

UCST型スルホベタイ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

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

研究代表者 大学院システム工学研究科*1 教授 白石 浩平
Kohei Shiraishi
共同研究者 大学院システム工学研究科*1 教授 山田 康枝
Yasue Yamada
大学院システム工学研究科*1 大学院生 今城 明典
Akinori Imajo
大学院システム工学研究科*1 大学院生 伊藤 大時
Taiji Ito
大学院システム工学研究科*1 大学院生 農宗 辰己
Tatsuki Nousou

Poly { 2-[(Methacryloyloxy) ethyl] dimethyl - (3-sulfopropyl) ammonium hydroxide } [poly (SBMA)] with upper critical solution temperature(UCST) was grafted onto a glass substrate by surface initiated radical polymerization. From the scanning probe microscopy(SPM) measurements, poly(SBMA) brushes were observed on the glass substrate(g-glass). From the contact angle(θ) measurements to water at 26°C, the θ values of g-glass increased from $\theta=21^\circ$ (the untreated glass) to $\theta=54^\circ$. On the other hand, the θ values at 40°C, the θ values of g-glass decreased from $\theta=54^\circ$ to $\theta=45^\circ$. After being HeLa cells attached and proliferated on the g-glass at 30°C under UCST of poly(SBMA) brushes, The HeLa cells attached were thermally exfoliated by increasing culture temperature over 37°C for 2 h. The number of thermal exfoliation of HeLa cells on the g-glass was higher than that on untreated glass.

Keywords: 2-[(Methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide, Upper critical solution temperature (UCST), Surface initiated polymerization, Thermal exfoliation, HeLa cells

1. はじめに

幹細胞を用いる工学分野の研究開発が創薬スクリーニングや再生医療への応用の観点から活発化している。とくに、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞: induced pluripotent stem cells)⁽¹⁾の作製技術の確立は、患者自身の iPS 細胞から分化誘導した細胞を活用して、オーダーメイド創薬及び拒絶反応のない臓器作製等が現実化している^{(2),(3)}。しかし iPS 細胞等、幹細胞の実用化には、①iPS 細胞作製の高効率化、②細胞機能の精密診断、③iPS 細胞作製時または細胞分化誘導時の不用細胞の除去、④目的細胞の選択的・非侵襲的な回収等の課題も少なくない。課題解決のためには、細胞操作に係る素材や周辺機器あるいは器械も必要で、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・装置小型化等の必要がある。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^{(4),(5)}。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⁽⁶⁾⁻⁽⁸⁾、医薬品や化学物質などの有用性や安全性の評価⁽⁹⁾⁻⁽¹¹⁾、細胞の分化誘導因子や遺伝子群のスクリーニング⁽¹²⁾⁻⁽¹⁴⁾など μ Ay 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。したがって細胞接着面と非接着面を定序的に配列した μ Ay 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

