

UCST型ノニオン系ポリマーを表面修飾したガラス基板の 調製とHeLa細胞の温度刺激はく離

今城 明典*1, 伊藤 大時*1, 山田 康枝*2, 白石 浩平*2

Preparation of UCST types of nonion polymer modified glass and thermal stimuli-exfoliation of HeLa cells on the substrate

Akinori IMAJO*1, Taiji ITO*1, Yasue YAMADA*2, and Kohei SHIRAIISHI*2

Poly(acrylamide-co-acrylonitrile)[poly(AAm-co-AN)]with upper critical solution temperature (UCST) was grafted onto a glass substrate by surface initiated atom transfer radical polymerization(SI-ATRP). From the scanning probe microscope(SPM) measurements, poly-(AAm-co-AN) brushes were observed on the glass substrate(g-glass). The contact angle(θ) value of g-glass to water at 26°C increased from $\theta=21^\circ$ (the untreated glass) to $\theta=69^\circ$. On the other hand, that of g-glass at 40°C decreased from $\theta=69^\circ$ to $\theta=65^\circ$. After being HeLa cells attached and proliferated on the g-glass at 30°C under UCST of poly(AAm-co-AN) brushes, the HeLa cells attached were thermally exfoliated by increasing culture temperature over 37°C for 30 min in phosphate buffered saline(pH7.4). The % of mechanical and thermal stimuli-exfoliation of attached HeLa cells on the g-glass was about 90% despite of about 10% on untreated glass.

Keywords: Poly(acrylamide-co-acrylonitrile), Upper critical solution temperature (UCST), Surface initiated atom transfer radical polymerization(SI-ATRP), Thermal exfoliation, HeLa cells

1. はじめに

iPS細胞(induced pluripotent stem cells)やES細胞(embryonic stem cells)といった多能性幹細胞の実用化により難病疾患等に対する新たな治療法の開発や再生医療への応用また創薬スクリーニングが期待されている。しかし、iPS細胞等の多能性幹細胞の実用化には、作製効率の向上や細胞機能の精密診断、不用細胞の除去および目的細胞のみの非侵襲的な回収技術の開発等の様々な課題があるとされる。特に、細胞の培養及び回収技術の開発は、多能性幹細胞のみならず付着性細胞の研究においても重要な課題である。この課題解決には、細胞操作に係る素材や周辺機器あるいは器械も必要であり、ロボティクス技術を併用した自動化システムを用いた診断及び回収のハイスループット化・低コスト化・装置小型化等

の課題もある。また、現在使用されているフローセルソータ等の細胞の診断及び選択的な回収装置は前処理操作等を含めて煩雑であるとされ、高精度で細胞を回収するためには熟練した技術者が必要とされる等、バイオ医療支援機器として普及するには多くの課題が残されている。従って、安全であり、安価でバイオ系技術者の熟練した技術を必要としない簡便な操作で行えるツールの開発が求められている。

現在、細胞診断を多検体同時に、かつハイスループットに行なえるツールとして細胞マイクロアレイ(μ Ay)が注目されている^{(1),(2)}。特に、 μ Ay上へ細胞を等間隔に配置する手法は、機能解析のためのツールとして注目されており、創薬のための薬剤スクリーニング⁽³⁾⁻⁽⁵⁾、医薬品や化学物質などの有用性や安全性の評価⁽⁶⁾⁻⁽⁸⁾、細胞の分

原稿受付 2015年5月8日

*1 近畿大学大学院 システム工学研究科 システム工学専攻 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

E-mail 1344830001f@hiro.kindai.ac.jp

*2 近畿大学大学院 システム工学研究科 システム工学専攻, 工学部 化学生命工学科 教授, 次世代基盤技術研究所 教授 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番)

E-mail siraisi@hiro.kindai.ac.jp

連絡先: 白石浩平 (研究代表者)

