

高分子微粒子からなる微細構造表面の創製と
細胞接着の制御および細胞組織体の構築

2008 年度

美浦 学

目次

| | |
|--------------------------------------|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1.1 医療と高分子 | 1 |
| 1.2 細胞とマテリアルの相互作用 | 3 |
| 1.3 高分子微粒子の特徴と用途 | 4 |
| 1.4 本論文の概要 | 4 |
| 1.5 参考文献 | 7 |
| 第2章 高分子微粒子および単層粒子膜の作製と細胞培養基材としての評価 | 10 |
| 2.1 実験方法 | 12 |
| 2.1.1 高分子微粒子の作製 | 12 |
| 2.1.1.1 試薬 | 12 |
| 2.1.1.2 ソープフリー乳化重合による粒子の作製 | 12 |
| 2.1.1.3 添加剤による粒子径の制御 | 12 |
| 2.1.2 微粒子のキャラクタリゼーション | 13 |
| 2.1.2.1 粒子径の測定および形態の観察 | 13 |
| 2.1.2.2 粒子のゼータ電位の測定 | 14 |
| 2.1.3 Langmuir-Blodgett 法による単層粒子膜の作製 | 15 |
| 2.1.3.1 ラテックスの溶媒置換 | 16 |
| 2.1.3.2 単層粒子膜の作製 | 16 |
| 2.1.4 単層粒子膜のキャラクタリゼーション | 17 |
| 2.1.4.1 FE-SEM による観察 | 17 |
| 2.1.4.2 原子間力顕微鏡 (AFM) による観察 | 17 |
| 2.1.4.3 静的接触角の測定 | 18 |
| 2.1.5 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の培養 | 18 |
| 2.1.5.1 試薬 | 18 |
| 2.1.5.2 溶液の調製 | 18 |
| 2.1.5.3 HUVEC の継代培養 | 19 |
| 2.1.6 粒子膜上における細胞の接着形態の観察 | 20 |
| 2.1.6.1 光学顕微鏡による観察 | 20 |
| 2.1.6.2 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による観察 | 21 |
| 2.1.6.3 FE-SEM による観察 | 22 |
| 2.1.7 タイムラプス顕微鏡法による観察 | 22 |
| 2.1.8 免疫染色による細胞-基板間接着および細胞-細胞間接着の観察 | 22 |
| 2.1.9 細胞増殖性の評価 | 23 |
| 2.1.10 細胞の長期間培養 | 23 |
| 2.2 結果および考察 | 24 |
| 2.2.1 高分子微粒子の作製およびキャラクタリゼーション | 24 |
| 2.2.1.1 ソープフリー乳化重合について | 24 |

| | | |
|--------------------------|--|----|
| 2.2.1.2 | ソープフリー乳化重合における粒子形成機構 | 24 |
| 2.2.1.3 | SA 粒子の形成機構 | 25 |
| 2.2.1.4 | NaCl の効果 (方法 A) | 26 |
| 2.2.1.5 | DMF の効果 (方法 B) | 29 |
| 2.2.1.6 | AAm 先行重合の効果 (方法 B) | 29 |
| 2.2.1.7 | 粒子のゼータ電位について | 29 |
| 2.2.2 | L-B 法による単層粒子膜の作製 | 29 |
| 2.2.2.1 | 分散媒について | 29 |
| 2.2.2.2 | π -A 曲線の作製および粒子膜の作製 | 30 |
| 2.2.3 | 単層粒子膜のキャラクタリゼーション | 30 |
| 2.2.3.1 | FE-SEM による観察 | 30 |
| 2.2.3.2 | AFM による観察 | 31 |
| 2.2.3.3 | 静的接触角の測定 | 35 |
| 2.2.4 | 細胞について | 36 |
| 2.2.5 | 細胞接着について | 38 |
| 2.2.5.1 | インテグリンを介した細胞接着 | 38 |
| 2.2.5.2 | カドヘリンを介した細胞接着 | 38 |
| 2.2.5.3 | 細胞接着と細胞内シグナル伝達 | 41 |
| 2.2.5.4 | フィブロネクチン (FN) について | 42 |
| 2.2.5.5 | ウシ血清アルブミン (BSA) について | 42 |
| 2.2.6 | 細胞の接着形態の観察 | 43 |
| 2.2.6.1 | 細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm ² | 43 |
| 2.2.6.1.1 | 光学顕微鏡および共焦点レーザー蛍光顕微鏡による観察 | 43 |
| 2.2.6.1.2 | FE-SEM による観察 | 51 |
| 2.2.6.2 | 細胞播種密度 5.0×10^4 cells/cm ² | 57 |
| 2.2.6.3 | 細胞播種密度 2.0×10^5 cells/cm ² | 65 |
| 2.2.7 | タイムラプス顕微鏡法による観察 | 71 |
| 2.2.8 | 免疫染色による細胞-基板間接着の観察 | 75 |
| 2.2.9 | 免疫染色による細胞-細胞間接着の観察 | 75 |
| 2.2.10 | 細胞増殖性の評価 | 78 |
| 2.2.11 | 細胞の長期間培養 | 78 |
| 2.3 | 結論 | 80 |
| 2.4 | 参考文献 | 80 |
| 第 3 章 単層粒子膜を利用した細胞シートの作製 | | 84 |
| 3.1 | 実験方法 | 86 |
| 3.1.1 | PS 粒子の作製および評価 | 86 |
| 3.1.1.1 | 試薬 | 86 |
| 3.1.1.2 | PS 粒子の作製 | 86 |

| | | |
|---------|-------------------------------|-----|
| 3.1.1.3 | PS 粒子の評価 | 86 |
| 3.1.2 | PS 粒子膜の作製および評価 | 86 |
| 3.1.2.1 | ラテックスの溶媒置換 | 86 |
| 3.1.2.2 | スピコートによる単層粒子膜の作製 | 86 |
| 3.1.2.3 | PS 粒子膜の評価 | 87 |
| 3.2.1 | HUVEC の培養 | 87 |
| 3.2.1.1 | 溶液の調製 | 87 |
| 3.2.1.2 | HUVEC の培養方法 | 87 |
| 3.2.2 | 細胞シートの作製条件の検討 | 87 |
| 3.2.2.1 | 高密度培養法による細胞シートの作製 | 87 |
| 3.2.2.2 | 低密度培養法による細胞シートの作製 | 87 |
| 3.2.3 | 免疫染色による細胞単層および細胞シートの評価 | 88 |
| 3.2.3.1 | 免疫染色による細胞-細胞間接着の観察 | 88 |
| 3.2.3.2 | 免疫染色による ECM 分布の観察 | 88 |
| 3.2.4 | 細胞シートのサイズについての定量的評価 | 88 |
| 3.2.5 | 細胞シートの TCPS に対する再接着 | 88 |
| 3.2.6 | 細胞剥離後の基板の観察 | 89 |
| 3.2.7 | トリパンプルー排除法を用いた細胞生存率の評価 | 89 |
| 3.2.8 | 乳酸脱水素酵素アッセイによる細胞生存率の評価 | 89 |
| 3.2 | 結果および考察 | 92 |
| 3.2.1 | PS 粒子の作製および評価 | 92 |
| 3.2.2 | スピコートによる単層粒子膜の作製 | 92 |
| 3.2.2.1 | 光学顕微鏡による単層粒子膜の観察 | 93 |
| 3.2.2.2 | FE-SEM による単層粒子膜の観察 | 93 |
| 3.2.2.3 | AFM による単層粒子膜の観察 | 96 |
| 3.2.2.4 | 静的接触角の測定 | 96 |
| 3.2.3 | 細胞剥離性の検討 | 98 |
| 3.2.3.1 | 高密度培養法による細胞シートの作製 | 98 |
| 3.2.3.2 | 高密度培養法における培養時間および FN コート濃度の検討 | 103 |
| 3.2.3.3 | 低密度培養法による細胞シートの作製 | 104 |
| 3.2.4 | 免疫染色による細胞単層および細胞シートの評価 | 105 |
| 3.2.4.1 | 免疫染色による細胞-細胞間接着の評価 | 105 |
| 3.2.4.2 | 免疫染色による ECM 剥離性の評価 | 108 |
| 3.2.5 | 細胞シートのサイズについての定量的評価 | 114 |
| 3.2.6 | 細胞シートの再接着実験 | 115 |
| 3.2.7 | 細胞剥離後の基板の観察 | 117 |
| 3.2.8 | トリパンプルーによる細胞生存率の評価 | 117 |
| 3.2.9 | LDH アッセイによる細胞生存率の評価 | 118 |
| 3.3 | 結論 | 121 |
| 3.4 | 参考文献 | 121 |
| 第 4 章 | 接着性パターンニングによる細胞構造体の作製 | 123 |

| | |
|--|-----|
| 4.1 実験方法 | 124 |
| 4.1.1 試薬 | 124 |
| 4.1.2 HUVEC の培養 | 124 |
| 4.1.2.1 溶液の調製 | 124 |
| 4.1.2.2 HUVEC の培養方法 | 124 |
| 4.1.3 光反応性 BSA のフォトパターニングによる細胞接着の制御 | 125 |
| 4.1.3.1 光反応性 BSA の作製 | 125 |
| 4.1.3.2 基板上への光反応性 BSA の光固定化とフォトパターニング | 126 |
| 4.1.4 BSA ハイドロゲルのパターニングによる細胞接着の制御 | 126 |
| 4.1.5 フォトレジストを用いたパターン化細胞シートの作製 | 129 |
| 4.1.5.1 パターン化粒子膜の作製 | 129 |
| 4.1.5.2 パターン化細胞シートの作製 | 131 |
| 4.2 実験結果 | 132 |
| 4.2.1 光反応性 BSA のフォトパターニングによる細胞接着の制御 | 132 |
| 4.2.1.1 パターニング条件の検討 | 132 |
| 4.2.1.2 細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm ² | 132 |
| 4.2.1.3 細胞播種密度 2.5×10^4 cells/cm ² および 5.0×10^4 cells/cm ² | 132 |
| 4.2.2 BSA ハイドロゲルのパターニングによる細胞接着の制御 | 136 |
| 4.2.3 フォトレジストを用いたパターン化細胞シートの作製 | 142 |
| 4.3 結論 | 147 |
| 4.4 参考文献 | 147 |
| 第 5 章 総括 | 149 |
| 本論文に関連した著作および学会発表 | 151 |
| 謝辞 | 153 |

第1章

序論

「21世紀はナノテクノロジーとバイオテクノロジーの時代」と言われている。ナノテクノロジーとは、原子レベルで物質を制御してデバイスを作る技術である。2001年、米国クリントン大統領が国家ナノテクノロジー戦略を発表し、それを受けて日本もナノテクノロジーを国家戦略と定め、積極的に施策を推し進めてきた。そして今やナノテクノロジーは生活の中に溶け込み、身近な存在になりつつある。ナノテクノロジーを活用した製品は数多く、高分子材料に限っても、生活用品（化粧品、衣服）、ディスプレイ材料（電子ペーパー、有機EL）、バイオ・医療（バイオチップ、ドラッグデリバリーシステム）、集積回路、IT・通信（光ファイバー）、環境・エネルギー（浄化フィルター、燃料電池）といった多様な分野において実用化されている¹⁾。

一方、バイオテクノロジーは2002年に日本で「バイオテクノロジー戦略大綱」が策定されたものの、まだ発展途上の段階である。実用化が期待されているのは、テーラーメイド医療（個人の遺伝子の差異によって投薬や治療を行うこと）や遺伝子治療（異常な遺伝子を持っているため機能不全に陥っている細胞の欠陥を修復・修正することで病気を治療する手法）、そして再生医療（詳細は後述）である。これらの先端医療が実現できれば従来の医療では治療不可能な疾患を予防または完治できる可能性がある。近年、ヒトゲノム完全解読の発表²⁾や米国におけるヒトES細胞（embryonic stem cells）作製成功の発表³⁾、またヒトiPS細胞（induced pluripotent stem cells、人工多能性幹細胞）の作製に成功⁴⁾したという報道が世界中の注目を集めたのはそのためである。

このようにナノテクノロジーやバイオテクノロジーが注目を浴び、活発に研究されているのは、我々の生活を一変させるような画期的な技術の創出が期待されているためである。高分子化学もその発展の一翼を担う存在である。以降では本論文の主題となる医療と高分子の密接な関係や、細胞と材料との相互作用について、ナノテクノロジーやバイオテクノロジーという観点から述べてみたい。

1.1 医療と高分子

<生体材料>

医療に用いられる高分子（医用高分子と呼ぶこともある）の大部分は、生体材料（biomaterial）に分類される。生体材料の定義は少し複雑であるが、「損傷を受けた生体組織の機能できるだけ正常に近い状態に回復させるときに利用されるマテリアル」⁵⁾もしくは「生体に関連する分子や細胞などの生体を構成する要素に対して適応する、あるいは生体に直接接触させて利用する材料」⁶⁾とされている。生体材料の具体例としては、注射器やカテーテルなどのディスプレイ製品、縫合糸や止血剤などの手術用具、人工心臓や人工骨などの人工臓器など、多種多様な製品が挙げられる⁷⁾。生体材料には生体適合性・非毒性・可滅菌性といった安全性や、使用目的に適した耐久性が求められるだけでなく、用途に特化した機能を持つことが必要となる。

生体材料をその構成物質で分類すると、高分子系、金属系、セラミックス系に分けられる。高分子系バイオマテリアルの歴史は数千年前に遡り、創傷を縫合するために麻が用いられていたという⁸⁾。高分

子材料の特徴としては、軽量であること、金属のように腐食しないこと、セラミックスのように脆くないことが挙げられる。また原料のモノマーを選択することによって強度や柔軟性、生体適合性、生分解性を制御することが可能である。高分子系バイオマテリアルとしては、縫合糸、カテーテル、コンタクトレンズ、眼内レンズ、人工血管、人工腎臓など、多岐に渡る材料が開発されている。

