

早稲田大学博士論文(概要)		
学位記	文科省報告	
2006	4483	甲 2396 乙

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

Fabrication of a Cell Array for Biological Applications Utilizing Hydrophilic Nano-bio Interfaces.

親水性ナノバイオ界面の構築と
生物学的応用を目指した細胞アレイの作製

申請者

岩永 進太郎

Shintaroh Iwanaga

応用化学専攻 化学工学研究

2006年 12月



近年、医療分野や生化学分野において遺伝子やタンパク質を用いた生体情報制御が重要視されている。ゲノム(genome)およびプロテオーム(proteome)解析の発展により、難病の発症メカニズムの理解や創薬プロセスに大きな影響を及ぼすと考えられる。一方、細胞は生体を構成する最小単位であり、遺伝子やタンパク質がその機能を発揮する場所でもある。細胞を用いることによって得られる結果は、生体物質の機能状態が我々の生体環境に極めて近い状態での情報を提供してくれると期待される。今日ではゲノムやプロテオーム解析から更に進化し、セローム(cellome)解析の開発が著しい進歩を遂げている。これら生体物質の解析方法を飛躍的に進歩させたものがチップやアレイといったデバイス表面へのパターンニング手法である。

細胞をアレイ化することによって、小型化による携帯性や大量データの迅速な採取、少量細胞の使用による低侵襲な薬物スクリーニングや医療診断への幅広い応用などの可能性が考えられる。また、アレイ表面上では細胞を様々な形態で培養することが可能であるため、環境を変化させた細胞の機能解析を行ったり、遺伝子の導入に用いたりなど細胞工学への応用範囲が広まることが期待される。このようにセルアレイは実用されれば非常に有用なデバイスとなりうる。

本論文では電子線重合法とレーザー加工を併用した新規パターン化細胞表面を構築し、細胞パターン化表面の生物学的応用への検討を行った。親水性高分子を固定化した表面では、その固定化量や固定化の状態によってタンパク質や細胞との親和性が変化する。汎用的に使用されている細胞培養ディッシュ表面に種々の親水性高分子を導入したナノ界面での細胞-基材間の相互作用を明らかにし、簡便なプロトコールで作製可能なインテリジェント表面を開発した。

本論文は2部に分かれて構成される。

まず、前半部では細胞アレイ作製の前段階である親水性高分子固定化表面の作製について述べる。生体物質をデバイス表面にパターン化する方法は種々報告されているが、パターン化の基本は何れも同じで、接着部位および非接着部位の制御である。細胞は親水性表面または極端な疎水性表面には接着をしないことが知られている。そこで第一段階として、市販のポリスチレン性の細胞培養ディッシュ(TCPS)表面に親水性高分子を固定化することでパターン化に必要な細胞非接着表面の構築を目的とした。親水性高分子としては *N*-メチルアクリルアミド(MAAm)、アクリル酸(AAc)、2-ヒドロキシメチルアクリルアミド(HMAAm)、アクリルアミド(AAm)の4種類を用いた。

高分子を固定化する方法として、電子線重合法により表面に共有結合的に修飾した。MAAm および AAc は水に、HMAAm および AAm は混合比 1:1(vol/vol)のメタノール-2-プロパノール溶液に溶解し、種々の濃度に調製した。それぞれの溶液を TCPS に展開した後、0.3 MGy の電子線を照射して高分子を固定化した TCPS 表面を作製した。

作製した高分子固定化 TCPS の表面物性について検討した。表面の親水性がどの程度かを測定するため、静的接触角法により各表面の接触角を測定した。何れの表面も未修飾の TCPS より低い接触角の値を示したことから、高分子が固定化されて表面が親水性になっていることが確認された。また、高分子固定化表面にウシ血管内皮細胞(EC)を播種して培養し、表面における細胞の接着性を観察した。各高分子固定化表面において、調製溶液の濃度が濃くなると細胞の接着性が低くなることが観察されたが、細胞が全く接着しない表面の作製が可能であったのは HMMAm と AAm のみであった。