化誘導因子や遺伝子群のスクリーニング⁽⁹⁾⁻⁽¹¹⁾など μAy の可能性は大きい。また、細胞機能の診断では、従来までは多くの細胞から一括で得ていた情報を、一個あるいは数個の限られた細胞毎に得られる。細胞接着面と非接着面を定序的に配列した μAy は細胞の精密な診断ツールとしての機能を有していると考えられる。著者らは、凹部を細胞接着面のガラススポット、凸部を細胞非接着面の金素材とした μAy を用いて、個細胞の診断及び非侵襲的かつ選択的に回収し得る技術の開発を行なっている^{(12),(13)}。このとき非侵襲的な細胞回収機能を与えるため、温度応答性ポリマーの固定化を検討している。下限臨界共溶温度(LCST)型温度応答性ポリマーは、溶液中の温度変化で親・疎水性が、相転移温度を境に低温(親水性)⇔高温(疎水性)と可逆的に変化する。LCST型ポリマーを表面に固定化した素材は、接着細胞の培養温度を低下させ非侵襲的に細胞回収する方法として実用化されており^{(14),(15)}、 μAy を用いた細胞の選択的回収への応用を進めている。一方、LCST型ポリマー固定化 μAy 上での選択的な回収では、装置が複雑となり μAy スポットの局所を冷却するか、レーザー光で不用細胞を予め除去したのち、 μAy 全体を冷却して目的細胞を回収する方法を開発している⁽¹⁴⁾。本 μAy では目的細胞が極少数の場合に応用がしにくいことから、LCST型ポリマーと逆の高温で親水性を示し低温で疎水性を示す上限臨界共溶温度(UCST)型温度応答性ポリマー^{(16),(17)}を用い、 μAy スポットに固定化して、高精度な位置決めCWレーザー光照射による局所加温による選択的な回収の基礎的な知見を得るため、 μAy スポットと同じガラス面にUCST型ポリマーを表面開始原子移動ラジカル重合法⁽¹⁸⁾による固定化を試みた。ここでは、細胞培養時培地組成によるUCSTへの影響が少ないと考えるノニオン構造のアクリルアミドとアクリロニトリルの共重合体であるPoly(acrylamide-co-acrylonitrile) [poly(AAm-co-AN)]⁽¹⁹⁾を選択し、poly(AAm-co-AN)固定化ガラス(g-glass)上でHeLa細胞を培養後および加温による離を未修飾ガラス等と比較検討した。

2. 実験方法

2.1 試薬

硫酸(和光純薬(株)製)、過酸化水素(和光純薬(株)製)、3-アミノプロピルトリメトキシシラン(東京化成(株)製)、N,N-ジメチルホルムアミド(脱水)(DMF)(和光純薬(株)製)、トリエチルアミン(和光純薬(株)製)、アクリルアミド(AAm)(和光純薬(株)製)、アクリロニトリル(AN)

(東京化成(株)製)、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(和光純薬(株)製)、臭化銅(I)(CuBr(I))(和光純薬(株)製)、ジメチルスルホキシド(DMSO)(和光純薬(株)製)、N,N,N',N'',N'''-ペンタメチルジエチレントリアミン(PMDETA)(和光純薬(株)製)、L-アスコルビン酸(和光純薬(株)製)、2-ブロモイソブチルブロミド(BiBB)(東京化成(株)製)は市販品をそのまま用いた。メタノール、トルエンの溶媒も市販品をそのまま用いた。純水はMILLIPORE製MILL-Q Synthesis A10超純水製造装置を用いて精製して使用した。カバーガラスはMicroscope Cover Glass($\phi=12$ mm)(Fisher Scientific製)をそのまま用いた。Minimum Essential Medium(MEM)(GIBCO製)、牛胎児血清(FCS)(GIBCO製)は常法に従って調整して用いた。非必須アミノ酸(NEAA)はそのまま用いた。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.4)は常法に従って調整して用いた。0.25% Trypsin は常法に従って調整して用いた。滅菌水は純水をオートクレーブ滅菌して用いた。