<再生医療>

前述の再生医療分野においても高分子材料が用いられている。再生医療には組織工学、細胞治療、遺伝子工学が含まれるが、ここでは組織工学 (tissue engineering) について説明したい。組織工学は、1993年、米国の材料科学者 Robert S. Langer と医師 Joseph P. Vacanti によって提唱された⁹⁾。組織工学は「患者自身から細胞を採取し、それをを用いて欠損または機能不全に陥った組織・臓器を再生する」という手法である。そのため組織工学は従来の移植医療における問題点（術後の免疫拒絶反応、臓器提供者不足）を解決できる画期的な医療として期待されている。現在までに考案されている組織工学の2種類のアプローチについて以下に示す。

①生体内 (in vivo) 再生

組織工学におけるアプローチに、欠損部に成長因子や生分解性マテリアルを埋植し、生体内 (in vivo) で組織の再構築を促す手法がある。これは最初から生体内で細胞を培養することによって、より完全な組織再生を目指す手法である。生体内でゲル化する高分子を細胞と同時に注射する手法もこのアプローチに含まれるであろう。これまでに骨¹⁰⁾や軟骨¹¹⁾の再生、血管新生¹²⁾への利用が試みられている。

②生体外 (in vitro) 再生

1つは正常な組織から採取した細胞を生体外 (in vitro) で再構築した後に患部に戻すというアプローチである (Figure 1.1 参照)。Langer らが提唱したのは、生分解性を有する3次元の足場材料 (scaffold) に細胞を播種して組織を培養した後、それをそのまま患者に移植するという方法である。移植後には足場材料が徐々に分解され、最終的には再生した細胞組織がホスト組織と一体化する。このとき足場材料には天然高分子 (コラーゲン、ヒアルロン酸など) や、生分解性・生体適合性を有する合成高分子 (ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリペプチドなど) が用いられる場合がほとんどである。この手法によって現在までに骨¹³⁾、軟骨¹⁴⁾、心臓弁¹⁵⁾、心筋¹⁶⁾の再生が試みられている。

また近年、足場材料を使用せずに in vitro で細胞構造体を作製する手法として、細胞シート工学が注目を集めている。これは、何らかの方法でシート状で回収した細胞組織体 (細胞シート) を用いて組織の再生を試みる方法である¹⁷⁾ (Figure 1.1 参照)。細胞シートの利点は、細胞が培養中に分泌した細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) や細胞同士の結合が保持されているため、細胞機能の発現が維持されていること、そして細胞と細胞外マトリックスのみで組織構造体を作製できることである。作製した細胞シートは単層の状態でも使用できるが、複数の細胞シートを重ね合わせることで3次元組織を構築することも可能である。例えば、角膜上皮細胞シートは単層の細胞シートを用いて角膜の再生に利用できる¹⁸⁾。また心筋の細胞シートを何枚も重ね合わせると、それぞれのシートにおける拍動の同期が起こり、それを心筋梗塞部位に貼付することによって、心筋組織の再生が可能である¹⁹⁾。これ以外にも角化細胞 (表皮)²⁰⁾、角膜内皮²¹⁾、歯根膜²²⁾、肝臓²³⁾などの細胞シートが作製されている。

これらの組織工学的アプローチは簡単な構造を有する組織の作製には成功しているが、複雑な階層構造を有する組織を構築するには至っていない。複雑な組織を作製するには細胞の空間的配置の制御や培養法など、解決すべき問題が多い。

生体材料と組織工学はその目的やアプローチが異なるが、両者には共通点がある。それは「細胞を用いる上で細胞と材料が接触する」ことである。生体材料では組織とうまく適合するための材料の表面特性が重要となり、組織工学では採取した細胞を効果的に培養するための培養基質が必要とされている。形態を模倣しただけの培養組織ではなく、材料と組織がうまく適合し、正常な生体機能を発揮する培養組織を作製するために、生体内を模倣した環境を構築することが求められている。したがって「細胞（生物）と材料（無生物）の違い」「天然と人工の違い」について理解することは重要である。細胞の生物学的性質をより深く理解すること、そして細胞と材料との境界領域（biointerface）における相互作用を理解することが今後ますます重要性を増していくだろう。

1.2 細胞と材料の相互作用

<生体の階層構造と細胞接着>

個々の細胞は組織（集団）として協調しながら生体機能を発現し、またそれらの組織や臓器が集まって1個の生体を形成している（Figure 1.2）。このように生体が秩序立った階層構造を形成するためには、細胞同士の情報のやりとり（シグナル伝達）が不可欠である。細胞は隣接した細胞と接着し、増殖や分化シグナルを制御している（細胞-細胞間接着, Figure 1.2 参照）。また、細胞同士だけでなく、細胞の周囲に存在する水溶性成長因子や細胞外マトリックスからのシグナル伝達も重要である。水溶性成長因子は細胞の増殖や移動といった基本的な活動だけでなく、血管新生や細胞の分化といった細胞の運命に関わる重要な役割を担っている。また細胞外マトリックスは糖タンパク質群（コラーゲン、プロテオグリカンなど）で構成された超分子構造体である。細胞外マトリックスは細胞膜表面のレセプターと特異的に結合するリガンド部位を有し、細胞と接着して細胞を機械的に支持するだけでなく、生物学的シグナルを細胞内部に伝達する役割も果たしている²⁴⁾（細胞-ECM間接着, Figure 1.2）。したがって、細胞と相互作用する材料を用いて細胞-ECM間接着や細胞-細胞間接着を制御することができれば、細胞機能の発現を制御できると考えられる。

<細胞の運命を決定する培養基材の性質>

興味深いことに、細胞は材料の性質（培養基材表面の立体形状や細胞接着性リガンドの分布、基材表面の化学組成や親疎水性、基材の硬さなど）を感知して、細胞自身の形態や機能を変化させることがわかっている。例えば、細胞接着性領域の分布が細胞の形や細胞の生存（もしくはアポトーシス）を決定することを示した研究は良い例である²⁵⁾（Figure 1.3 左上）。また幹細胞は接着面積²⁶⁾や細胞外マトリックスの硬さ²⁷⁾を感知して分化の方向を決定することが知られている。また、数マイクロメートルのストライプ状の凹凸構造を有する基板に血管内皮細胞（血管を構成する細胞）を接着させると、細胞はストライプパターンの軸に沿って変形する（Figure 1.3 右上）。さらに培養を継続すると、細胞同士が連携して自発的に毛細血管を構築する^{28,29)}。また細胞の接着装置である膜貫通型タンパク質インテグリンのスケール（数十ナノメートル）に対応して接着性リガンドを基板上にパターンニングした基板では、細胞の移動挙動が通常の培養基板と異なることも示されている^{30,31)}。ゲルのような軟らかい

基板上の細胞とガラスのように硬い基板上の細胞を比較すると、細胞は基板が硬いほど伸展しやすいことも知られている³²⁾ (Figure 1.3 下)。

このように、細胞接着は細胞の形態を維持・支持するといった物理的な役割だけでなく、細胞のあらゆる活動（変形、移動、増殖、分化）に影響を与えている。したがって培養基材や生体材料を設計する上で、リガンドとレセプターの関係（ナノメートルスケール）から細胞全体（マイクロメートルスケール）までを考慮しなければならない。すなわちナノテクノロジーからバイオテクノロジーへのアプローチが必要とされているのである。

1.3 高分子微粒子の特徴と用途

高分子微粒子はその作製法によって数十ナノメートルから数マイクロメートルまでのサイズで作り分けることができ、ポリマー組成に由来する特性、構造に由来する特性、サイズに由来する高い比表面積などの特徴を有する。これまでに作製されている高分子微粒子は、ハイドロゲル粒子、アフィニティ粒子、中空粒子、コアシェル粒子などが挙げられる。これらの微粒子の用途は幅広く、プリンターのトナー粒子、光沢紙の表面処理剤、塗料バインダー、液晶ディスプレイのスペーサー、電子ペーパーのディスプレイ、化粧品の増粘剤、化粧品の有効成分や香料などを封入したマイクロカプセル、薬剤スクリーニング用のアフィニティ粒子、ドラッグデリバリー用キャリアなどに用いられている³³⁻³⁸⁾。

高分子微粒子は分散系だけでなく、微粒子を組み上げて構造体にするによってもユニークな機能を発現する。1次元構造体として微粒子チェーン³⁹⁾、2次元構造体として単層粒子膜⁴⁰⁾、3次元構造体としてコロイド結晶⁴¹⁾やコロイドソーム⁴²⁾が挙げられる (Figure 1.4)。ハイドロゲル微粒子で作製した微粒子チェーンは外部溶液の pH に応答して膨潤・収縮するが、このときゲル微粒子チェーンはミミズのようなユニークな運動を示す。またハイドロゲル粒子膜をポリマーで架橋すると羽衣のように柔軟なハイドロゲル薄膜を作製することができる。このハイドロゲル粒子膜は pH に応答し、架橋された面を内側にしてカールするという挙動を示す。また3次元構造体であるコロイド結晶はフォトニック結晶（光の透過・反射・屈折特性を制御する光学デバイス）としての利用が検討されている。コロイドソームは粒子によって構成されたカプセル様の構造体で、粒子間の間隙から内封物質を放出できることから薬剤や香料などを封入したマイクロカプセルとしての利用が検討されている。

1.4 本論文の概要

前述した微粒子構造体は個々の微粒子の特性を超えた構造体由来の特性を有しており、ナノテクノロジー的観点から創製されたナノマテリアルとみなすことができる。この微粒子ナノマテリアルに注目し、培養基質として組織構築を目指していくことを考えた。本研究では、高分子微粒子を2次元的に密にパッキングさせた単層粒子膜を作製し、細胞培養基質としての性質を評価した (Figure 1.5)。単層粒子膜は均一な粒子径を有する微粒子から構成されているため、微粒子のサイズに依存した規則的な凹凸構造を有している。この表面微細構造が細胞接着にどのような影響を与えるのかを調べた。前述の通り、細胞は培養基材の表面形状、機械的特性、化学組成、親疎水性などに影響を受けるため、従来の培養基質にはない、新たな特性を有した培養基質の開発を目標とした。

第2章では高分子微粒子の合成・評価および単層粒子膜の作製・評価を行った。ここで作製した微粒

子はポリスチレン/アクリルアミド (poly(styrene-co-acrylamide), SA) 粒子である。さらに作製した粒子を用いて Langmuir-Blodgett 法を用いて単層粒子膜の作製を行った。作製した粒子膜の形状および性質の評価を行った。サブミクロン～ミクロンスケールの凹凸を持つ粒子膜を作製したのは、このサイズが細胞の接着装置 (インテグリン) とスケールと一致しているためであり、これにより細胞の接着挙動をコントロールすることが目的である。正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) を単層粒子膜に播種し、その接着形態、細胞の移動挙動、細胞骨格の形成などを評価し、凹凸構造の影響を調べた。

第3章では第2章の知見をもとに、単層粒子膜を用いて細胞シートの作製・評価を行った。ここでは SA 粒子に加えて PS 粒子を作製し、粒子の種類と細胞剥離性について検討した。単層粒子膜上で培養した細胞単層をピペッティングによって剥離させ、細胞シートを作製した。作製した細胞シートの構造、ECM 分布の観察、シート中の細胞生存率の評価などを行い、組織移植片としての実用性を検討した。

第4章では、任意の形状の細胞および細胞シートを作製することを目的とし、細胞のパターニングを行った。同一基板上に細胞接着可能な領域と接着不可能な領域を形成し、細胞の形状を制御することを試みた。細胞の形態を任意に制御することによって、より実用的な組織移植片の作製が可能になると考えられる。

第5章では、総括として本研究の成果の意義、今後の研究の展望などを述べた。

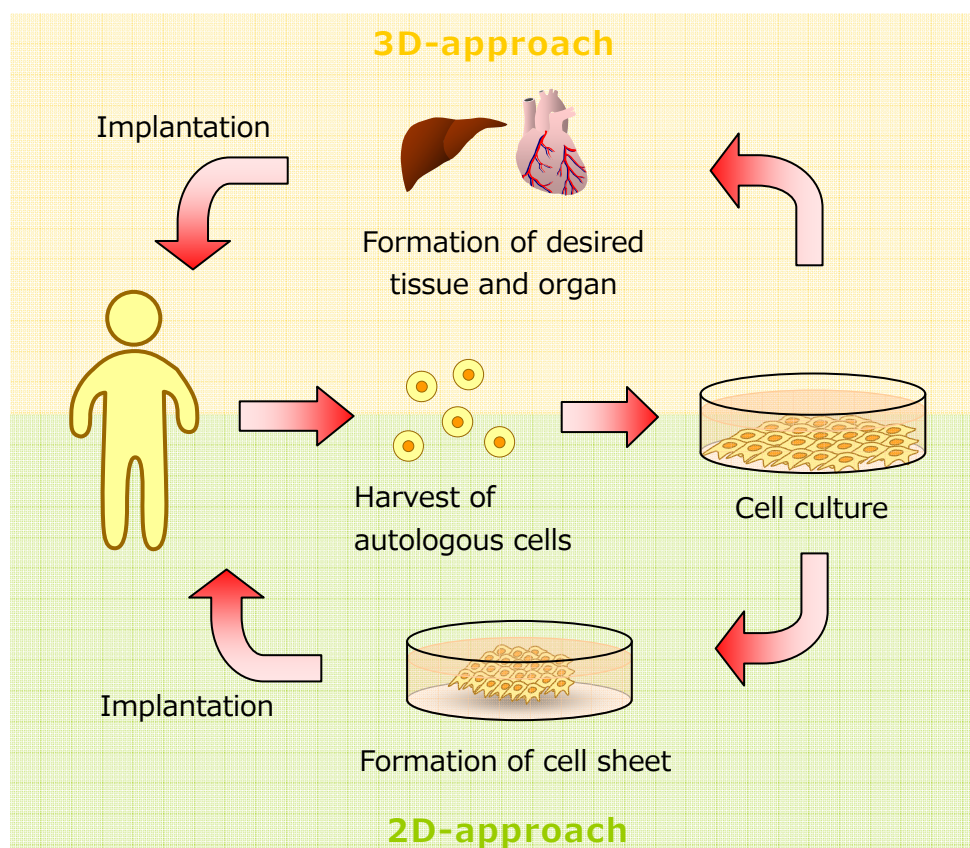


Figure 1.1 In vitro approaches of tissue engineering.