そこで、低濃度のモノマー溶液で細胞非接着表面を作製可能であった AAm 固定化 TCPS(PAAm-TCPS)のみに着目し、更に詳しく表面分析を行った。FT-IR により PAAm-TCPS 表面の PAAm 固定化量を測定した結果、 1670 cm^{-1} 付近に AAm 由来のピークが観察され、AAm モノマー濃度が濃くなるにつれて表面の固定化量が増えていることが確認された。また、XPS により PAAm-TCPS 表面の元素分析を行った。基材のごく表面近傍部分の N/C 元素比は低濃度および高濃度で作製した表面の何れも、PAAm の構造から計算される値とほぼ同じ値であった。一方で、基材の表面内部部分の N/C 比は高濃度での作製表面は計算値と同じであったのに対し、低濃度での作製表面は N/C 比が計算値よりも低い値であった。これは低濃度で作製した表面の PAAm 層が薄いために、下地の TCPS の影響が出ているのではないかと考えた。これらの結果から、PAAm-TCPS 表面には均一に PAAm が固定化されており、作製時のモノマー濃度を調整することによって固定化する PAAm 層の厚みを制御可能なことが示唆された。

PAAm-TCPS 表面で EC を培養することで、表面の細胞非接着性と増殖の様子を検討した。細胞を播種し、72 時間までにどの程度細胞が接着・増殖するかを細胞密度の計測によって観察した。その結果、低濃度で作製した表面では、細胞は接着するだけでなく増殖することが確認されたが、細胞がコンフルエントになることは無かった。低濃度の表面の場合、非常に早い初期の段階では培養液中のタンパクが吸着することで細胞の接着が促進され、ある程度の時間が経過した後に表面が十分に水和されて、その後の細胞接着性が低くなると考えられる。

このことを確認するため、予め PBS にて表面を濡らした場合の接触角変化と細胞接着性を観察した。各 PAAm-TCPS を PBS にて湿潤させ、バブル法によって継時的に表面の接触角を測定したところ、親水性が低かった表面も 24 時間後には非常に親水性が高くなっていることが確認された。また、12 時間以上 PBS にて湿潤させた表面に細胞を播種して培養したところ、全ての PAAm-TCPS において細胞の接着が観察されなかった。これらの結果より、PAAm 層の薄い表面でも基材界面で水和が起こることによってタンパク質の吸着および細胞の接着を著しく抑制することが示唆された。

これら前半部の結果より簡便な手法で均一な細胞非接着表面を再現よく作製可

能であることを示した。

次に後半部では、作製した PAAm-TCPS 表面上に細胞をパターン化するための加工条件の検討およびパターン化アレイ表面上における細胞の機能評価の可能性について述べる。これまで報告されている細胞のパターン化表面作製手法は煩雑な工程を経る必要が多い。また、長期培養に耐えうる表面ではなく、短期的な細胞機能の観察にしか使えないなどの問題がある。そこで、PAAm-TCPS を加工することによってわずか数工程でアレイを作製し、細胞の機能評価を行うことで、本パターン化表面の生物学的応用への展開を目的とした。

PAAm-TCPS は市販の細胞培養基材の表面上に親水性高分子を修飾しているため、微細加工によって下地を露出させることで細胞接着性領域と非接着性領域の局所的な作製が期待される。そこで、UV エキシマレーザーを用いて表面の微細加工を行い、加工条件の検証を行った。レーザーの強度を制御することにより、加工部位の高分子にほとんど物性変化を与えることなく、細胞接着性領域である下地の TCPS 表面を露出させることが可能であった。

微細加工部位を観察するため AFM を用いて表面形態を観察した。微細加工を施したドメインと施していない部位の両方において表面は均一であり、微細加工部の深さは 35 nm 程度であった。このことより、レーザーによる加工は均一に施されることが確認できた。また、加工部の深さから表面に修飾した PAAm 層が 30 nm 程度の超薄膜で十分に細胞非接着性を示すことが観察された。

