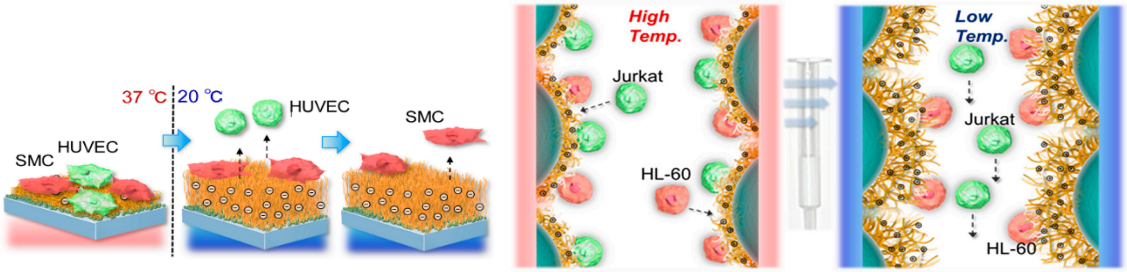
86　細胞組織作製の革新的効率化を起こす機能性界面の創製	長瀬　健一

【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-*co*-tBA-*co*-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-*co*-AAc-*co*-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℃での接着挙動、20℃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℃で 5 時間反応させて、P（NIPAAm-*co*-DMAPAAm-*co*-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℃、4℃で観察した。

【結果】P（NIPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板に HUVEC、SMC を播種し、37℃での細胞の接着、20℃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-*co*-AAc-*co*-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℃で HUVEC、SMC の両細胞が接着し、温度を 20℃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℃でカラムに HL-60、Jurkat を負荷したところ、HL-60、Jurkat ともに溶出してこなかった。一方、4℃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℃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



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

慶應義塾大学 薬学部 創薬物理化学講座

Key words：再生医療，組織工学，バイオマテリアル，温度応答性，バイオセパレーション

緒　言

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。これにより、今後は再生医療に用いる細胞を大規模に生産・加工する技術が必要不可欠である。治療に用いる細胞の作製・調製には細胞分離、分化誘導、細胞組織の作製といった細胞操作が必要である。通常、各種組織から細胞を採取する際には、様々な細胞群から目的細胞を採取しなくてはならず、目的細胞を分離・精製する技術が必要となる。また、iPS 細胞などの幹細胞から目的細胞に分化誘導する場合においても、目的細胞と未分化細胞、あるいは、目的細胞と他の細胞に分化誘導された細胞を分離する必要がある。しかし、現状の細胞分離技術は、細胞表面に修飾を施す必要があり、細胞が本来有する性質を損なう可能性がある。

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細胞分離法を開発した。PNIPAAm は体温に近い温度である 32℃を境に親水性・疎水性変化を起こすことが知られている［1～5］。この PNIPAAm の特性を利用して、PNIPAAm に負電荷を導入した温度応答性アニオン性高分子を修飾したガラス基板による細胞分離システムを開発した［6］。さらに大容量の細胞分離を行なうため、PNIPAAm に正電荷を導入した温度応答性高分子を修飾したビーズを充填した細胞分離カラムを開発した［7］。目的細胞と機能性界面の相互作用を温度変化のみで制御することで、細胞の活性を維持したまま、細胞の分離を行う革新的な細胞分離法を開発した。

方　法

1. 温度応答性アニオン性高分子修飾ガラス基板の作製

温度応答性アニオン性高分子修飾ガラス基板の作製は図 1 に示す工程により行った。ガラス基板（24 mm×50 mm：厚さ 0.2 mm）の表面をプラズマ照射により活性化し、トルエンに *m/p*-クロロメチルフェニルエチルトリメトキシシラン（CPTMS）を溶解した反応液に 25℃で 16 時間反応させることで、原子移動ラジカル重合（ATRP）の開始剤をガラス基板に修飾した。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、アルゴンガスを吹き込むことで溶存酸素を除去した。さらに ATRP の触媒である $CuCl_2$/Me_6TREN、アスコルビン酸を添加し、Activator ReGenerated by Electron Transfer （ARGET）-ATRP により P（NIPAAm-*co*-tBA-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板を作製した。その後、メタンスルホン酸のジクロロメタン溶液により tBA の *tert* ブチル基の脱保護により、P（NIPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板とした。作製した P（NIPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板に、血管を構成する細胞であるヒト血管内皮細胞（HUVEC）、ヒト大動脈平滑筋細胞（SMC）を播種し、37℃での接着挙動、20℃での脱着挙動を位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡により観察し、細胞の接着率を算出した。