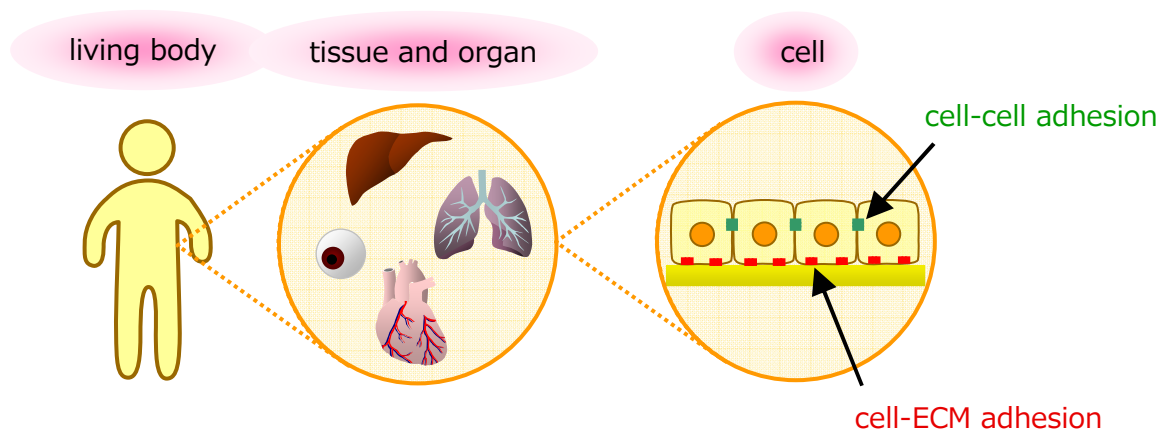
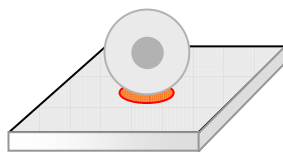


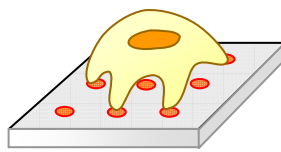
Figure 1.2 Hierarchical structure of living body.

<distribution of cell-adhesive area>



single island

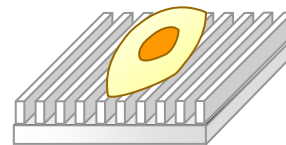
→ Cell dies.
(apoptosis)



closely-spaced
small islands

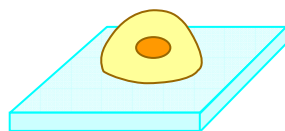
→ Cell survives.

<surface topography>

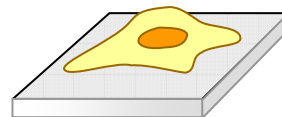


Cell tends to extend along the
direction of stripe pattern.

<rigidity of substrate>



softer



harder

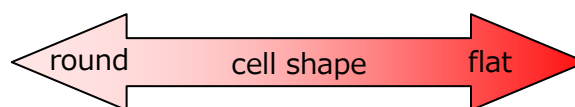


Figure 1.3 Properties of substrate that determine cell functions.

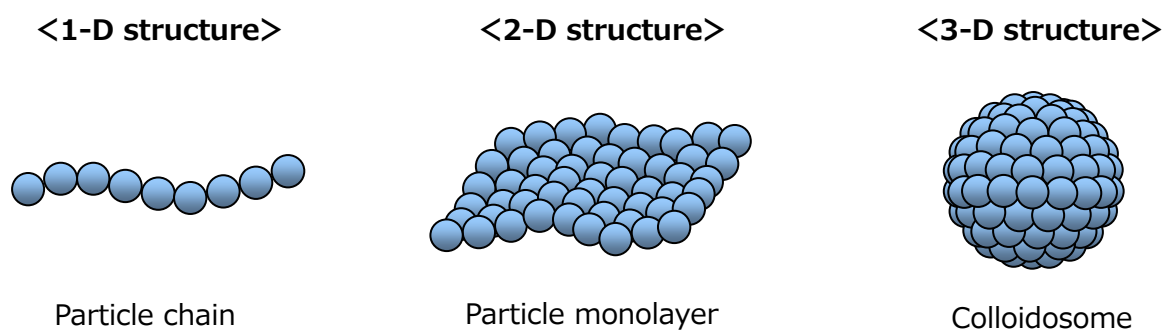


Figure 1.4 Hierarchical structures composed of microparticles.

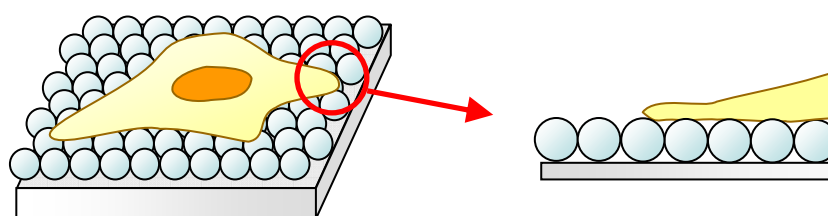


Figure 1.5 Cell adhesion and spreading onto a particle monolayer.

1.5 参考文献

- 1) 西山喜代司, 「基礎からわかるナノテクノロジー」, ソフトバンククリエイティブ社, 2007.
- 2) Human Genome Sequencing Consortium, "Finishing the euchromatic sequence of the human genome", *Nature* 431, 931-945, 2004.
- 3) Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharensko V, Verlinsky Y., "Morula-derived human embryonic stem cells", *Reproductive BioMedicine Online* 9 623-629, 2004.
- 4) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S, "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells", *Nature* 448, 313-318, 2007.
- 5) 石原一彦, 畑中研一, 山岡哲二, 「バイオマテリアルサイエンス」, 東京化学同人, 2003.
- 6) 高分子学会 編, 「医療機能材料」, 共立出版, 1990.
- 7) 中林宣男, 石原一彦, 岩崎泰彦, 「バイオマテリアル」, コロナ社, 1999.
- 8) 古藺 勉, 岡田 正弘, 「ヴィジュアルでわかるバイオマテリアル」, 秀潤社, 2006.
- 9) Langer R, Vacanti JP, "Tissue engineering", *Nature* 260, 920-926, 1993.
- 10) Yamamoto M, Tabata Y, Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Ikada Y, "Bone regeneration by transforming growth factor beta 1 released from a biodegradable hydrogel", *Journal of Controlled Release* 64, 133-142, 2000.
- 11) Park H, Temenoff JS, Tabata Y, Caplan AI, Mikos AG, "Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for

- cartilage tissue engineering", *Biomaterials* 28, 3217-3227, 2007.
- 12) Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khademhosseini A, Kobayashi H, Tabata Y, "Enhanced angiogenesis through controlled release of basic fibroblast growth factor from peptide amphiphile for tissue regeneration", *Biomaterials* 27, 5836-5844, 2006.
 - 13) Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA, "Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone", *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 25, 223-228, 1996.
 - 14) Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP, "Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation", *Plastic and Reconstructive Surgery* 88, 753-759, 1991.
 - 15) Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE, "Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model", *The Annals of Thoracic Surgery* 60, S513-S516, 1995.
 - 16) Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, Marini R, van Blitterswijk CA, Mulligan RC, D'Amore PA, Langer R, "Engineering vascularized skeletal muscle tissue", *Nature Biotechnology* 23 879-884, 2005.
 - 17) Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, Okano T, "Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds", *Biomaterials* 26, 6415-6422, 2005.
 - 18) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Yamamoto K, Nagai S, Kikuchi A, Tano Y, Okano T, "Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface", *Transplantation* 77, 379-385, 2004.
 - 19) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T, "Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces", *Circulation Research* 90, 40-48, 2002.
 - 20) Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T, "Thermo-Responsive Culture Dishes Allow the Intact Harvest of Multilayered Keratinocyte Sheets without Dispersal by Reducing Temperature", *Tissue Engineering* 7, 473-480, 2001.
 - 21) Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, Kikuchi A, Okano T, Tano Y, "Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes", *Biomaterials* 27, 607-614, 2006.
 - 22) Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I, "Human Periodontal Ligament Cell Sheets Can Regenerate Periodontal Ligament Tissue in an Athymic Rat Model", *Tissue Engineering* 11, 469-478, 2005.
 - 23) Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Kanehiro H, Tsutsumi M, Amanuma T, Iwata H, Yang J, Okano T, Nakajima Y, "Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets", *Nature Medicine* 13, 880-885, 2007.

- 24) Bruce Alberts 著, 中村桂子, 松原謙一 訳, 「細胞の分子生物学 第4版」, ニュートンプレス, 2004.
- 25) Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE, "Geometric Control of Cell Life and Death", *Science* 276, 1425-1428, 1997.
- 26) McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS, "Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment", *Developmental Cell* 6, 483-495, 2004.
- 27) Even-Ram S, Artym V, Yamada KM, "Matrix Control of Stem Cell Fate", *Cell* 126, 645-647, 2006.
- 28) Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, Murphy CJ, Nealey PF, "Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates", *Journal of Cell Science* 116, 1881-1892, 2003.
- 29) Bettinger CJ, Zhang ZT, Gerecht S, Borenstein JT, Langer R, "Enhancement of In Vitro Capillary Tube Formation by Substrate Nanotopography", *Advanced Materials* 20, 99-103, 2008.
- 30) Maheshwari G, Brown G, Lauffenburger DA, Wells A, Griffith LG, "Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering", *Journal of Cell Science* 113, 1677-1686, 2000.
- 31) Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP, "Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands", *Biophysical Journal* 92, 2964-2974, 2007.
- 32) Peyton SR, Putnam AJ, "Extracellular Matrix Rigidity Governs Smooth Muscle Cell Motility in a Biphasic Fashion", *Journal of Cellular Physiology* 204, 198-209, 2005.
- 33) 金田勇, 「柔らかい水膨潤性マイクロゲルの準希薄分散液の降伏応力の評価」, 日本レオロジー学会誌, 34, 77-81, 2006.
- 34) 岡田弘晃 監修, 「機能性DDSキャリアの製剤設計」, シーエムシー出版, 2008.
- 35) 半田宏, 川口春馬, 「ナノアフィニティビーズのすべて」, 中山書店, 2003.
- 36) 小石真純, 石井文由, 「ナノ粒子のはなし」, 日刊工業新聞社, 2006.
- 37) 中濱数理, 「高分子微粒子の組織化を通じた超構造体の作製」, 慶應義塾大学理工学研究科博士論文, 2002.
- 38) シーエムシー出版編集部 編, 「電子ペーパーとディスプレイの市場」, シーエムシー出版, 2005.
- 39) 奥山弘子, 「ゲル微粒子の一次元集積化による微粒子チェーンの構築」, 慶應義塾大学理工学研究科修士論文, 2005.
- 40) 土居陽彦, 「反応性ハイドロゲル微粒子からなる多機能微粒子薄膜の作製」, 慶應義塾大学理工学研究科修士論文, 2004.
- 41) Xia YN, Gates B, Yin YD, Lu Y, "Monodispersed Colloidal Spheres: Old Materials with New Applications", *Advanced Materials* 12, 693-713, 2000.
- 42) Dinsmore AD, Hsu MF, Nikolaidis MG, Marquez M, Bausch AR, Weitz DA, "Colloidosomes: Selectively Permeable Capsules Composed of Colloidal Particles", *Science* 298, 1006-1009, 2002.

第2章

高分子微粒子および単層粒子膜の作製と細胞培養基材としての評価

第2章では、細胞に作用させる基板材料の作製を行い、さらに細胞を播種して培養基材としての評価を行った。具体的には、高分子微粒子を合成し、作製した粒子を用いて単層粒子膜の作製を行った。そして正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) を単層粒子膜上に播種し、単層粒子膜に対する接着細胞の接着形態や細胞骨格を観察した。細胞の形態の評価は光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM)によって観察した。

まず微粒子の作製では、モノマーにスチレンとアクリルアミドを使用してソープフリー乳化共重合法によって SA 粒子を作製した。重合条件を検討することによって粒子径を制御し、ミクロンスケールからサブミクロンスケールの粒子を作製した。ソープフリー乳化重合ではその他の重合法と異なり添加剤 (分散安定剤や乳化剤、界面活性剤) を用いないため、不純物が少ない。そのため不純物が問題となる医療分野や電子材料分野においても利用可能である。

次に、単層粒子膜の作製を行った。単層粒子膜は均一な粒子径を有する高分子微粒子が六方最密充填で配列した2次元のコロイド結晶である。コロイド結晶の例としては、天然鉱物のオパールが挙げられる。オパールには独特の色彩 (遊色効果) を持つものがあるが、これはオパールの内部でシリカ粒子が六方最密充填構造で規則的に配列した3次元のコロイド結晶であり、特定の波長 (Bragg の法則および Snell の法則を満たす) の光を反射するためである。コロイド結晶は新規機能性材料として注目されており、フォトニック結晶¹⁾や高密度記録材料²⁾、バイオセンサー³⁾、マイクロレンズアレイ⁴⁾などへの応用が期待されている。コロイド結晶の作製法としては自然沈降法⁵⁾、遠心沈降法⁶⁾、スピコート法⁷⁾、スプレードライ法⁸⁾、電気的堆積法⁹⁾、引き上げ法¹⁰⁾、毛管法¹¹⁾、溶液流動法¹²⁾などが挙げられるが、本研究における単層粒子膜の作製ではスピコート法と Langmuir-Blodgett 法 (L-B 法) を選択した。スピコート法は簡便に薄膜を作製することができ、導電性インクを用いた半導体の配線や、CD や DVD の記録層や保護層のコーティングに利用されている。L-B 法は両親媒性分子の単分子膜を作製する方法として20世紀初頭に開発され、現在ではナノテクノロジーの先駆けとして認知されている。L-B 法は脂質二重膜の作製¹³⁾、分子エレクトロニクス^{14, 15)}や分子フォトニクス^{16, 17)}に利用されている。L-B 法では両親媒性分子の代わりに粒子を用いることで単層粒子膜を作製することも可能である。L-B 法は様々な種類の粒子について粒子膜を作製することが可能であり¹⁸⁻²¹⁾、異方性粒子の作製¹⁸⁾、粒子配列の反応場 (リアクター) としての利用²⁰⁾、細胞機能の制御²¹⁾などに利用されている。