続いて微細加工表面で細胞のパターン化を実現するために、表面における接着タンパク処理の検討を行った。接着タンパクであるフィブロネクチン(FN)の PBS 溶液で表面を処理し、EC を播種したところ、細胞をパターン化するのに至適な FN 濃度が存在することが確認された。至適濃度の FN 溶液で処理することによって、ドメインの大きさを変化させてもパターン通りの細胞アレイの作製が可能であり、加工部の大きさを制御することで 1~数十ないし数百個の細胞数制御が可能であることが確認できた。また、毎日培地交換を行うことによって、2 ヶ月もの長期間に渡ってパターン化形状を崩すことなく培養することが可能であった。

細胞のパターン化が再現性良く観察できることが確認できたため、本表面上にてラット新生児心筋細胞を播種し培養することによって細胞機能評価へ用いることが可能かを検討した。心筋細胞を播種した表面ではコネクティングしている心筋細胞数によって拍動状態の安定性が変化することが確認された。そして、一定の細胞数以上では心筋の拍動の安定性は変化しないことが観察された。これは、ある程度の細胞塊となることにより、単純な細胞の機能からより組織に近い機能を獲得しているためと考えられる。

以上のように、本研究で開発した細胞パターン化表面の手法を用いることで簡便な表面の作製および、細胞塊を用いた高次機能解析の応用展開への可能性が示された。

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
○論文	Preparation of polyacrylamide grafted inert biomaterial surfaces for protein adsorption or cell attachment. Biochemical and Biophysical Research Communications, accepted. Shintaroh IWANAGA, Yoshikatsu AKIYAMA, Akihiko KIKUCHI, Masayuki YAMATO, Kiyotaka SAKAI, Teruo OKANO.
○論文	Fabrication of a cell array on ultrathin hydrophilic polymer gels utilising electron beam irradiation and UV excimer laser ablation. Biomaterials, 2005 26, 5395-5404. Shintaroh IWANAGA, Yoshikatsu AKIYAMA, Akihiko KIKUCHI, Masayuki YAMATO, Kiyotaka SAKAI, Teruo OKANO.
講演	親水性高分子固定化表面上での乾湿状態における細胞接着挙動観察および細胞アレイ作製の評価 第 55 回高分子学会年次大会, 2006 年 5 月, 名古屋 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	細胞アレイ作製のためのバイオイナート表面の調製 第 15 回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 2006 年 3 月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	細胞パターン化表面の簡易作製を目指した高分子超薄膜ゲル固定化表面の調製 第 17 回高分子ゲル研究討論会, 2006 年 1 月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	細胞非接着バイオマテリアル表面における細胞アレイの作製および心筋細胞の機能解析への検討 第 28 回日本分子生物学会大会, 2005 年 12 月, 福岡 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	心筋細胞を用いた細胞アレイ表面上における細胞機能解析の検討 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会, 2005 年 11 月, 京都 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	親水性超薄膜ゲルグラフト表面上における心筋細胞アレイの構築および拍動挙動の検討 第 54 回高分子討論会, 2005 年 9 月, 山形 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	パターン化心筋細胞アレイの作製およびオリゴ細胞レベルでの拍動挙動の観察 第 8 回日本組織工学会, 2005 年 9 月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	親水性高分子を用いたセルアレイ表面の構築およびオリゴ細胞群の機能解析の検討 第34回医用高分子シンポジウム, 2005年8月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	Evaluation of cardiomyocytes beating on various size-controlled domains using patterned surfaces. The 8th SPSJ International Polymer Conference, 2005 Jul., Fukuoka Shintaroh IWANAGA, Yoshikatsu AKIYAMA, Akihiko KIKUCHI, Masayuki YAMATO, Kiyotaka SAKAI, Teruo OKANO
講演	Evaluation of function of cardiomyocytes on different size of the patterned domains using a novel patterned surfaces. The 6th International Conference on Intelligent Materials and Systems, 2005 Jul., Tokyo Shintaroh IWANAGA, Yoshikatsu AKIYAMA, Akihiko KIKUCHI, Masayuki YAMATO, Kiyotaka SAKAI, Teruo OKANO
講演	細胞アレイ上における細胞間のネットワーク形成およびオリゴ細胞の機能評価 第54回高分子学会年次大会, 2005年5月, 横浜 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	細胞機能評価のためのセルアレイ作製およびオリゴ細胞の機能解析 第21回日本医工学治療学会, 2005年5月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	Preparation of a Novel Cell Array on Ultrathin Hydrophilic Polymer Layers and an Approach for the Analysis of Oligo-cell Functions. Society for Biomaterials 30th Annual Meeting & Exposition New Applications and Technologies, 2005 Apr., USA Shintaroh IWANAGA, Yoshikatsu AKIYAMA, Akihiko KIKUCHI, Masayuki YAMATO, Kiyotaka SAKAI, Teruo OKANO
講演	親水性薄膜上における新規セルアレイの作製および細胞機能解析への検討 化学工学会第70年会, 2005年3月, 名古屋 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	心筋細胞を用いた細胞アレイ上におけるオリゴ細胞群の機能評価 第14回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 2005年3月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	高分子薄膜ゲルを用いた細胞アレイの作製およびアレイ上における細胞機能の解析 第16回高分子ゲル研究討論会, 2005年1月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	Analysis of Cell Functions on A Cell Array Utilizing Electron Beam Irradiated Polymerization and UV Excimer Laser. Fourth Asian International Symposium on Biomaterials, 2004 Nov., Ibaraki Shintaroh IWANAGA, Yoshikatsu AKIYAMA, Akihiko KIKUCHI, Masayuki YAMATO, Kiyotaka SAKAI, Teruo OKANO

