

86	細胞組織作製の革新的効率化を起こす機能性界面の創製	長瀬 健一
----	----------------------------------	-------

【目的】近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の開発により、治療に用いる細胞を人為的に作製することが可能となり、細胞を用いた再生医療が加速的に発展しつつある。治療に用いる細胞を調製・作製する際には、細胞分離、分化誘導、細胞組織作製といった細胞操作が必要である。特に、細胞の活性や性質を失わずに細胞を精製する細胞分離法が必要とされている。そこで本研究では、温度応答性高分子であるポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) を用いた機能性界面による革新的な細胞分離法を開発した。

【方法】ガラス基板に原子移動ラジカル重合 (ATRP) の開始剤を修飾し、その後、NIPAAm、*tert*-ブチルアクリレート (tBA)、*tert*-ブチルアクリルアミド (tBAAm) を 2-プロパノールに溶解させ、ATRP により P (NIPAAm-*cot*tBA-*cot*tBAAm) 修飾ガラス基板を作製した。その後、*tert* ブチル基を脱保護し、P (NIPAAm-*cot*AAc-*cot*tBAAm) 修飾ガラス基板とした。作製したガラス基板にヒト血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト大動脈平滑筋細胞 (SMC) を播種し、37°Cでの接着挙動、20°Cでの脱着挙動を観察した。アミノプロピルシリカビーズ (粒子径 75~150 μm) に分級し、重合開始剤の V-501 を固定化した。エタノールに NIPAAm、正荷電を有する *N,N*-ジメチルアクリルアミド (DMAPAAm)、疎水性の *n*-ブチルメタクリレート (BMA)、*N,N*-メチレンビスアクリルアミド (BIS) を溶解させ、V-501 固定化シリカビーズを加え、70°Cで 5 時間反応させて、P (NIPAAm-*cot*DMAPAAm-*cot*BMA) 修飾シリカビーズを作製した。シリカビーズを固相抽出カラム (0.7×5.6 cm) に充填した。作製したカラムを用いて、HL-60、Jurkat の溶出挙動を 37°C、4°Cで観察した。

【結果】 P (NIPAAm-*cot*AAc-*cot*tBAAm) 修飾ガラス基板に HUVEC、SMC を播種し、37°Cでの細胞の接着、20°Cでの細胞の脱着を観察した。比較対称として、負電荷を含まない PNIPAAm 修飾ガラス基板を用いて同様の検討を行なった。アニオン性の P (NIPAAm-*cot*AAc-*cot*tBAAm) 修飾ガラス基板は、PNIPAAm 修飾基板と比較して、SMC の接着の向上と HUVEC の迅速な脱着が確認できた。この結果を基に HUVEC と SMC の混合懸濁液を播種したところ、37°Cで HUVEC、SMC の両細胞が接着し、温度を 20°Cに変化させると、HUVEC が迅速に脱着し、その後、SMC が徐々に脱着することがわかった。これらの結果より、アニオン性の温度応答性高分子を用いることで、HUVEC、SMC の接着挙動、脱着挙動の違いを大きくし、細胞分離に応用できる可能性が示された。37°Cでカラムに HL-60、Jurkat を負荷したところ、HL-60、Jurkat とともに溶出してこなかった。一方、4°Cでの溶出では、HL-60 は溶出してこないが、Jurkat は溶出することがわかった。この原因を調べるため、HL-60、Jurkat の細胞表面のゼータ電位を測定したところ、HL-60 の方が Jurkat よりも負に帯電していることがわかった。これにより、HL-60、Jurkat の溶出挙動の違いは細胞膜表面の静電的性質の違いに起因すると示唆された。そこで、HL-60 と Jurkat の混合懸濁液をカラムに負荷したところ、温度 4°Cで回収した細胞は Jurkat を多く含むことがわかった。これにより、作製したカラムに温度変化を与えることで、細胞表面の電荷の違いにより細胞を分離できることがわかった。

機能性界面を用いた温度制御型細胞分離システム