最後に、単層粒子膜の培養基材としての評価を行った。本実験のように基材の表面構造を利用して細胞の接着を制御する試みは古くから行われている。例えば、Okanoらは人工血管の表面処理としてポリスチレン (PS) とポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (HEMA) のABA型ブロックコポリマーを用いた²²⁾。このポリマーはナノスケールのミクロ相分離構造を形成し、血中の血小板の粘着を抑制 (すなわち血栓の形成を抑制) することが示された。近年では、数マイクロメートルの孔径を有するハニカム構造の高分子フィルムが新たな細胞培養基材として注目されている。ハニカムフィルムはその孔径に応じて肝細胞のアルブミン分泌能²³⁾や生存率の改善²⁴⁾、神経細胞の分化誘導²⁵⁾、軟骨細胞のグリコサミノグリカン分泌能の向上²⁶⁾、内皮細胞の増殖性の向上²⁷⁾を達成し、いずれもフラットな培養基板より優

れた性質を示した。このようなマイクロスケールオーダーのパターン化基板は細胞全体の形態に影響を及ぼしていると考えられる。細胞の形は細胞機能と密接に関連しているため、ハニカムフィルムは細胞の形を制御することによって細胞機能を変化させていると解釈できる。また、より微小なスケールで細胞接着を制御できるマテリアルとして、Spatzらの一連の研究が挙げられる。彼らは金ナノ粒子を基板上に数十ナノメートル間隔で配列させ、そこに細胞接着性ペプチドRGDを結合させ、細胞接着性の島（cell-adhesive islands）が等間隔に配列したパターンを作製した。この研究の画期的な点は、パターン間隔を精密に制御したところである。彼らは、パターン間隔が58 nm以下の場合には細胞はインテグリンのクラスターリングが起こり接着斑を形成するが、73 nm以上の場合には接着斑が形成しないことを示した²⁸⁾。そしてインテグリンがクラスターリングできない場合には細胞膜の突起が活発に伸展し、細胞の移動挙動が不規則になることがわかった²⁹⁾。

また以前より、単層粒子膜は細胞の応答を制御するマテリアルとして検討されている。例えば、温度応答性コアシェル型粒子の粒子膜では、温度に応じて白血球の接着および活性酸素の分泌（異物認識）を制御することができた³⁰⁾。またポリスチレン（PS）粒子の単層粒子膜を用いると、粒子径に応じて白血球の応答が変化した³¹⁾。本章で後述するように、単層粒子膜が有するサブミクロン～ミクロンスケールの規則的凹凸構造は、インテグリンのクラスターリングや細胞が伸展させる膜突起（filopodia, フィロポディア）を制御する上で重要である。そこで本研究では、粒子膜の持つ規則的凹凸構造によってインテグリンのクラスターリングやフィロポディアの接着領域の制御を目的とし、粒子径の検討を行った。

2.1 実験方法

2.1.1 高分子微粒子の作製

2.1.1.1 試薬

- ・ アクリルアミド (acrylamide, AAm) 和光純薬工業 (株) 一級
エタノールによる再結晶法によって精製後、減圧乾燥を行ったものを回収し使用した。
- ・ エタノール (ethanol) 純正化学 (株) 特級
- ・ 塩化ナトリウム (sodium chloride, NaCl) 純正化学 (株) 特級
- ・ 過硫酸カリウム (potassium persulfate, KPS) 和光純薬工業 (株) 特級
再結晶法によって精製後、減圧乾燥を行ったものを使用した。
- ・ N,N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide, DMF) 純正化学 (株) 特級
- ・ スチレン (styrene, St) 和光純薬工業 (株) 一級
重合禁止剤やオリゴマー除去のため減圧蒸留して用いた。
- ・ ポリメタクリル酸メチル (PMMA) 標準粒子 (464 nm) 日新 EM (株)

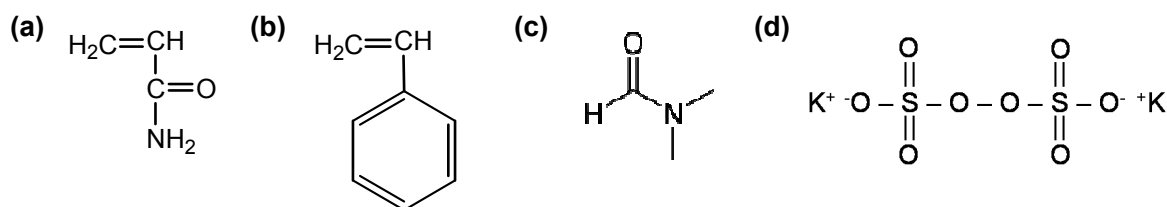


Figure 2.1 Chemical structures of acrylamide (a), styrene (b), DMF (c), and KPS (d).

2.1.1.2 ソープフリー乳化重合による粒子の作製

<SA 粒子の作製>

300 mL (または 200 mL) の四つ口フラスコに攪拌棒、冷却管、窒素導入管、セラムラバーを取り付け、St モノマー、AAm モノマー、蒸留水、70°C の恒温槽中で 300 rpm の回転速度にて攪拌しながら 1 時間窒素置換した後、蒸留水 10 g で溶解した開始剤 KPS の水溶液を注射器で注入し、窒素雰囲気下で 24 時間重合を行った。作製したラテックスを遠心分離にて精製した。25°C、5,000~10,000 rpm で 5~10 分間遠心分離を行って粒子を完全に沈降させ、上清をデカンテーションにより除去した後、残りの固形分を蒸留水で再分散させた。この操作を 5 回繰り返すことにより粒子の精製を行った。

2.1.1.3 添加剤による粒子径の制御

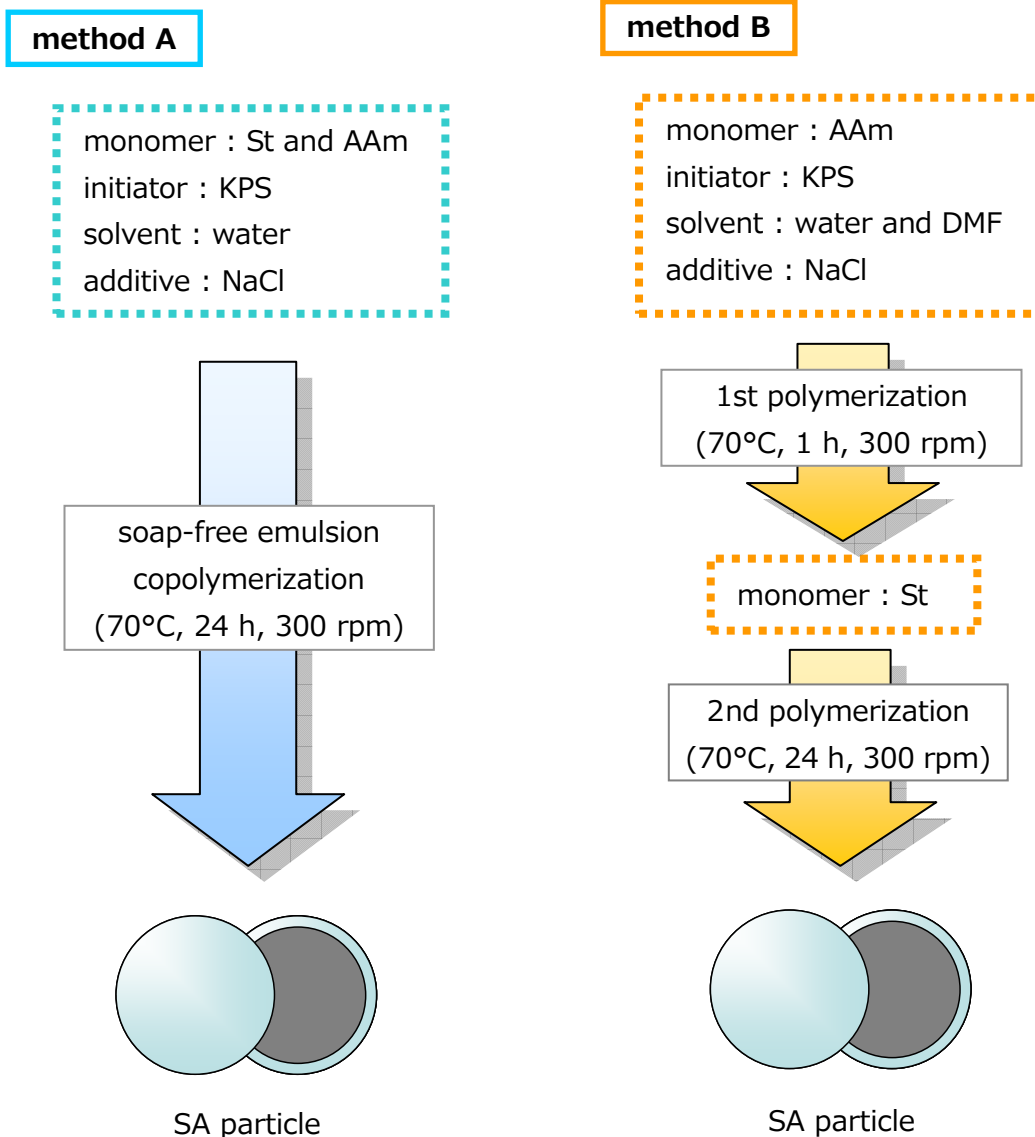
モノマーおよび開始剤のみを使用して重合した場合には粒子径 300~400 nm 程度の微粒子が得られることがわかっている。本研究においては、より大きな粒子径を持った粒子を得るために、以下の 2 種類の方法で粒子径の制御を試みた (Scheme 2.1 参照)。

【方法 A】

- ・ 重合時に所定量の塩化ナトリウムを添加した。

【方法 B】

- ・ 200 mL の四つ口フラスコを利用した。
- ・ 重合時に塩化ナトリウムおよび DMF を添加した。
- ・ AAm を先行重合し、St を後添加して重合を行った。



Scheme 2.1 Preparation of SA particles.

2.1.2 微粒子のキャラクタリゼーション

2.1.2.1 粒子径の測定および形態の観察

作製した微粒子の乾燥時の粒子径および形態を、透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope; TEM) により測定・観察した。

精製したラテックス少量を蒸留水で希釈し、金属メッシュで支持したコロジオン膜上に沈着固定した。これをデシケーター中で 2 時間乾燥させた後、TEM (HU-12, 日立 (株)) にて観察した。乾燥時の粒径は、(1.1) 式より、重量平均粒子径として求めた。また D_w/D_n の値から単分散性を評価した。

$$D_w = \sum f_i D_i^4 / \sum f_i D_i^3 \quad (2.1)$$

$$D_n = \sum f_i D_i / \sum f_i \quad (2.2)$$

ここで f_i は粒子径が D_i である粒子の個数を表す。

2.1.2.2 粒子のゼータ電位の測定

一般的に、溶液中の粒子の表面電位を直接測定することは困難なため、ゼータ電位 (ζ -potential) を測定する。本実験ではコンパクトゼータ電位測定装置 (ZEECOM、マイクロテック・ニチオン社) を用い、ゼータ電位を測定した。

液体中に分散された粒子は多くの場合表面電荷を持っている。この粒子の荷電状態の指標として定義されたのがゼータ電位である。

粒子から十分に離れて電気的に中性である領域の電位をゼロと定義する。ゼータ電位はこのゼロ点を基準として測った場合の滑り面の電位と定義される。ゼータ電位は分散された微粒子の分散安定性の指標としてよく用いられる。例えばゼータ電位の絶対値が大きければ粒子間の反発力が強く、粒子の安定性は高い。逆にゼータ電位の絶対値が小さければ粒子は凝集しやすい。

次にゼータ電位の測定法について説明する。粒子を電解質溶液中に分散させ外部から電場をかけると、粒子は電場から力を受けて泳動する。しかし液体の粘性が抵抗力となり、やがてこの粘性力と電場から受ける力が均衡し、粒子は等速運動をするようになる。この移動の速さを測定し、電場の強さで割ることにより、粒子の電気泳動移動度が求められる。そしてこの電気泳動移動度の値から Henry の式を用いて粒子のゼータ電位を算出できる。

サンプル粒子を蒸留水で希釈し分散させた。この懸濁液を測定用セルに満たし、式 (2.3) を用いて電気泳動移動度 (electrophoretic mobility, EPM) を測定した。

$$EPM (\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}) = u \times d/V \quad (2.3)$$

u : 移動速度 ($\mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$)

d : 電極間距離 (cm)

V : 電圧 (V)

さらに、この EPM の値を Henry の式 (2.4) に代入することでゼータ電位を算出した。

$$\zeta = \pi \times \eta \times (EPM) \div (f \times \epsilon) \quad (2.4)$$

ζ : ゼータ電位

η : 分散媒の粘度

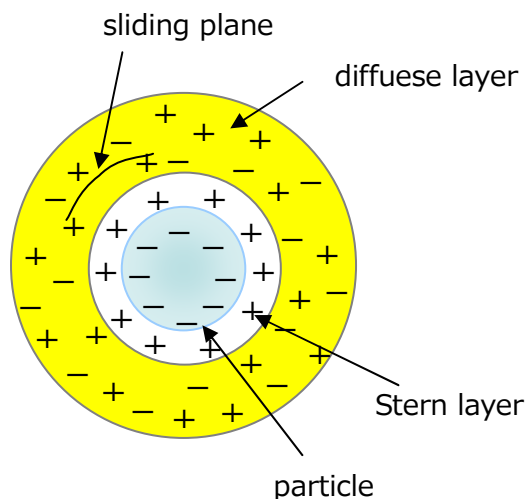


Figure 2.2 Concept of zeta-potential of particle.