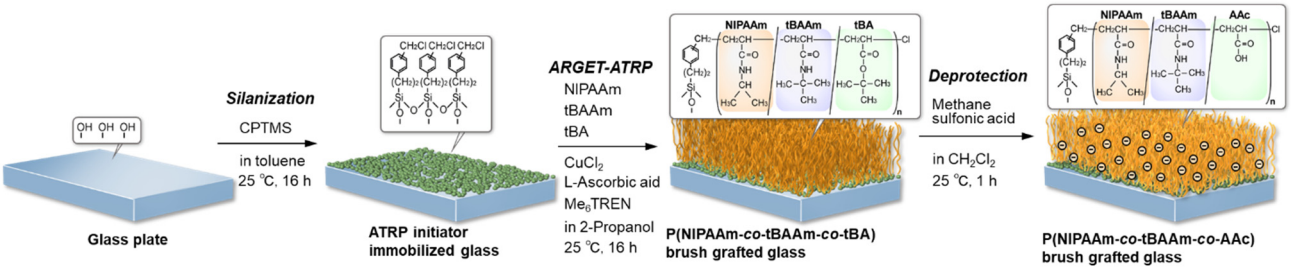


図 1. 温度応答性アニオン性高分子ブラシ修飾ガラス基板の作製

2. 温度応答性カチオン性高分子修飾シリカビーズ担体を用いた細胞分離カラムの作製

細胞分離カラムの充填剤の作製は図 2 に示す工程により行った。シリカビーズ表面にアミノプロピル基を有するアミノプロピルシリカビーズ（粒子径 64～210 μm）を 75～150 μm に分級した。ジメチルホルムアミド（DMF）を溶媒として用いて、重合開始剤の 4,4'-azobis（4-cyanovaleric acid）（V-501）をシリカビーズ表面のアミノプロピル基に 25 ℃で 6 時間反応させて固定化した。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、溶液に窒素ガスを吹き込んで溶存酸素を除去した後、70℃で 5 時間の重合反応により P（NIPAAm-*co*- DMAPAAm-*co*- 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 の二種類の細胞の溶出挙動を 37℃、4℃で観察した。それぞれの温度でカラムから流出した細胞懸濁液の細胞数、細胞生存率を生死細胞数計測装置にて測定した。

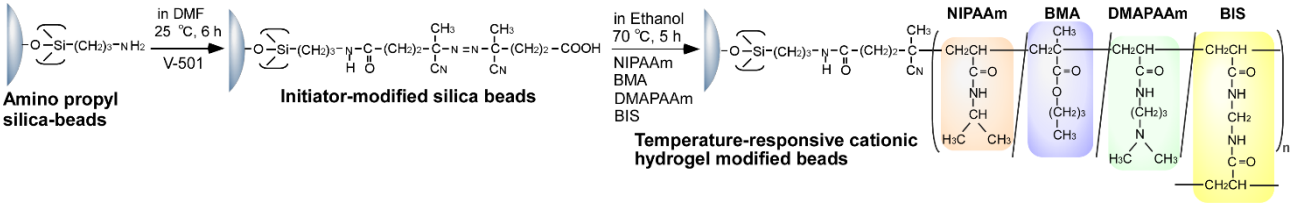


図 2. 温度応答性カチオン性高分子修飾ビーズの作製

結果および考察

1. 温度応答性アニオン性高分子修飾ガラス基板による細胞分離

P（NIPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板に HUVEC、SMC を播種し、37℃での細胞の接着、20℃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。37℃での細胞の接着では、アニオン性の P（NIPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板は、PNIPAAm 修飾基板と比較して、SMC の接着率が向上していることがわかった。また、20℃での細胞の脱着では、アニオン性の P（NIPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板は、PNIPAAm 修飾基板と比較して、HUVEC の脱着が促進された。これは、温度応答性高分子に導入されたカルボキシル基が 20℃での温度応答性高分子の水和を促進するためと考えられる。この特性を生かして、HUVEC と SMC を混合した細胞懸濁液を P（NIPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm）修飾ガラス基板に播種したところ、37℃で両細胞が接着し、20℃に温度を下げると HUVEC が迅速に脱着し、その後 SMC が徐々に脱着していることがわかった（図 3）。これにより、20℃に温度を下げた直後の細胞培養液から HUVEC を回収でき、その後、SMC を回収可能なことがわかった。これにより温度変化のみで細胞の分離が可能であることがわかった。