*原稿受付 2014年5月12日

*1 〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番

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

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^{(15),(16)}。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^{(17),(18)}、 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⁽¹⁷⁾。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^{(19),(20)}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型ポリマーの表面開始ラジカル重合法による固定化を試みた。ここでは、生体適合性材料あるいは生体物質の接着抑制効果も示す素材⁽²¹⁾で接着細胞へのダメージの軽減と接着性制御が容易と考えられる両性イオン構造 Poly { 2-[(Methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide } [poly (SBMA)] を UCST ポリマー⁽²²⁾として選択し、poly (SBMA)固定化ガラス(g-glass)上 HeLa 細胞を培養および加温によるはく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)、(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サイド(SBMA)(Sigma-ALDRICH製)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸クロライド)(V501-Cl)は4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)(V501)(和光純薬(株)製)と五塩化リン(PCl_5)(キシダ化学(株)製)から合成した。エタノール、クロロホルムの溶媒は、常法にしたがって精製した。メタクリル酸 n-ブチル(BMA)(和光純薬(株)製)は[60°C/30 mmHg]で減圧蒸留して用いた。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 Poly(SBMA)グラフト化[poly(SBMA)-g-glass] SBMA/BMA 共重合体グラフト化ガラス [poly(SBMA-co-BMA)-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)]2 mLにカバーガラスを入れ1 h 浸漬し、純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 mM) 3-アミノプロピルトリメトキシシランのDMF溶液1 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、DMF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、エ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アゾ開始剤 0.0315 g (0.1 mmol)V501-Clを1 mLのクロロホルムに溶解し、30.6 μL トリエチルアミンを加えた。その混合したクロロホルム溶液にカバーガラスを浸し、恒温槽で30°C、20 h 反応した。反応終了後、メタノールに浸し、室温で25 min 超音波洗浄した。ガラス製スクリー管にSBMA 0.264 g(0.4725 M)、純水とエタノールをそれぞれ0.674 mL、1.326 mLの混合溶液2 mLに調製したものを加え、V501-Clを固定化したカバーガラスを浸し、液体窒素浴中で凍結-脱気-窒素置換を3回繰り返した後、80°Cで20 h 重合した。反応終了後、純水に浸し、80°Cの恒温槽で30 min 振とう洗浄した後、10 min 超音波洗浄を行い、真空乾燥し、poly(SBMA)-g-glass(g-glass-1)を得た。上記と同様の手法を用い BMA との共重合体ガラスも調整した。ここにSBMAに対し、BMAをSBMA:BMA=99:1のモル比に調整し、poly(SBMA-co-BMA)-g-glass(g-glass-2)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⁽²³⁾。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1 μL 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 μm ×30 μm 、走査速度：0.5 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 800 μL で 3 回洗浄し、70%エタノール (w/v)800 μL で 1 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。滅菌後、PBS 800 μL で 2 回洗浄を行った。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 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 μL を上記 g-glass 上に固定化したウェル上加え、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、倒立型ルーチン顕微鏡 (CKX31 : 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、予め、温度を 37°C に設定しておいたサーモプレート (FTP-28190 : AZ ONE)に g-glass を固定しているマルチディッシュを 2 h 静置した。静置後、800 μL 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ルーチン顕微鏡 (CKX31 : 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、倒立型ルーチン顕微鏡 (CKX31 : OLYMPUS)の観察から見積もった。細胞は異なる 5 箇所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、計測した。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 (SBMA) と poly (SBMA-co-BMA) グラフト化ガラス (g-glass) 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(SBMA) および poly(SBMA-co-BMA)-g-glass の調製を表面開始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(SBMA)と poly(SBMA-co-BMA)の修飾を確認するため、大気雰囲気下での表面の SPM 測定(30 μm ×30 μm)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に対し、poly(SBMA)と poly(SBMA-co-BMA)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、

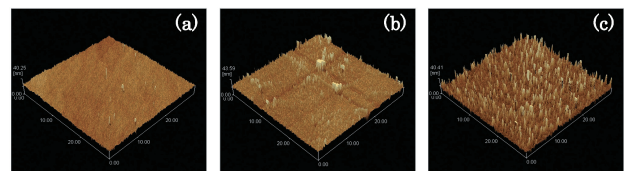


Fig.1 SPM image of glasses; (a)Untreated, (b)g-glass-1, and (c) g-glass-2.

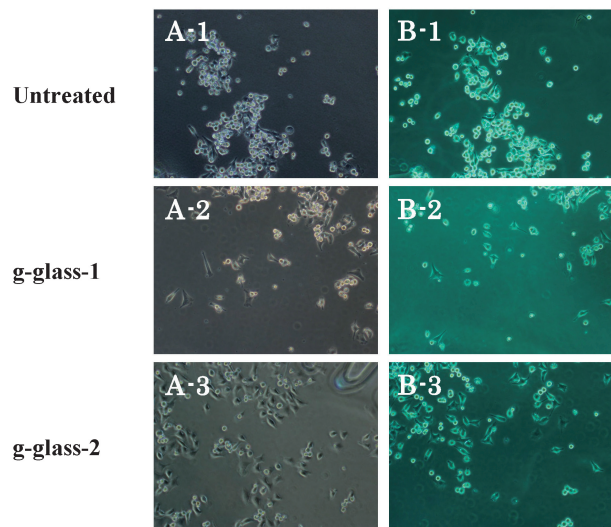


Fig.2 Phase-contrast microscope observation of HeLa cells attached glasses; (A)30°C and (B) 37°C.

g-glass の水に対する接触角(θ)を測定した結果、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(SBMA)を修飾した g-glass-1 では $\theta=54^\circ$ となり poly(SBMA)固定化により θ が増大し、ガラス表面が疎水性へと変化したことを認めた。また、BMA を共重合した g-glass-2 は同様に $\theta=58^\circ$ となり疎水性の増加を認めた。 θ は g-glass-1 より g-glass-2 が増加し、BMA セグメント