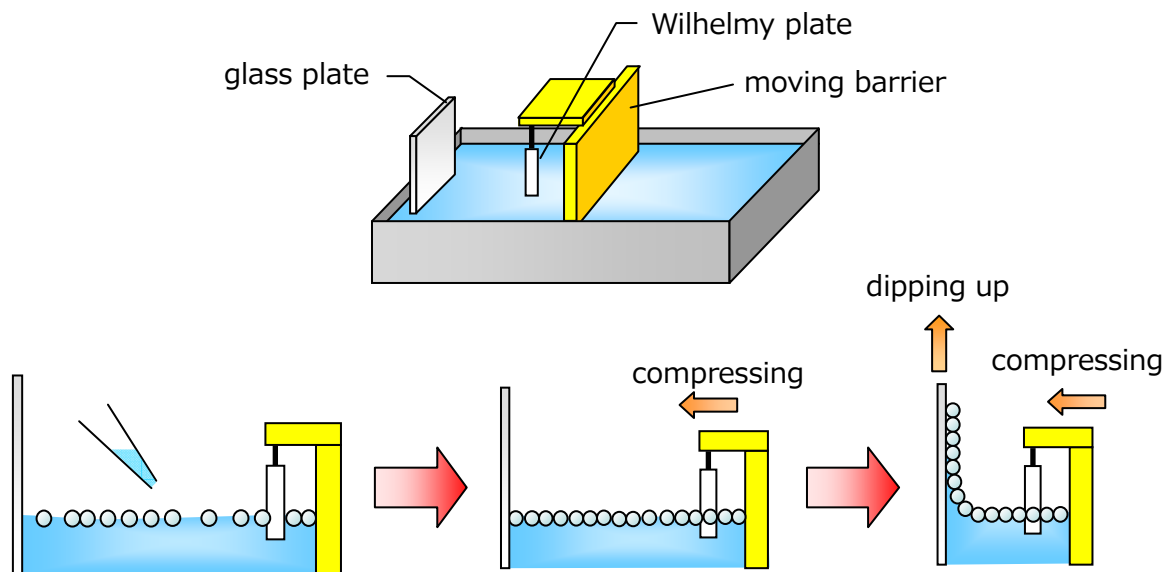
f : 比例定数

ϵ : 分散媒の誘導率 (希薄溶液)

2.1.3 Langmuir-Blodgett 法による単層粒子膜の作製

<Langmuir-Blodgett 法について³²⁾>

Langmuir-Blodgett 法 (L-B 法) はもともと単分子膜を作製するために開発された。清浄な水面上に両親媒性分子を展開し、一定の表面圧になるまで圧縮させて基板に移し取ることによって単分子膜を作製する。この方法を用いて作製された単分子膜は Langmuir-Blodgett film (L-B 膜) と呼ばれる。基板に移し取る方法は垂直浸漬法と水平付着法に分類される。本実験では両親媒性分子の代わりに SA 粒子を水面上に展開し、可動バリアによって圧縮して粒子間を密にパッキングさせた後、垂直浸漬法を用いて基板上に累積させることによって単層粒子膜を作製した (Scheme 2.2)。



Scheme 2.2 Preparation of Langmuir-Blodgett layer.

表面圧はウィルヘルミプレート法 (Wilhelmy-plate method) によって測定された。この方法は、吊り下げられたプレートを部分的にサブフェーズに浸漬させた際の表面張力を測定する (プレートには白金やガラス、または濾紙がしばしば利用される)。ここではまず表面張力と表面圧の関係について説明する。

気-液界面は過剰な自由エネルギー (表面の分子とバルクの分子の環境の違いに由来する) を保持していると言われる。この界面自由エネルギーは表面張力 γ を測定することによって求められる。水 (20°C) の表面張力は約 73 mN/m であり、その他の液体と比較して非常に高く、単分子膜の作製に非常に適している。

両親媒性分子の溶液 (水に不溶性の溶媒) をマイクロシリンジなどで水面上に滴下すると、溶液は急速に展開され、親水性部 (head 部) を水相に、疎水性部 (tail 部) を気相に向けて水面を被覆する。そして溶媒が蒸発することによって単分子層が形成される (Figure 2.3)。展開可能な領域が大きいとき、

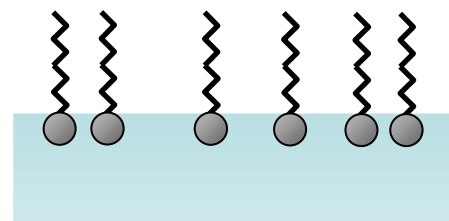


Figure 2.3 Amphiphilic molecules spread on a water surface.

隣接した分子同士の距離は長く、それらの相互作用は弱い。このとき単分子層を「二次元気体」とみなすことができる。この条件においては、単分子層は水の表面張力に対してわずかに影響を与えている。ここで可動バリアによって展開可能な表面積を減少させると、分子は力を及ぼし始める。このときの「単位長さ当たりの力」を表面圧 (surface pressure, π) と呼んでいる (本来、圧力とは「単位面積当たりの力」であるが、この場合は水面上の単分子層の厚みを無視できるため)。

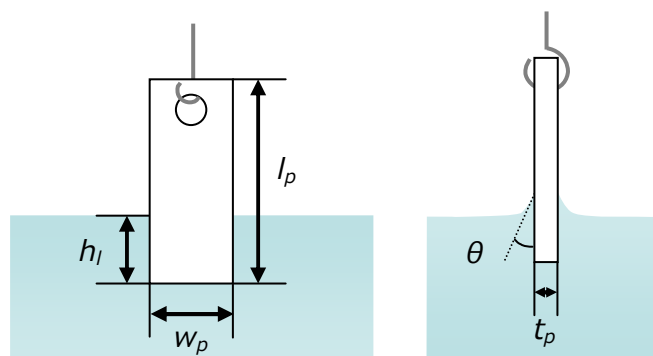


Figure 2.4 Wilhelmy plate partially immersed in a water.

次に、ウィルヘルミプレート法における表面圧の測定原理について説明する (Figure 1.8)。部分的に水中に浸漬させたプレートに対して働く力を考えると、下方向に働く力は重力および表面張力であり、上方向に働く力は水の浮力である。プレートの寸法を l_p , w_p , t_p とし、材料の密度を ρ_p 、密度 ρ_l の水に浸漬した深さを h_l とすると、プレートに対する下方向の力 F は以下の式で表される。

$$F = \rho_p g l_p w_p t_p + 2\gamma(t_p + w_p)(\cos \theta) - \rho_l g h_l w_p t_p \quad (1.5)$$

ここで γ は液体の表面張力、 θ はプレートに対する液体の接触角であり、 g は重力定数である。表面圧は、クリーンな水面と単層膜の存在する水面の間の静止したプレートに対する下方向の力 F の変化を測定することによって決定される。プレートが液体によって完全に濡れている場合 ($\cos \theta = 1$) には、表面圧 P は以下の式によって表せる。

$$P = -\Delta\gamma = -[\Delta F / 2(t_p + w_p)] = -\Delta F / 2w_p \quad (w_p \gg t_p) \quad (1.6)$$

したがってウィルヘルミプレートが薄くなるほど感度が増大することになる。このようにウィルヘルミプレート法ではプレートの質量変化を測定することによって表面圧が決定される。

2.1.3.1 ラテックスの溶媒置換

精製した粒子のラテックスを、25°C、10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去した後、水を加えて再分散させてから徐々にエタノールを加え、最終的に水/エタノール=2/8 (v/v) となるようにした。

2.1.3.2 単層粒子膜の作製

分散媒を水/エタノール混合溶液に置換した粒子を L-B 膜作製装置 (日本レーザー電子 (株) 製) の水面上に少量ずつ展開させた。展開後、エタノールが乾燥するまで静置した後、L-B 膜作製装置によって自動的に粒子を圧縮し、基板を徐々に引き上げることで L-B 膜の累積を行った。

粒子を累積させるガラス板にはあらかじめ両面テープでカバーガラス (18×18 mm または ϕ 15 mm) を固定し、カバーガラス上に粒子膜を累積させた。これはカバーガラスが PS dish (ϕ 35 mm) または 24 穴プレート (ϕ 15.5 mm) に収まるサイズであり、細胞実験に用いる際に取り扱いが容易なためである。

累積後は1時間ほど静置して粒子膜を乾燥させ、乾燥後はカバーガラスごと PS dish に入れて保存し、細胞実験を行う際に適宜使用するようにした。

2.1.4 単層粒子膜のキャラクタリゼーション

2.1.4.1 FE-SEM による観察

電界放出型走査電子顕微鏡 (field emission scanning electron microscope, FE-SEM) は電子線で試料表面を2次的に走査して試料から放出する二次電子を検出し、同期して走査する CRT (cathode ray tube) 上にて画像化させる装置である。作製した単層粒子膜を電界放出型電子顕微鏡 (FE-SEM) によって観察した。

2.1.4.2 原子間力顕微鏡 (AFM) による観察

原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM) は操作型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope, SPM) の一種であり、試料の表面形状の観察にしばしば用いられる。AFM は探針 (tip) と試料表面に働く原子間力をプローブとし、試料表面の高さ分布を3次的に観察する装置である。AFM では試料の前処理が必要なく、絶縁試料の観察も容易に行えるという利点がある。そのため高分子試料の観察にもしばしば用いられており、高分子1本の観察や、マクロな試料表面の数百ナノメートル程度の凹凸の観察が可能である。

AFM にはコンタクトモードとタッピングモード (ダイナミックモード) がある。コンタクトモードは探針を試料と接触した状態で表面を走査する方法である。カンチレバー (cantilever) と呼ばれる薄い板バネの先端に長さ数 μm の探針がついている。この探針と試料表面の相互作用 (原子間力) は、カンチレバーのたわみ (変位量) に基づいて検出される。変位量はカンチレバー背面にレーザー光を照射し、反射光をフォトダイオードに入射することによって評価する。探針を試料表面に沿って走査させるにはピエゾスキャナーを用いる。通常、探針と試料表面

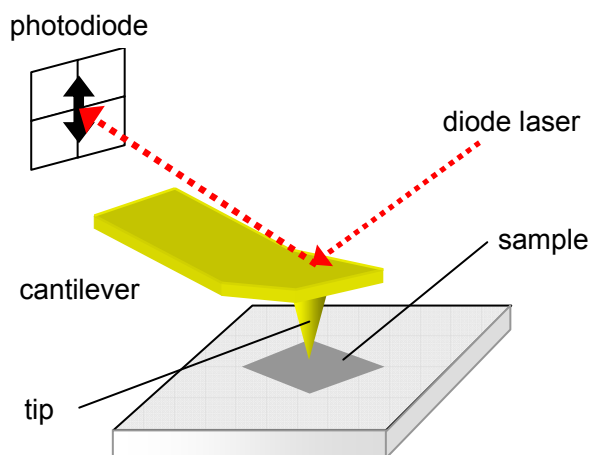


Figure 2.5 Measurement of sample by AFM.

間の原子間力が一定になるようにフィードバックをかけ、表面形状を観察している。しかし高分子試料のような比較的軟らかい試料では、走査中にダメージを受けることも少なくない。また、コンタクトモードは表面の凹凸が大きい試料では測定エラーが出てしまうことがある。一方、タッピングモードでは、探針を試料表面に周期的に接触して測定する方法であり、軟らかい試料や凹凸の激しい試料の観察に有効である。タッピングモードではカンチレバーの支持部にピエゾアクチュエーターを付け、共振周波数程度の周波数で振動させる。探針が試料表面に接触すると、両者の間に力が生じるため、カンチレバーの振動振幅が小さくなる。振動振幅の減衰量が一定となるようにフィードバックをかけて探針を走査すれば、試料表面の損傷を最小限にしながら形状観察が可能である。

本実験においては SPM (SPM-9500J3, 島津製作所 (株)) を利用してタッピングモードで単層粒子膜の観察を行った。前述の通り、高分子試料では操作中に損傷してしまう可能性があることと、粒子膜の凹凸が数百 nm ~ $1 \mu\text{m}$ 程度と考えられるので凹凸をより精度よく測定するためである。

2.1.4.3 静的接触角の測定

作製した単層粒子膜の表面物性のひとつとして、ゴニオメーター（エルマ光学（株）製 G-1 型）を用いて接触角を測定することによって、表面の濡れ性を評価した。適当な大きさにカットした PS dish または粒子膜を累積させたカバーガラスを超純水を満たしたセルに両面テープで固定し、マイクロシリンジを用いて気泡を注入した（inverted bubble 法、Figure 2.6）。材料表面とこの気泡の角度を接触角として測定した。

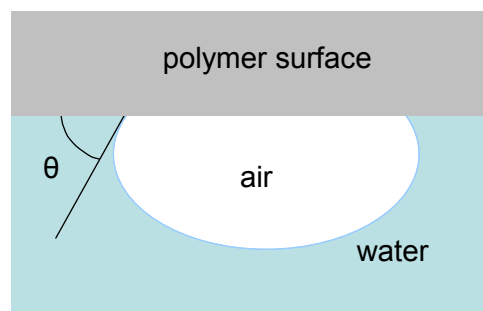


Figure 2.6 Conception of contact angle by inverted bubble method.