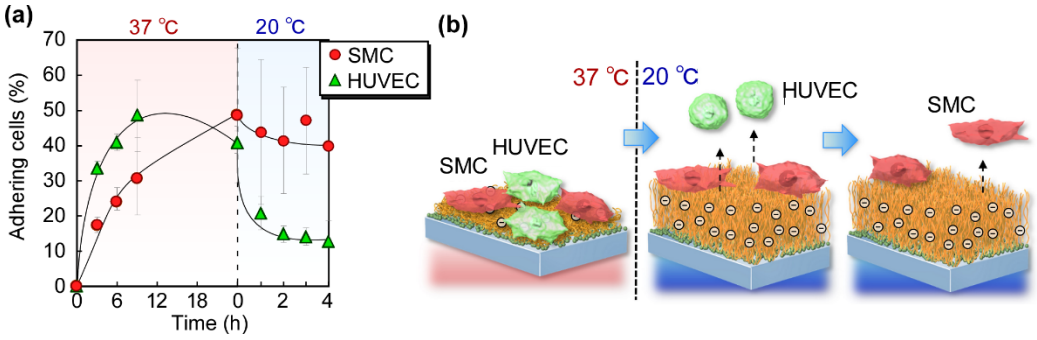


図 3. 温度応答性アニオン性高分子ブラシを用いた細胞分離

a) 37℃、20℃での細胞接着数の経時変化。

b) 細胞分離の模式図。

2. 温度応答性カチオン性高分子修飾シリカビーズ担体を用いた細胞分離カラムによる細胞分離

作製した温度応答性カチオン性高分子修飾ビーズをカラムに充填した。37℃でカラムに HL-60、Jurkat を負荷したところ、HL-60、Jurkat ともに溶出してこなかった。これは、細胞と温度応答性カチオン性高分子との疎水性相互作用、静電的相互作用によりカラム内に両細胞が保持されているためと考えられる。一方、4℃での溶出では、温度応答性カチオン性高分子が親水性になるため、疎水性相互作用が減弱し、保持されていた細胞が溶出する傾向が見られた。また、Jurkat と HL-60 の溶出率を比較すると Jurkat は HL-60 と比較して多くの細胞が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ものであることが示唆された。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℃で回収した細胞は Jurkat を多く含むことがわかった（図 4）。これにより、作製したカラムに細胞の懸濁液を負荷し、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。

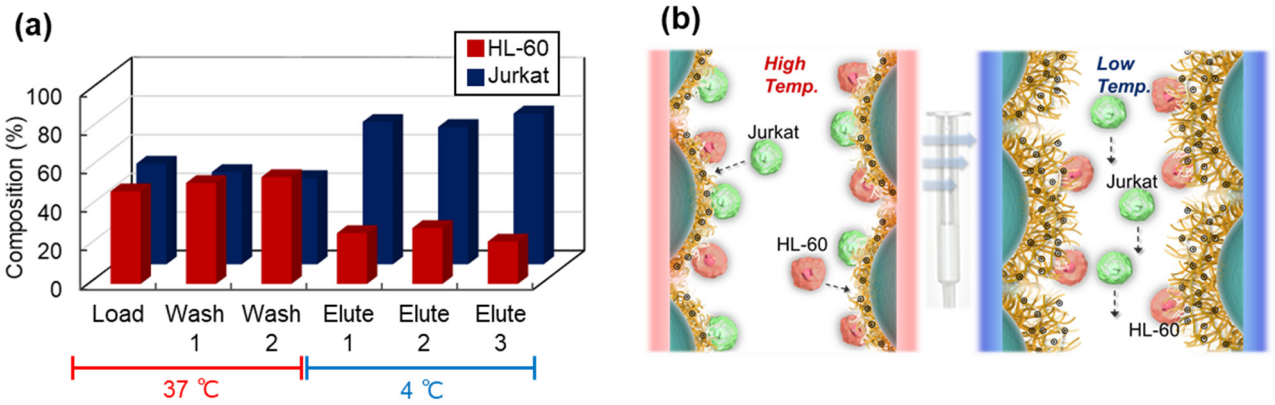


図4. 温度応答性カチオン性高分子修飾ビーズを用いた細胞分離カラムによる細胞分離

a) 各フラクションでの細胞組成。

b) 細胞分離カラムからの細胞溶出挙動の違い。

共同研究者・謝辞

本研究は、慶應義塾大学薬学部創薬物理化学講座の金澤秀子先生との共同研究である。

文　献

1） Heskins M., Guillet J.E., Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide), J. Macromol. Sci. A 2 (1968) 1441-1455 PMID N/A DOI: 10.1080/10601326808051910

2） Nagase K., Kobayashi J., Okano T., Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering, J. R. Soc. Interface 6(Suppl 3) (2009) S293-S309 PMID: 19324682 DOI: 10.1098/rsif.2008.0499.focus.

3） Nagase K., Okano T., Thermoresponsive-polymer-based materials for temperature-modulated bioanalysis and bioseparations, J. Mater. Chem. B 4(39) (2016) 6381-6397 PMID: 32263447 DOI: 10.1039/c6tb01003b.

4） Nagase K., Yamato M., Kanazawa H., Okano T., Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications, Biomaterials 153(Supplement C) (2018) 27-48 PMID: 29096399 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.026.

5） Nagase K., Okano T., Kanazawa H., Poly(*N*-isopropylacrylamide) based thermoresponsive polymer brushes for bioseparation, cellular tissue fabrication, and nano actuators, Nano-Structures & Nano-Objects 16 (2018) 9-23 PMID N/A DOI: 10.1016/j.nanoso.2018.03.010.

6） Nagase K., Uchikawa N., Hirotani T., Akimoto A.M., Kanazawa H., Thermoresponsive anionic copolymer brush-grafted surfaces for cell separation, Colloids Surf. B 185 (2020) 110565 PMID 31629096 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110565.

7） Nagase K., Inanaga D., Ichikawa D., Mizutani Akimoto A., Hattori Y., Kanazawa H., Temperature-modulated cell-separation column using temperature-responsive cationic copolymer hydrogel-modified silica beads, Colloids Surf. B 178 (2019) 253-262 PMID 30875584 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.057.