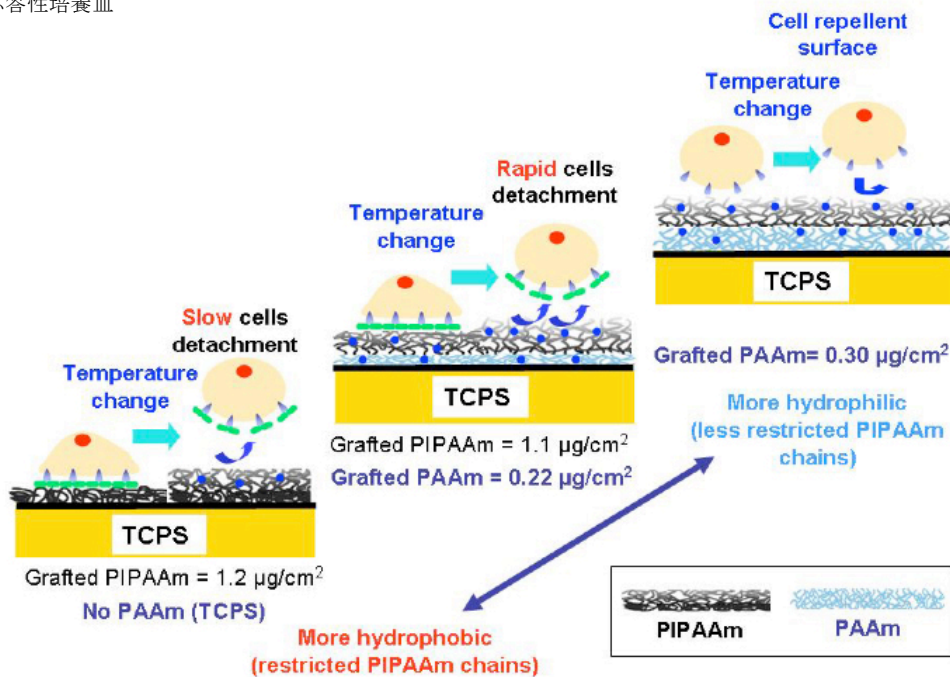


Figure 4 グラフトPAAm量の違いによる温度応答性表面への細胞接着、剥離挙動への影響

左) PAAmをグラフトしない場合、PIPAAm量：1.20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、(中央) PAAm量：0.22  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、PIPAAm量：1.10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (右) PAAm量：0.30  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ に温度応答性高分子をグラフトした表面。(左) PAAmが存在しない場合、1.20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のPIPAAmのグラフト量では、TCPS界面付近でのPIPAAm鎖が強い疎水性凝集を起こすことにより、最表面のPIPAAm鎖の脱水和が促進されるため、細胞剥離の速度は遅い。(中央) 適度な量のPAAmが存在すると、PAAm層からの水分子の供給、PAAm層近傍のPIPAAm鎖の適度な疎水性凝集が起こることで迅速な細胞剥離が起こる。(右) PAAm量が多いとPAAm層近傍のPIPAAm鎖は疎水性凝集を起こしにくい。その結果、最表面のPIPAAm鎖は水和しやすく、細胞非接着性となる。