2.1.5 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)の培養

2.1.5.1 試薬

| | |
|--|---------------|
| ・塩化ナトリウム (sodium chloride, NaCl) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・塩化カリウム (potassium chloride, KCl) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 (disodium hydrogen phosphate 12-water, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・塩化マグネシウム六水和物 (magnesium chloride hexahydrate, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・塩化カルシウム二水和物 (calcium chloride dihydrate, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・グルコース (glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・0.5% コラーゲン酸性溶液 I -AC | 高研 (株) |
| ・トリプシン (Trypsin, Cryst.) | 和光純薬工業 (株) |
| ・フェノールレッド (phenol red) | 和光純薬工業 (株) |
| ・エチレンジアミン四酢酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) | 和光純薬工業 (株) |
| ・パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) | 和光純薬工業 (株) |
| ・25% グルタルアルデヒド溶液 (25% glutaraldehyde solution) | 和光純薬工業 (株) |
| ・エタノール (ethanol ; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・TritonX-100 | 東京化成工業 (株) |
| ・rhodamine-conjugated phalloidin | フナコシ (株) |
| ・ウシ血漿フィブロネクチン (bovine plasma fibronectin) | Sigma-Aldrich |
| ・ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) | Sigma-Aldrich |

2.1.5.2 溶液の調製

(a) Phosphate buffer saline (PBS)の調製

・PBS(+)

Table 2.1 に挙げた試薬 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ と $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 以外) を 2 L ビーカーにて超純水 (MilliQ) に溶解させた。また 500 mL ビーカーに超純水を加え、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ と $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を溶解させた。

その後、2つの溶液を混合し、2Lにメスアップした後に、pHメーターを用いてpH7.40に調整した。その後クリーンベンチ内にてMillipore® Sterivex™-GV (pore size:0.20 μm, Sigma-Aldrich)を用いて濾過滅菌を行い、滅菌済みのボトルに分注して冷蔵庫内にて冷暗保存した。

・PBS(-)

ここでPBS(-)とはPBS(+)から二価カチオンを除いたものこのことを指す。すなわちTable 2.1に示すMgCl₂·6H₂OとCaCl₂·2H₂Oを除く全ての試薬を超純水に溶解し、その後PBS(+)と同様の手順でメスアップ、pH調整、濾過滅菌を行った。作製した溶液は滅菌済みのボトルに分注して冷蔵庫内にて冷暗保存した。

(b) 細胞培養メディウムの調製

内皮細胞培地キット (Endothelial Growth Medium-2 Bullet Kit, EGM-2) (Lonza社、旧Cambrex社)を使用した。このキットは基本培地 (Endothelial Basal Medium-2, EBM-2) と内皮細胞添加因子セット (EGM-2 supplements) から構成されている。クリーンベンチ内にて基本培地に添加因子を加えることで内皮細胞培養メディウムを調製した。冷蔵庫内にて冷暗保存し、使用期限1ヶ月以内とした。

(c) コラーゲン溶液の調製

超純水で調製した0.02 N酢酸80 mLをオートクレーブによって滅菌処理した後、クリーンベンチ内にて4 mLの0.5%コラーゲン酸性溶液を加えることで調製し、冷蔵庫内にて冷暗保存した。

(d) トリプシン溶液の調製

トリプシンを除く全ての試薬をTable 2.3に示す組成に従いPBS(-) 180 mLに溶解した。溶液が均一になったところで溶液を十分に冷やし、トリプシンを加えた。200 mLにメスアップした後、pH8.0に調整した。クリーンベンチ内にてMillipore® Sterivex™-GVを用いて濾過滅菌し、オートクレーブ滅菌済みのボトルに分注して冷蔵庫内にて冷暗保存した。

Table 2.1 Recipe of PBS(+).

| | |
|--|-----------|
| NaCl | 8.000 g/L |
| KCl | 0.200 g/L |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 2.885 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 0.200 g/L |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0.100 g/L |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.132 g/L |
| Glucose | 1.350 g/L |

Table 2.2 Contents of EGM-2.

| | |
|----------------|--------|
| hEGF | 0.5 mL |
| heparin | 0.5 mL |
| Hydrocortisone | 0.2 mL |
| FBS | 10 mL |
| GA-1000 | 0.5 mL |
| hFGF-B | 0.2 mL |
| Ascorbic acid | 0.5 mL |
| VEGF | 0.5 mL |
| R3-IGF-1 | 0.5 mL |

Table 2.3 Recipe of Trypsin solution.

| | |
|--|---------|
| NaCl | 1.600 g |
| KCl | 0.080 g |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 0.024 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.012 g |
| NaHCO ₃ | 0.070 g |
| glucose | 0.200 g |
| phenol red | 0.004 g |
| EDTA·2Na | 0.050 g |
| Trypsin | 0.150 g |

2.1.5.3 HUVECの継代培養

培養フラスコにコラーゲン溶液3 mLを加え、室温下で15分間インキュベートすることでコラーゲンコートを行った。PBS(+) 3~4 mLで2回洗浄した後、細胞培養メディウムを培地として加え、37°C、5% CO₂ 雰囲気下、インキュベーター内にて培養を行った。培養した細胞を回収する際には、まず上清を除き、PBS(-) 3~4 mLを2回加えて表面を洗浄した。2 mLのトリプシン溶液を加えて37°Cで2分間インキュベートを行った。細胞が剥がれたことを光学顕微鏡で確認した後、細胞培養メディウム8

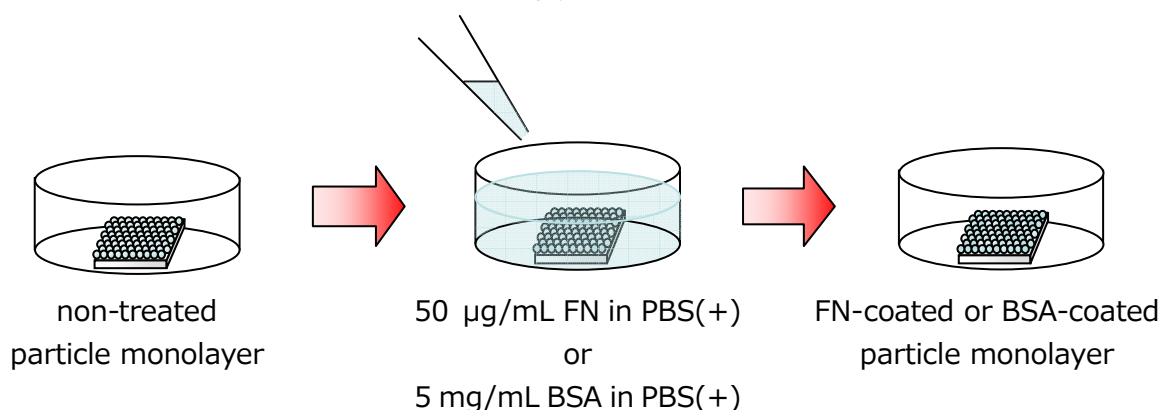
mL を加えてトリプシンを中和させた。細胞懸濁液全量を 50 mL 遠沈管に移し、25°C、1,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、細胞を沈降させた。遠心分離後、デカンテーションによって上清を除きトリプシンを除去した。細胞培養メディウム 6 mL を加えて細胞を再分散させ、そのうちの 2 mL を継代培養のために利用し、残りの 4 mL を細胞実験に用いた。継代は細胞がコンフルエントの状態になるのを避けるため、2 日ごとに行った。

2.1.6 粒子膜上における細胞の接着形態の観察

2.1.6.1 光学顕微鏡による観察

<基板の前処理および細胞の播種>

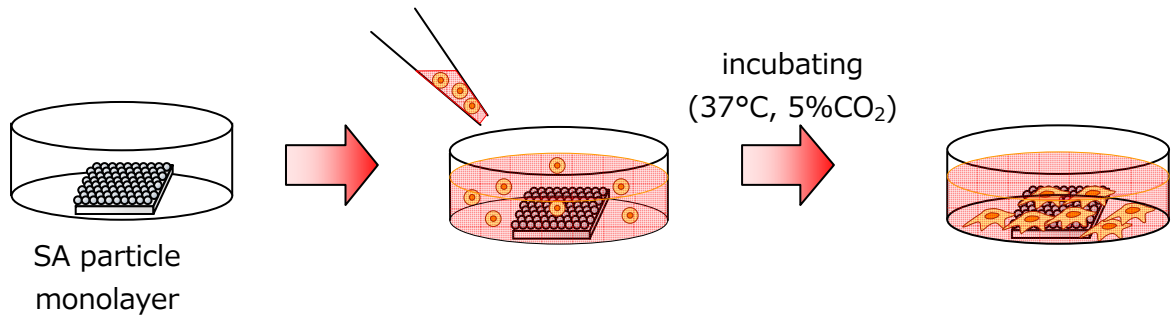
まず粒子膜を累積したカバーガラスを PS dish 内に静置し、2 mL の 70%エタノール水溶液を加えて滅菌処理を行った。そしてサンプルをクリーンベンチ内に入れ、PBS(+) 2 mL で 2 回洗浄してエタノールを除去した。(ここで、粒子膜に対してウシ血漿フィブロネクチン(FN)やウシ血清アルブミン(BSA)といったタンパク質を吸着させて前処理を行う場合には、PBS(+))を除去した後、所定濃度の FN 溶液もしくは BSA 溶液 (0.2 μm フィルターで濾過滅菌済み) 2 mL を PS dish に加えて 37°C、5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベートしてタンパク質を粒子膜に吸着させた。インキュベート後、PBS(+)で 2 回洗浄した)。そして PBS(+))を除去してからメディウムを 2 mL 加えて実験に用いるまでインキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で保存した。そして 2.1.5.3 で培養した細胞を各サンプルに対して一定の細胞播種密度で加え、インキュベーター内で培養を行った。



Scheme 2.3 Process of protein coating onto PS dish and particle monolayer.

<細胞播種密度について>

細胞播種密度を 1.0×10^4 、 5.0×10^4 および 2.0×10^5 cells/cm² と変化させて培養を行い、細胞の接着形態が変化するかどうかを観察した。光学顕微鏡を用いて、細胞を播種してから一定時間後に各サンプルの粒子膜上の細胞の形態を観察した。



Scheme 2.4 Cell culture on a particle monolayer.

2.1.6.2 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による観察

<共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の原理>

共焦点レーザー走査顕微鏡法は、ある厚みを持った試料中の特定の X-Y 断面に焦点を合わせ、同時にその上下の焦点が合っていない部分からの光を排除しながら観察する手法である。したがって、この方法を用いることによって無侵襲的に光学的切片の鮮明な画像を得ることができる。そのため物質の細胞内輸送の追跡や特定遺伝子の発現の観察などに利用されている。また共焦点レーザー顕微鏡では複数の Z 軸座標における X-Y 断面の光学切片像をコンピューターに取り込み、再構築することによって 3 次元画像を得ることも可能である。これは細胞の形態や細胞内部の立体的な情報を得るためにしばしば利用される。

共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の基本的な構造を Figure 2.8 に示す。共焦点レーザー顕微鏡法では、観察試料に蛍光物質の励起波長に適合した波長を持つ光を照射し、試料からの蛍光発光を検出する。対物レンズの焦点に収束した照明光は、蛍光色素を励起する (Figure 2.8 blue line)。そこから発光した蛍光を、対物レンズが集光して結像させる (Figure 2.8 green line)。この結像位置に合わせてピンホールを置く (このとき、光源、試料内の対物レンズの焦点、ピンホールの 3 カ所が光学的に共役な位置、すなわち共焦点となる)。ピンホールに結像した光はそこを通過し、検出器 (一般的に光電子増倍管が用いられる) にて電気信号に変換される。一方、試料の焦点から外れた場所では、励起強度が焦点位置に比べて低く、蛍光強度が弱い。またその蛍光はピンホールから外れた位置に結像するため、検出器に届きにくい (Figure 2.8 red line)。

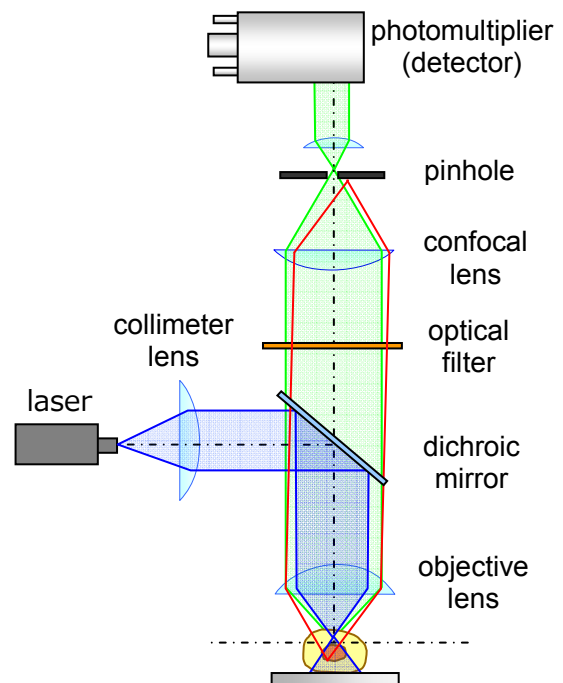


Figure 2.8 Illustration of a confocal laser scanning microscope.

<実験方法>

細胞を 3 時間および 24 時間培養した後にメディウムを除去し、PBS(+) 1 mL で 3 回洗浄した。そして 3%パラホルムアルデヒド溶液 1 mL を加えて 20 分間静置し、細胞を固定化した。そして 3%パ

ラホルムアルデヒド溶液を除去してから PBS(+)1 mL で 3 回洗浄した後、さらに 0.1wt% TritonX-100 溶液を 1 mL 加えて 15 分間静置して細胞の可溶化を行った。最後に rhodamine-conjugated phalloidin (終濃度 1 unit/mL) PBS(-)溶液 1 mL を加えて細胞骨格のアクチンフィラメントを染色した。蛍光顕微鏡を使用して細胞骨格を観察し、細胞の形態を撮影した。染色した細胞を一定時間培養した後に細胞骨格を染色したサンプルを、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 BioRad Radiance 2000 (日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)) を使用して観察した。これらの作業は全て遮光下、室温で行った。

2.1.6.3 FE-SEM による観察

<SEM 用試料の作製法>

SEM 試料の作製のためには、まず細胞を基板と相互作用させた後、PBS(+)で 2 回洗浄してから 3% グルタルアルデヒド溶液を加えて遮光下室温で 1 時間静置し、細胞を固定化させた。そして PBS(+)で 2 回洗浄してから 55%エタノール→65%→75%→85%→95%と 30 分ごとに置換することによって 4°C 遮光下で一晩静置した。ここでエタノールに置換する目的は、細胞内部の水分が凍結して、その体積の膨張によって細胞膜が破壊されることを防ぐためである。翌日、試料を液体窒素によって凍結させた後に凍結乾燥を行い、慶應義塾大学理工学部中央試験所の FE-SEM S-4700 (HITACHI) を利用して観察した。

2.1.7 タイムラプス顕微鏡法による観察

<タイムラプス顕微鏡法について>

タイムラプス観察とは、試料の時間変化を追跡するために一定時間ごとに写真を撮影し、それらの連続写真を動画に変換する手法である。顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行う観察法をタイムラプス顕微鏡法と呼び、生細胞を観察対象とする場合が多い。通常の透過光の他、蛍光のタイムラプス観察も可能である。

<実験操作>

SA527 粒子膜および SA1270 粒子膜に細胞を 5.0×10^4 cells/cm² の密度で播種し、37°C, 5%CO₂ 雰囲気下で培養しながらタイムラプス顕微鏡 (Cellwatcher ZOOM、コアフロント社) で細胞を 15 分おきに観察した。またコントロールとして TCPS のサンプル (2.0×10^4 cells/cm² の播種密度で 1 d 培養したもの) も同様にタイムラプス観察を行った。