2.2 AAm/AN 共重合体 グラフト化 ガラス [poly(AAm-co-AN)-g-glass]の調製

ガラス製シャーレを用い、ピランハ溶液[30%過酸化水素/18 M 硫酸=1/3(v/v)]1.6 mLにカバーガラスを入れ1 h 浸漬し、水でカバーガラスを洗浄した後、エアーコンプレッサーで空気を吹き付けて乾燥した。洗浄後、0.179 g (1 mmol) 3-アミノプロピルトリメトキシシランのDMF溶液2 mLが入ったガラス製スクリー管にカバーガラスを入れ、60°C、3 h 反応した。その後、メタノールで表面を洗浄し、80°C、4 h 乾燥器で焼き付け・乾燥を行った。焼き付け後、メタノールで超音波洗浄10 min行った。ガラス製スクリー管にトリエチルアミン0.0174 g (0.146 mmol)とDMAP 0.00176 g (0.0144 mmol)をトルエン2 mLに溶解した。そのトルエン溶液にアミノ基修飾カバーガラスを浸し、シリコン製キャップで密閉し4°Cで冷却した。次に、ATRP開始剤BiBB 0.0465 g (0.202 mmol)の247.5 μL トルエン溶液を調整し、ディスプレイ用シリンジを用いてこの溶液を徐々に滴下し、30 min 冷却を行った後、25°C、4 h 反応した。反応終了後、メタノールおよびトルエンに浸し、室温で15 min 超音波洗浄した。ガラス製スクリー管にAAm 0.119g (1.67 mmol)、AN 0.018 g (0.332 mmol)、CuBr(I) 0.010 g (0.0697 mmol)、PMDETA 0.121 g (0.697 mmol)、L-アスコルビン酸 0.123 g (0.697 mmol)を加えDMSO 2 mLに溶解した。そのDMSO溶液にBiBBを固定化したカバーガラスを浸し、40°C、6 h 重合を行った。反応終了後、

メタノールおよび水で超音波洗浄を行い、真空乾燥し、poly(AAm-co-AN)-g-glass を得た。

2.3 g-glass 表面のキャラクタリゼーション

水に対する接触角は温度調節ステージ付きの Erma 光学社製ゴニオメーター式接触角測定機 G-1 型を用いて測定した⁽²⁰⁾。このとき、熱電対をステージ上に接触させ表面温度を計測しながら $\pm 0.1^\circ\text{C}$ で温度調節した。ステージ温度を 26°C とした後、基板上に $3\ \mu\text{L}$ の水滴を置いた。1 min 以内に水滴の左右の接触角を測定した。測定は計 5 回のうち、最大値および最小値を除いた平均を接触角とした。また測定温度を 40°C に上昇させ同様の操作を行い、 40°C での接触角の測定を行った。また、走査型プローブ顕微鏡(SPM)の測定は Shimadzu 製 SPM-9500J3 型(カンチレバーに Innovation Solutions Bulgaria Ltd. 製 Budget sensors Tap300AI-G)を用い、大気雰囲気中で、走査範囲： $30\ \mu\text{m}\times 30\ \mu\text{m}$ 、走査速度： $0.5\ \text{Hz}$ とし、位相検出システムによる表面の高低測定から評価した。

2.4 HeLa 細胞の接着と増殖

調製した g-glass は光学フィルム固定用透明両面テープ HJ-3160W (日東電工 (株)) をグラフト面の裏面に貼り付け、g-glass を 4 ウェルのマルチディッシュ (ウェルサイズ $\phi 15\ \text{mm}$: PS) (Nunc) に固定化した。クリーンベンチ中で固定した g-glass 表面をオートクレーブ滅菌済の滅菌水にて 1 mL で 3 回洗浄した。その後、クリーンベンチ中の UV 滅菌灯下約 30 cm の距離にマルチディッシュの蓋を開けて静置、g-glass 表面を 1 h UV 照射して滅菌した。HeLa 細胞を 10% FCS, 1% NEAA 含有 MEM 培地で培養した。その後、HeLa 細胞は 1 mL の Trypsin 溶液 ($2.5\ \text{mg mL}^{-1}$) を添加してはく離した。HeLa 細胞は浮遊細胞濃度を ($3.0\times 10^4\ \text{cells mL}^{-1}$) に調製後、 $800\ \mu\text{L}$ を上記 g-glass 上を固定化したウェルに加え、インキュベーター (APC-50D : アステック) 5% 二酸化炭素雰囲気下 30°C 、24 h 培養した。