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
講演	親水性高分子超薄膜により作製したセルアレイ表面上に接着した細胞機能解析 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004, 2004 年 11 月, 茨城 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	電子線重合法と UV エキシマレーザーにより作製したセルアレイ表面上に接着した細胞機能の解析 第 53 回高分子討論会, 2004 年 9 月, 北海道 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	親水性高分子超薄膜と UV エキシマレーザーを利用したセルアレイの開発 第 33 回医用高分子シンポジウム, 2004 年 7 月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	電子線重合法による親水性高分子超薄膜と UV エキシマレーザーを用いた新規なセルアレイの開発 第 53 回高分子学会年次大会, 2004 年 5 月, 神戸 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	親水性ポリアクリルアミド超薄膜と UV エキシマレーザーを利用した新規なセルアレイの開発 第 20 回日本医工学治療学会, 2004 年 4 月, 広島 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	親水性ポリアクリルアミド超薄膜と UV エキシマレーザーを利用したセルアレイの開発 第 13 回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 2004 年 3 月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	親水性ポリアクリルアミド超薄膜と UV エキシマレーザーを利用したセルアレイの開発 第 15 回高分子ゲル研究討論会, 2004 年 1 月, 東京 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	バイオナノインターフェイスを用いた新規セルアレイの開発 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会, 2003 年 12 月, 大阪 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	バイオナノインターフェイスを用いた新規セルアレイの開発 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月, 山口 岩永進太郎, 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 酒井清孝, 岡野光夫
講演	Shintaroh IWANAGA, Yoshikatsu AKIYAMA, Akihiko KIKUCHI, Masayuki YAMATO, Kiyotaka SAKAI, Teruo OKANO: Development of A Novel Cell Array by Utilizing UV Excimer Laser Ablation Technique on Cell Nonadhesive Surfaces., Meeting of the Korean Society for Biomaterials, 2003 Sep., Korea