2.1.8 免疫染色による細胞-基板間接着および細胞-細胞間接着の観察

<免疫染色について>

免疫染色 (immunostaining) は、抗原抗体反応の高い基質特異性を利用し、組織標本中の抗原に対して抗体を反応させることによって染色を行う手法である。免疫染色法には直接法と間接法の 2 種類がある。直接法は抗原に対して反応する抗体を標識することによって可視化する方法であり、抗体を 1 種類だけしか用いないため特異性は高いが、逆に検出感度が低いという特徴がある。それに対して間接法は複数の抗体を利用して発色化する方法である (多くの場合、抗原に作用する一次抗体と、一次抗体を認識する標識化された二次抗体を用いる)。間接法は直接法に比べて検出感度は高いが、その反面特異性が低い。また、抗体の標識化にはいくつかの種類があり、放射性同位元素や金ナノ粒子、蛍光物質、酵素 (ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど) が用いられる。本実験では蛍光物質で標識化した抗体を用いた。

<免疫染色による細胞-基板間接着および細胞-細胞間接着の観察>

各基板に対する細胞接着および隣接する細胞との接着を可視化するために、ビンキュリンおよび β -カテニン(それぞれの詳細は後述)を染色し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡にて観察することを試みた。具体的な実験操作を以下に示す。24穴プレートの各ウェル内にて培養したサンプルをPBS(-)によって2回洗浄し、3%パラホルムアルデヒド-PBS溶液1 mLを加えて細胞を固定化した(室温、20 min)。固定化後にPBS(-)で2回洗浄し、0.1wt% TritonX-100-PBS溶液1 mLを加えて細胞膜を可溶化した(室温15 min)。再びPBS(-)で2回洗浄後、1wt% BSA-PBS溶液1 mLを加えてブロッキング(抗体の非特異的吸着を抑制するために、あらかじめ無関係のタンパク質を吸着させておくこと)を行った。そして一次抗体である抗ヒトビンキュリンマウスIgG抗体-1% BSA-PBS溶液(1:100)または抗ヒト β -カテニンマウスIgG抗体-1% BSA-PBS溶液(1:1000)を500 μ L添加してインキュベートした(室温、60 min)。反応後0.1wt% Tween-PBS溶液1 mLで2回洗浄し、1wt% BSA-PBS溶液1 mLで1回洗浄した。さらに二次抗体であるFITCラベル化抗マウスIgGヤギIgG抗体-1wt% BSA-PBS溶液(1:200)を500 μ L添加してインキュベートした(室温、60 min)。反応後0.1wt% Tween-PBS溶液1 mLで2回洗浄し、1wt% BSA-PBS溶液1 mLで1回洗浄した。さらにローダミン-ファロイジン-PBS溶液(1:200)を500 μ L添加してインキュベートした(室温、60 min)。反応後にPBS(-)1 mLで3回洗浄し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡にて染色したサンプルの観察を行った。

2.1.9 細胞増殖性の評価

TCPS, SA527 粒子膜, SA1270 粒子膜における細胞増殖性を評価した。細胞播種密度 5.0×10^4 cells/cm²で細胞を播種し、1, 2, 3 および 4 d 培養後にそれぞれ細胞数を計測することとした。培養の際には1日おきにメディウムを交換した。細胞数計測の具体的な操作を以下に示す。

細胞を37°C, 5%CO₂ 雰囲気下で所定時間培養後、メディウムを除去してPBS(-)1 mLで2回洗浄した。そしてトリプシン溶液500 μ Lを加えて37°Cで2~3分インキュベートし、細胞を剥離・再分散させた。細胞懸濁液から20 μ Lをマイクロピペットではかり取り、血球計算盤に滴下して細胞数を計測した。

2.1.10 細胞の長期間培養

血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)や血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)のような成長因子群を含む環境で血管内皮細胞を長期間培養すると細胞が血管新生を起こし、管腔構造を形成する(2.2.4を参照)。そこで、本研究においても粒子膜上で長期間培養を行い、HUVECの管腔構造を形成させることを試みた。細胞を 2.0×10^5 cells/cm²の密度で基板に播種し、培養48時間ごとに細胞培養メディウムを交換することで1週間以上培養を継続することを目的とした。

2.2 結果および考察

2.2.1 高分子微粒子の作製およびキャラクタリゼーション

2.2.1.1 ソープフリー乳化重合について

ソープフリー乳化重合は乳化剤を使用しない乳化重合である。すなわち重合に必要なものはモノマー、溶媒、開始剤のみである。開始剤は重合を促進させる役割とモノマーミセルおよびポリマー粒子の分散安定性を保持する役割を兼ね備えている。表面に提示された開始剤末端由来の官能基がミセル同士の分散安定性を保つため、通常の乳化重合と同様に単分散性の高い粒子が得られる。また乳化剤を使用しないことで不純物の少ない粒子が得られるという利点がある。

本実験では開始剤に過硫酸カリウム (KPS) を使用した。KPS は熱分解によってラジカルを発生し、モノマーを攻撃して重合を開始させる。KPS 残基は硫酸基-SO₄⁻による強い負電荷を有し、静電的斥力によって分散安定性を保っている。

2.2.1.2 ソープフリー乳化重合における粒子形成機構

ソープフリー乳化重合における微粒子の作製は 1970～1980 年代において精力的に研究された。モノマーとして主にスチレン (St) やメタクリル酸メチルなどが利用され、粒子形成のメカニズムについて様々な解析が行われた。しかし粒子形成機構に対する統一的な見解はいまだ得られていない。粒子形成機構は、不安定な重合核が析出する粒子核形成期、そしてそれらが凝集して安定な粒子を形成し、重合の進行に伴って成熟していく粒子成長期に分けられる。ここでは最もよく用いられるモノマーのひとつである St について説明する。St のソープフリー乳化重合の場合、粒子核形成期では「ミセル核形成 (micellization nucleation) モデル」³³⁾、粒子成長期では「表面相重合 (surface phase polymerization) モデル」³⁴⁾が提案されている。以下にその詳細を示す。

・第1段階 ミセル核形成

St モノマーは油滴として連続相 (水相) 中に分散している。St は水相に対してわずかに溶解しており、水溶性開始剤 KPS を注入すると水相で St モノマーと開始剤が反応する。そして数分後には分子量 1,000 程度のオリゴマーが形成される。このオリゴマーは親水性部分 (開始剤由来) と疎水性部分 (モノマー由来) を持った両親媒性物質と見なすことができるため、ある程度の鎖長まで成長するとミセル化を起こすと考えられている。一般的に、ミセルを形成するためには特定の両親媒性物質が一定濃度以上になる必要があり、この濃度を臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration, CMC) と呼ぶ。臨界ミセル濃度は以下の関係式で表される³⁵⁾。

$$\log \text{CMC} = A - B \cdot N \quad (2.5)$$

N : 鎖長

A, B : 定数

上式より臨界ミセル濃度は鎖長が長くなるほど低下することが理解できる。したがってオリゴマーの成長と共に CMC は低下し、CMC に達したオリゴマーがミセル化を起こす。ミセルを形成する際のオリゴマー分子の配向速度は重合反応よりもはるかに速い。このオリゴマーミセル粒子核は、開始剤末端由来の表面電荷のため安定であり、凝集はほとんどない。

・第2段階 粒子の成長（表面相重合モデル）

生成したオリゴマーミセル粒子核が水相に溶解しているモノマーおよびオリゴマーフリーラジカルを取り込んで成長し一次粒子が生成する。成長反応の進行によって内部に高分子量のポリマーが形成されると、一次粒子における表面電荷密度の急激な減少が起こり、一次粒子は安定性を失って凝集する。このとき粒子サイズの増大および粒子数の減少が起こる。粒子の凝集は比表面積の減少を伴うため、粒子の表面電荷密度は増大する。また粒子サイズの増大および粒子数の減少は、粒子同士の接触頻度を低下させ、粒子凝集速度を低下させる。したがって一次粒子の凝集により、コロイド的に安定な粒子が生成する。その後、粒子数はほぼ一定のまま重合が進行する。凝集による粒子サイズの増大は、粒子内部のフリーラジカル数の増加をもたらすので、粒子内部における重合反応が促進される。このとき粒子表面に開始剤末端を水相に提示したポリマーラジカルが偏在し、コア-シェル様構造を形成すると考えられている。ラジカルは粒子内部および水相から供給されたモノマーを取り込んで成長する。そして粒子は最終的にモノマー転化率が90%程度に達するまで重合を続ける。

2.2.1.3 SA 粒子の形成機構

次に、St および AAm を用いたソープフリー乳化共重合における粒子形成機構について説明する。St は水に対する溶解性が比較的低いのに対し、AAm の水溶性は非常に高い。粒子核の形成は、連続相（この場合は水相）に対するモノマーの溶解性に強く影響を受けるため、St と AAm の共重合は、St 単独の重合とは反応機構が異なる。St よりも水溶性が高いメタクリル酸メチルの場合には、粒子核の形成機構として「均一核生成（homogeneous nucleation）モデル」が提唱されている³⁶⁾。St および AAm のソープフリー乳化共重合の場合にも、この「均一核生成モデル」が該当すると考えられている³⁷⁾。また粒子の成長については St 単独の場合と類似した「シェル成長（shell growth）モデル」と呼ばれる反応機構で説明される³⁷⁾。

・第1段階 均一核生成

具体的には、まず水相で St と AAm の共重合が起こる。水相における AAm の重合が優先的に起こるため、得られるコポリマーは仕込みモノマー比と比較して AAm ユニットの割合が多くなる。重合の進行とともにポリマーの分子量が増大すると、臨界鎖長に達したポリマーが水相から析出し、それらのポリマー同士が凝集して一次粒子を形成する。

・第2段階 粒子の成長（シェル成長モデル）

生成した一次粒子同士が衝突して凝集すると、高い表面電荷密度を有する安定な粒子が生成する。粒子内のポリマーは St モノマーを取り込んで成長し、硬質粒子が形成される。その後さらに重合が進行し、粒子は成長する。このときポリマーの成長反応は表面相（シェル領域）において生じると考えられている。このシェル領域は成長ポリマーの鎖長を反映していることが明らかになっており、成長中のポリマーラジカルの-SO₄末端が粒子表面に存在し、成長末端がシェル領域に存在すると考えられている。

また、St と AAm の共重合によって得られるポリマーの組成比に関しては、Otsuka らが詳細な解析を行っている³⁷⁾。重合最初期には、主に水相で反応が進行するため、仕込みモノマー比と比較して AAm の組成比が高いポリマーが生成する。しかしその後ポリマーの成長と共に粒子核の形成が生じると、St モノマーが粒子内部に取り込まれて成長するため、St リッチなポリマーが生成するようになる。さらに重合が進行すると反応系内の St が減少するため、再び AAm 組成比が高くなる。最終的に、粒子の

内部が $St > AAm$ 、粒子の外部が $St < AAm$ となったコア-シェル様粒子が得られると考えられている。

2.2.1.4 NaCl の効果 (方法 A)

ここでは NaCl によって粒子径の制御を試みた。Table 2.4 に結果を示す。NaCl を加えない場合は 358 nm であったのに対し、NaCl を加えることで粒子径が 500~700 nm 程度に増大した。粒子の形成において粒子核が凝集する過程で、電解質 NaCl が加えることで粒子核の見かけの表面電荷が遮蔽されて小さくなり、そのため静電的反発力が小さくなり、粒子核が凝集しやすくなって、その結果粒子径が増大したと考えることができる。

しかし NaCl の添加による弊害も見られた。NaCl の添加量が比較的多い場合には粒子の表面は滑らかではなく凹凸が見られるようになった (Figure 2.9 A-4, 5)。また数マイクロメートル程度の粒子の凝集体が多く見られるようになってしまった。本来、重合初期に生じていた粒子の凝集が、NaCl の添加によって重合終盤においても生じるようになったと考えられる。このような粒子表面のナノサイズの凹凸や粒子の凝集体は単層粒子膜を作製する上で望ましくない要素であるが、TEM による粒子径分布 Dw/Dn の計算結果においても単分散であることが示された粒子のみ用いて単層粒子膜の作製に利用した。

Table 2.4 Characteristics of SA particles prepared by soap-free emulsion polymerization (method A).

| code | St / g | AAM / g | H ₂ O / g | KPS / g | NaCl / g | dried particle diameter / nm | D_w/D_n |
|------|--------|---------|----------------------|---------|----------|------------------------------|-----------|
| A-1 | 10.0 | 0.30 | 120.0 | 0.10 | — | 358 | 1.001 |
| A-2 | 10.0 | 0.30 | 120.0 | 0.10 | 0.20 | 489 | 1.001 |
| A-3 | 10.0 | 0.30 | 120.0 | 0.10 | 0.20 | 527 | 1.001 |
| A-4 | 10.0 | 0.30 | 120.0 | 0.10 | 0.30 | 692 | 1.004 |
| A-5 | 10.0 | 0.30 | 120.0 | 0.10 | 0.40 | 681 | 1.003 |