2.5 HeLa 細胞の温度刺激によるはく離と細胞計測

2.4 節に従って HeLa 細胞を培養後、g-glass 上に接着をしていない HeLa 細胞を除去するため、PBS を用いて非接着細胞を 1 回洗浄した後、倒立型リサーチ顕微鏡 (IX71 : OLYMPUS) で観察し、顕微鏡デジタルカメラ (DP72-BSW) を用いて撮影した。その後、温度刺激によるはく離を行うため、温度が 37°C 設定のインキュベーター (SCA-165D : アステック) に g-glass を固定しているマルチディッシュを移し 30 min 静置した。静置後、 $800\ \mu\text{L}$ の PBS を用い、3 回洗浄してはく離細胞を除去し、ガラス上に残存する接着細胞数を倒立型リサーチ顕微鏡

(IX71 : OLYMPUS) で観察し、顕微鏡デジタルカメラ (DP72-BSW) を用いて撮影した。細胞数の計測は、倒立型リサーチ顕微鏡 (IX71 : OLYMPUS) の観察から見積もった。細胞は異なる 5 箇所の顕微鏡視野をデジタル画像として保存後、細胞数を計測した。その平均値を接着細胞数とした。一方、加温によるはく離操作後、上澄みを取り除き、残存する接着細胞数を同様計算した。はく離率 (%) は接着細胞数との差から算出した。

3. 結果と考察

3.1 Poly (AAm-co-AN) グラフト化ガラスの調製と表面キャラクタリゼーション

細胞培養およびはく離基材としての応用さらには CW レーザー照射機を用いた局所的な加温による細胞の選択的なはく離・回収を目的とし、UCST を示す poly(AAm-co-AN)-g-glass の調製を表面開始原子移動ラジカル重合法により試みた。表面開始重合後のガラス表面の poly(AAm-co-AN) の修飾を確認するため、大気雰囲気下での表面での SPM 測定 ($30\ \mu\text{m}\times 30\ \mu\text{m}$) の結果を Fig.1 に示す。未処理ガラスでは凹凸が無くフラットであることに対し、poly(AAm-co-AN) をグラフト重合した g-glass ではそれぞれ、これらにポリマー由来と考えられるナノスケールでのブラシ状の凹凸が表面上に観察された。次に、g-glass の水に対する接触角 (θ) を測定した結

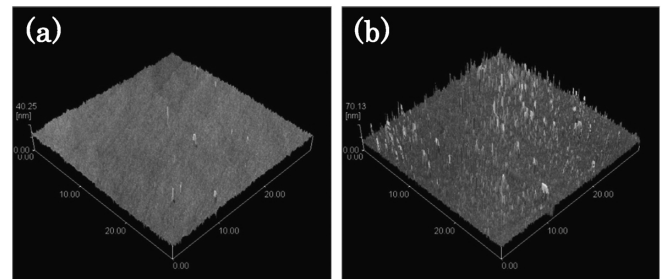


Fig.1 SPM image of glasses: (a) Untreated, (b) g-glass.

果、ステージ温度 26°C では未処理ガラスの $\theta=21^\circ$ に対して poly(AAm-co-AN) を修飾した g-glass では $\theta=69^\circ$ となり poly(AAm-co-AN) 固定化により θ が増大し、ガラス表面が疎水性に変化したことを認めた。一方、ステージ温度を 40°C に上げ測定した θ は未処理ガラスは変化しないのに対し、g-glass では $\theta=65^\circ$ と温度上昇によって、表面の濡れ性が増大して親水性と変化した。これは、ガラス表面にグラフトした poly(AAm-co-AN) が UCST 以上となり、ポリマー鎖がグロビュール状からランダムコイル状へと変化し、表面の濡れ性が疎水性から親水性へと変化したためと考えられる。

3.2 g-glass 表面での細胞培養と温度刺激によるはく離

3.1 節で温度刺激により親・疎水性が変化し、SPM 測定により表面性状の変化を認めた g-glass 上の細胞培養ならびに加温によるはく離性能を知るため、未処理ガラスと g-glass 表面での HeLa 細胞を用いた細胞培養と加温による温度刺激はく離を検討した。4 ウェルの培養シャーレに直径 12 mm の g-glass および未処理ガラスをウェル上に透明両面テープで貼り付けた。UV 滅菌後、 3.0×10^4 cells mL⁻¹ の HeLa 細胞を播種後、24 h 経過後の位相差顕微鏡写真を Fig.2 に示す。図から 30°C で HeLa