の導入によって、表面の疎水性が増大した。

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-1 では $\theta=45^\circ$, g-glass-2 では $\theta=49^\circ$ と温度上昇によって、表面の濡れ性が増大して親水性へと変化した。これは、ガラス表面にグラフトした poly(SBMA) および poly(SBMA-co-BMA) が UCST 以上となり、それぞれのポリマー鎖がグロブユ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によるはく離を検討した。4 well 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 well 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 細胞 g-glass-1,2 いずれも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 回を行い、基板への未接着の細胞を取り除き、37°C のホットプレート上に g-glass を接着固定している 4 well マルチディッシュを移し、2 h 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-1 ははく離率約 40% と未処理ガラス(はく離率 24%)よりも 15% 程度上昇した。一方、g-glass-2 のはく離率(14%)は g-glass-1 および未処理ガラスよりもはく離率は低下した。一方、UCST を示す poly(SBMA) 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。一方、poly(SBMA-co-BMA) 固定化ガラスでは未処理ガラスよりはく離率は低下し、本性能が低い。両性イオン型 SBMA 鎖の示す UCST はポリマー鎖長及び媒体の塩等に大きく影響を受けると考えられる。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⁽²⁴⁾、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調整する必要があると考えられる。また、g-glass-2 では、はく離率が未処理ガラスよりも低く、共重合した BMA セグメントによる疎水性の影響等が考えられるため、UCST 温度のみならず固定化時の表面の親・疎水性についても検討する必要がある

あると考えられる。

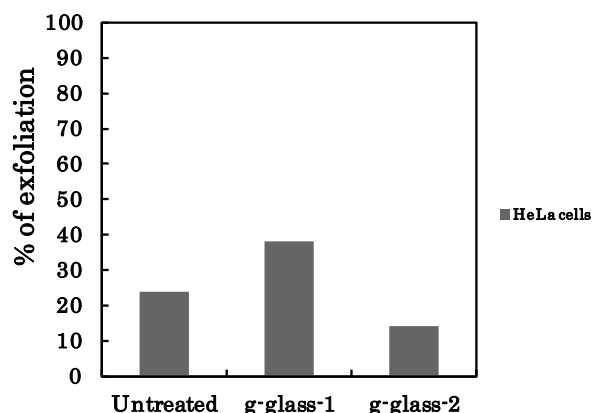


Fig.3 Number of exfoliated HeLa cells at 37°C.

4. まとめ

①SPM 測定および、水の接触角の測定結果により、表面開始ラジカル重合法によってガラス基板表面に poly(SBMA)あるいは poly(SBMA-co-BMA)の固定化を認めた。

②poly(SBMA)あるいは poly(SBMA-co-BMA)を固定化したガラスは 30°C から 40°C の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(SBMA)または poly(SBMA-co-BMA)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(SBMA)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 を示すポリマーの固定化と、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を向上させるためには、固定化ポリマーの鎖長、密度、組成さらには、はく離時の温度等のさらなる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) S. Yamanaka *et al.*, *Cell*, **126** (4), (2006), 663

- (2) M. Oshimura *et al.*, *PLoS ONE*, **10(6)**, (2011), e25961
- (3) M. Katoh *et al.*, *BMC Biotechnology*, **10**, (2010), 37
- (4) 齊藤通紀ら, 遺伝子医学MOOK, **10**, (2008),62-71
- (5) 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)
- (6) Wu.F.J *et al.*, *Biotechnol.Bioeng.*, **50**, (1995), 404
- (7) Bailey, S. N *et al.*, *Drug Discovery Today*, **7(18)**, (2002),113
- (8) Bailey, S. N *et al.*, *PNAS*, **101**, (2004),16144
- (9) Maria Jose G. L. *et al.*, *Chemico-Biological Interactions*, **168**, (2007), 30
- (10) R. Roguet *et al.*, *ATLA*, **27**, (1999), 333
- (11) K. Schlotmann *et al.*, *International Journal of Cosmetic Science*, **23**, (2001), 309
- (12) J. Ziauddin *et al.*, *Nature Biotechnology*, **411**, (2001),107
- (13) T. Yoshikawa *et al.*, *Journal of Controlled Release*, **96**, (2004), 227
- (14) E. Uchimura *et al.*, *Cytometry Research*, **14**, (2004), 39
- (15) 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
- (16) K. Shiraishi *et al.*, *J. Photo.Polym. Sci. & Tech.*, **24(4)**, (2011), 447
- (17) 白石浩平ら, 近畿大学工学部研究報告, **47**, (2013), 7
- (18) T. Okano *et al.*, *Biomaterials*, **21**, (2000), 981
- (19) 大西徳幸ら, *Polym. Prepr. Jpn.* **47**, (1998),2359
- (20) J. Seuring *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.* (2012),1
- (21) Ai T. Nguyen *et al.*, *Langmuir*; **28**, (2012),604
- (22) Yu-Ju Shih *et al.*, *Langmuir*; **26**, (2010), 17286
- (23) K. Sugiyama *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, (1998), 1201
- (24) H.Takahashi *et al.*, *Biomacromoleules* **11**, (2010), 1991