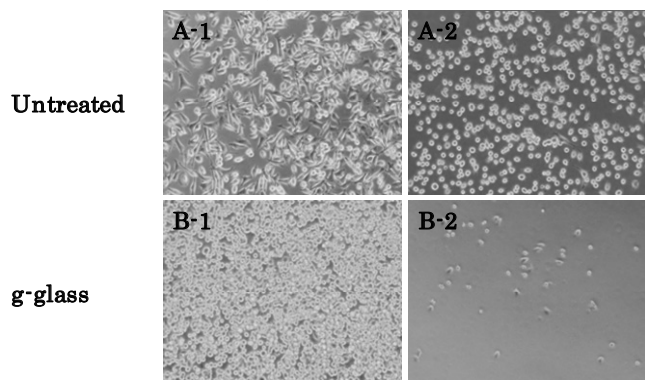


Fig.2 Phase-contrast microscope observation of HeLa cells attached glasses; (A)30°C and (B) 37°C.

細胞は g-glass 上にガラス基板上と同様に接着・伸展し増殖可能であった。次に、加温により表面が疎水性から親水性への応答を認めた g-glass を用いて、接着細胞のはく離実験を行った。培養後、PBS(25°C)洗浄を 1 回行い、基板への未接着の細胞を取り除き、37°C のインキュベーターに g-glass を接着固定している 4 ウェルマルチディッシュを移し、30 min 静置した。次に、PBS(25°C)で 3 回洗浄し、はく離を行った。加温による HeLa 細胞のはく離率を未処理ガラスと併せて、接着残存する細胞数から見積もったはく離細胞数の割合を Fig.3 に示す。g-glass ははく離率約 98% と未処理ガラス (はく離率 9%) よりも 90% 程度上昇した。これにより、UCST を示す poly(AAm-co-AN) グラフト鎖の固定化により、UCST 以下の温度で接着した HeLa 細胞は UCST 以上に加温することによりはく離を促進する効果を認めた。以前研究を行っていた UCST を示す両性イオン型 (2-メタクリロイルオキシ) エチルジメチル-3-スルホプロピルアンモニウムヒドロキシド(SBMA)^{(21),(22)} 鎖を固定化したガラス基板を用いた同様の実験では UCST は示すが細胞を用いた温度刺激はく離では未処理ガラスと比べ劇的なはく離率向上は認められなかった。これは両性イオン型 UCST ポ

リマーがポリマー鎖長及び媒体の塩等に大きく影響を受

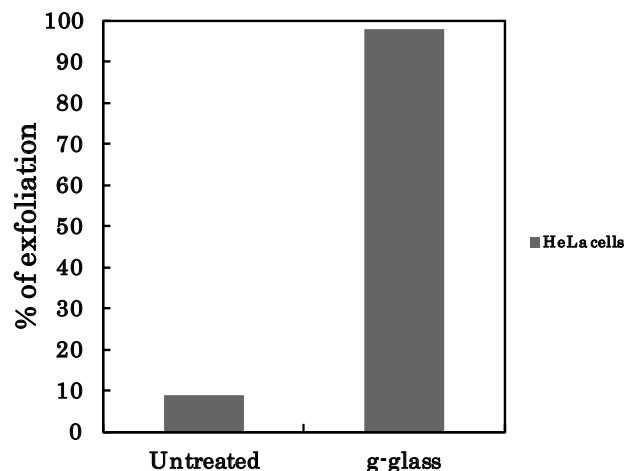


Fig.3 Mechanical and thermal stimuli-exfoliation of HeLa cells attached on g-glass at 37°C after cultivation at 30°C for 24 hr.

けると考えられているためである。そのため、塩が含まれている PBS 中では基板上に固定化されたポリマーが塩により相転移挙動の影響を受けたため UCST 機能を発揮できなかったと考えられる。今回使用したノニオン型 UCST ポリマーはそのような影響を受けることがないため、はく離率の飛躍的な向上につながったと考えられる。また、温度応答性ポリマー鎖固定化表面はポリマー鎖の密度や分子量に大きく影響を受けることから⁽²³⁾、細胞種の違いによる細胞接着及びはく離に最適な性状に固定化ポリマー鎖を今後調整する必要があると考えられる。

4. まとめ

①SPM 測定および水の接触角の測定結果により、表面開始原子移動ラジカル重合法によってガラス基板表面に poly(AAm-co-AN) の固定化を認めた。

②poly(AAm-co-AN) を固定化したガラスは 26°C から 40°C に加温により接触角が低下し表面が疎水性から親水性に変化する UCST 性を示した。

③ HeLa 細胞を用いた接着・はく離試験では、poly(AAm-co-AN) 修飾ガラス基板は、30°C では細胞がガラス基板表面に接着・増殖した。poly(AAm-co-AN) 固定化ガラスは 37°C へ温度を上昇することによる細胞のはく離率の向上を認めた。

以上の結果から、UCST を示すノニオン型ポリマーの固定化により、加温による温度刺激により細胞はく離が可能であると考えられる。接着細胞のはく離率のさらなる向上のためには、固定化ポリマーの鎖長、密度、組成

等さらにははく離時の温度等の最適化が必要である。

加温によるはく離性能の確立によって、UCST 型ポリマー固定化 μ Ay と CW レーザー照射機を用いたシステムによって目的細胞の選択的なはく離・回収ツールの作製に応用ができると考えられる。

謝辞

本研究の一部は経済産業省地域イノベーション創出開発事業及び戦略的基盤技術高度化推進事業の支援によるものであり、ここに謝意を表します。

参考文献

- (1) 斉藤通紀ら, 遺伝子医学 MOOK, **10**, (2008), 62.
- (2) 伊藤嘉浩, “マイクロアレイ・バイオチップの最新技術シーエムシー出版, (2007), 273.
- (3) F. J. Wu. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng*, **50**, (1995), 404.
- (4) S. N. Bailey *et al.*, *Drug Discovery Today*, **7(18)**, (2002), 113.
- (5) S. N. Bailey, *et al.*, *PNAS*, **101**, (2004), 16144.
- (6) G. L. Maria Jose *et al.*, *Chemico-Biological Interactions*, **168**, (2007), 30.
- (7) R. Roguet *et al.*, *ATLA*, **27**, (1999), 333.
- (8) K. Schlotmann *et al.*, *International Journal of Cosmetic Science*, **23**, (2001), 309.
- (9) J. Ziauddin *et al.*, *Nature Biotechnology*, **411**, (2001), 107.
- (10) T. Yoshikawa *et al.*, *Journal of Controlled Release*, **96**, (2004), 227.
- (11) E. Uchimura *et al.*, *Cytometry Research*, **14**, (2004), 39.
- (12) 古屋智子ら, 「セルアレイシステムの開発と応用」, Bio ベンチャー, **7-8**, (2004), 14.
- (13) K. Shiraishi *et al.*, *J. Photo. Polym. Sci. & Tech*, **24(4)**, (2011), 447.
- (14) 白石浩平ら, 近畿大学工学部研究報告, **47**, (2013), 7.
- (15) T. Okano *et al.*, *Biomaterials*, **21**, (2000), 981.
- (16) 大西徳幸ら, *Polym. Prepr. Jpn.* **47**, (1998), 2359.
- (17) J. Seuring *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.* **33**, (2012), 1.
- (18) M. Krzysztow *et al.*, *Langmuir*, **23**, (2007), 4528.
- (19) J. Seuring *et al.*, *Macromolecules*, **45**, (2012), 3910.
- (20) K. Sugiyama *et al.*, *Macromol. Chem. Phys*, **199**, (1998), 1201.
- (21) Ai T. Nguyen *et al.*, *Langmuir*, **28**, (2012), 604.
- (22) Yu-Ju Shih *et al.*, *Langmuir*, **26**, (2010), 17286.
- (23) H. Takahashi *et al.*, *Biomacromolecules* **11**, (2010), 1991.