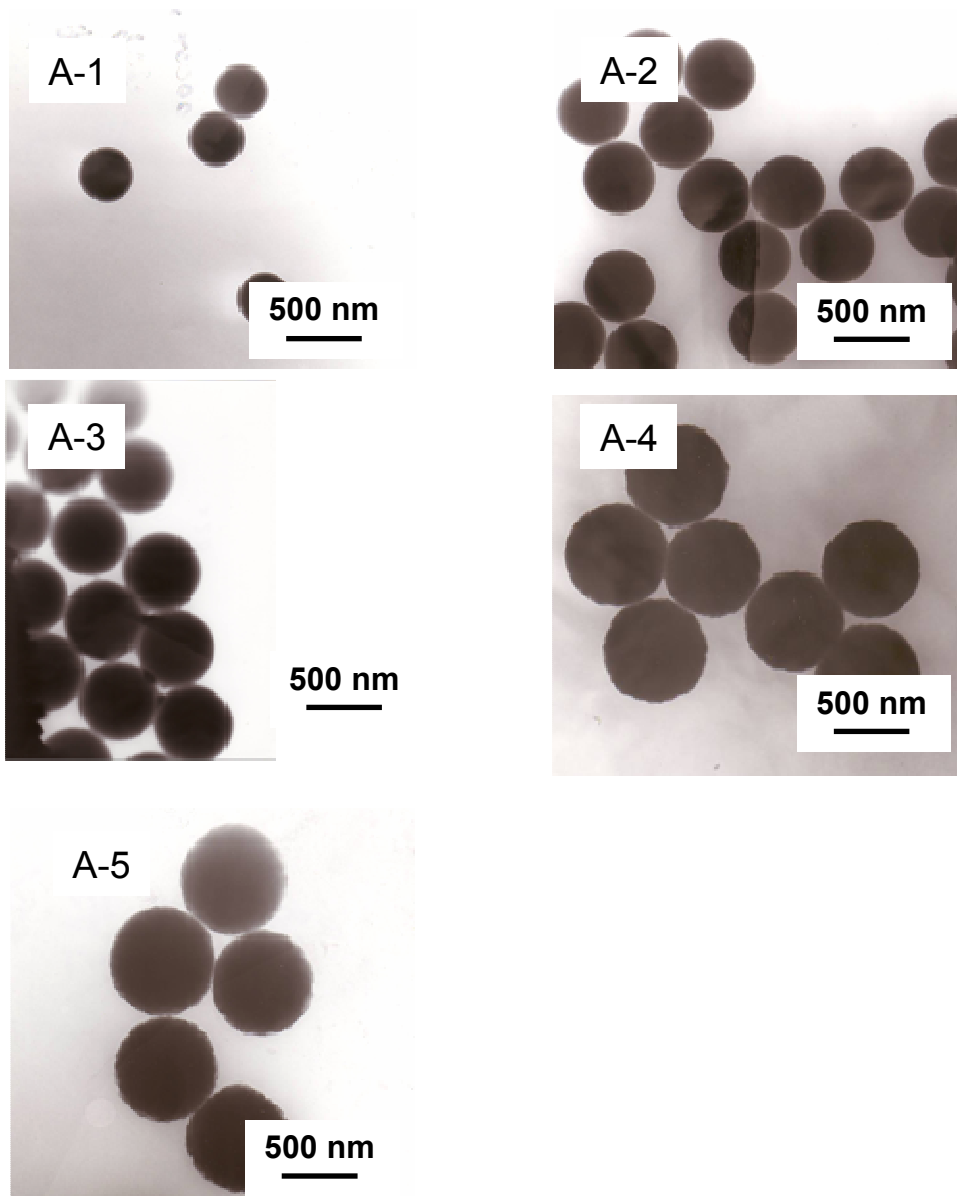


Figure 2.9 TEM photos of SA particles prepared by method A.

Table 2.5 Characteristics of SA particles prepared by soap-free emulsion polymerization (method B).

| code | St / g | AAm / g | H ₂ O / g | KPS / g | NaCl / g | DMF / g | dried particle diameter / nm | D_w/D_n |
|------|--------|---------|----------------------|---------|----------|---------|------------------------------|-----------|
| B-1 | 20.0 | 0.75 | 60.0 | 0.216 | 0.07 | — | 416 | 1.000 |
| B-2 | 20.0 | 0.75 | 54.0 | 0.216 | — | 6.0 | 1189 | 1.001 |
| B-3 | 20.0 | 0.75 | 54.0 | 0.216 | 0.07 | 6.0 | 1270 | 1.001 |
| B-4 | 20.0 | 0.75 | 54.0 | 0.216 | 0.14 | 6.0 | 1477 | 1.000 |

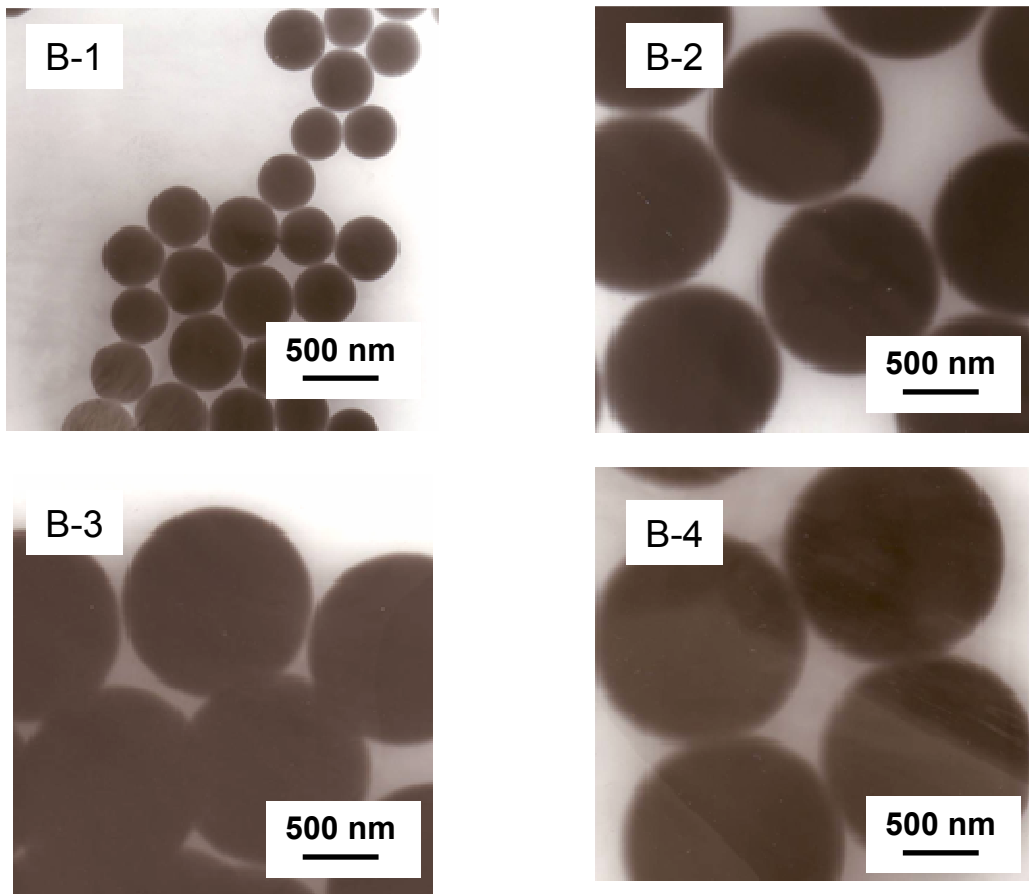


Figure 2.10 TEM photos of SA particles prepared by method B.

2.2.1.5 DMFの効果 (方法 B)

ここでは DMF と NaCl の添加量と粒子サイズ効果について検討した (Table 2.5)。NaCl の添加による粒子径の増大と DMF の添加による粒子径の増大を比較すると、DMF を添加した場合において粒子径が急激に増大していることがわかる。DMF は水と混和する有機溶媒であり、St (水に不溶) を溶解することができる。したがって DMF を添加することによって CMC が増大して粒子核の形成が遅くなったと予想される。重合度が増大することによって結果的に粒子数は減少するが、粒子径が増大したと考えられる。また NaCl を併用することによって粒子径のさらなる増大が可能になった。また得られた粒子の表面形状はいずれも平滑であった (Figure 2.10)。これは NaCl と DMF の併用によって、粒子を必要以上に不安定化することなく粒子径を増大させることが可能であったことを示唆している。

2.2.1.6 AAm 先行重合の効果 (方法 B)

重合進行の遅い AAm を先に重合させることによって、通常の方法よりも AAm 組成比の高い SA ポリマーを作製することができる。したがって、SA ポリマーの沈殿を遅らせ、重合度を上げて粒子径を増大させることができると考えられる。

2.2.1.7 粒子のゼータ電位について

材料表面の電荷が細胞の増殖率に影響を与えるという事例が報告されている³⁹⁾。したがって細胞と単層粒子膜との相互作用を評価するにあたり、膜作製に用いたそれぞれの粒子の表面電荷が異なることは好ましくない。それぞれの粒子のゼータ電位を測定したところ、ほとんど差が見られなかった (Table 2.6)。したがって単層粒子膜と細胞との相互作用において静電的な効果は同じであると考えられる。ただしこの表面電荷がどの程度の影響を与えているかは未知数である (一般的に、正電荷が強い場合には、細胞膜表面は負に帯電しているために静電的引力が働き、細胞毒性を示す。逆に負電荷が強い場合には細胞と静電的反発力が働き、細胞の接着が抑制される)。

Table 2.6 ζ -potentials of SA particles.

| | ζ -potential / mV |
|--------|-------------------------|
| SA489 | -12.75 |
| SA527 | -12.93 |
| SA692 | -13.28 |
| SA1270 | -10.40 |

2.2.2 L-B 法による単層粒子膜の作製

2.2.2.1 分散媒について

粒子を水面上に展開するときには水ではなくエタノールを使用したのは、水では粒子が水面上に浮くことができないためである。粒子を水面上に浮かべるためには、分散媒がサブフェーズと混和しにくく、また速やかに蒸発する必要がある。しかしエタノールは KPS 残基の解離度を低下させ、粒子の静電反発力を抑制する働きがある。その影響のため、分散媒を完全にエタノールに置換すると粒子は水面に展開した段階で凝集してしまい、密にパッキングされた粒子膜を作製することができなかった。そこで、水とエタノールの混合比を変えて実験を行ったところ、分散媒を (水/エタノール=2/8) に置換したラテックスは水面上で凝集が起りにくかった。そこで本実験では (水/エタノール=2/8) を分散媒として使用した。

2.2.2.2 π -A 曲線の作製および粒子膜の作製

粒子膜の作製に先立って、まず粒子膜の表面圧-面積曲線 (π -A 曲線) を作製した。結果を Figure 2.11 にその結果を示す。トラフの水面の面積を可動バリアによって減少させるに従って、表面圧が上昇した。この π -A 曲線をもと元にして、粒子膜の累積時の標的圧力をそれぞれの粒子について決定した。このとき、サブフェーズに蒸留水を用いると水面上に粒子が浮かばない場合があることがわかった。そのためサブフェーズに KCl 水溶液を用いることにした。蒸留水に塩を添加することによって密度が高くなるため、粒子が水面に浮かびやすくなることが期待される。そこで、それぞれの粒子について KCl 濃度の最適化を行った。このとき水面上に浮遊している粒子の分散安定性は KCl の添加量に依存していた。これは K^+ が粒子表面の開始剤由来の $-SO_4^-$ を遮蔽するためだと考えられ、KCl の添加量が多いほど粒子の分散安定性が悪く、水面上で自己集積 (軟凝集) もしくは凝集してしまうことがわかった。最適な KCl 濃度は、SA489, SA527 および SA692 粒子についてそれぞれ 4 mM, 8 mM および 8 mM であった。SA1270 粒子については KCl を用いなくても水面上に浮かぶことがわかった。

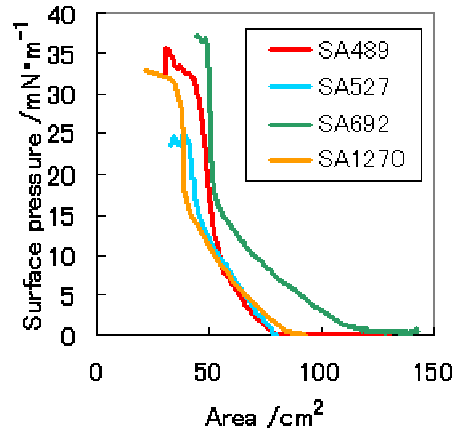


Figure 2.11 π -A curves of SA particles spread on a water.

粒子が気液界面で安定に存在できるかどうかは、粒子表面の性質が大きく関係していると思われる。SA 粒子はその表面に polyAAm が多く存在しており親水性であると考えられる。しかし SA 粒子には水面に浮かぶものと浮かばないものが存在した。試薬の組成や重合法 (方法 A および B) によって異なっていると考えられる。そのため、L-B 法を利用した粒子膜の作製には、粒子膜を作製するために必要な時間だけ水面上に安定に存在することのできる粒子のみを利用した。今回作製した、SA489, SA527, SA692 および SA1270 については粒子膜の作製が可能であることが確認できた (Figure 2.12)。

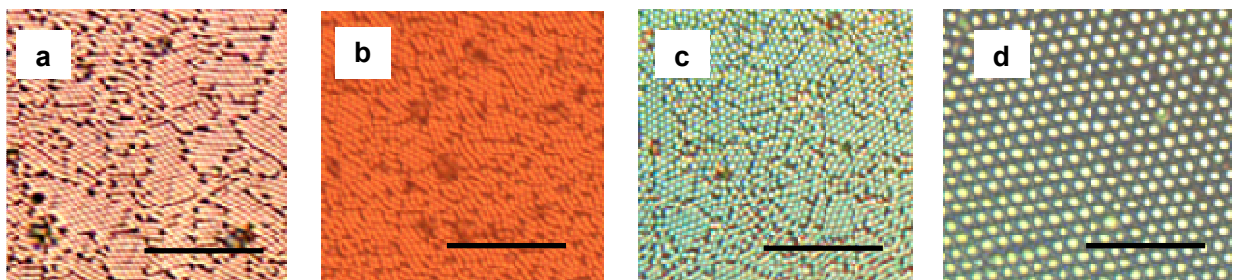


Figure 2.12 Optical microscopic images of SA489 (a), SA527 (b), SA692 (c), and SA1270 (d) particle monolayers. Scale bars indicate 10 μ m.

またこれらの粒子膜は細胞実験に使用する前に 100°C で 30 分間インキュベートして熱処理を行った。これは粒子膜を融着させることにより基板から剥離しないようにするためである。

2.2.3 単層粒子膜のキャラクタリゼーション

2.2.3.1 FE-SEM による観察

粒子膜の画像を Figure 2.13 に示す。ここでは熱処理前後で粒子膜の形態がどのように変化するかを観察した。熱処理によって粒子同士が融着していたものの、粒子膜全体の凹凸構造は保持されていることがわかった。熱処理前後における粒子膜の凹凸構造の変化をより詳細に調べるために、AFM による観

察を行った。

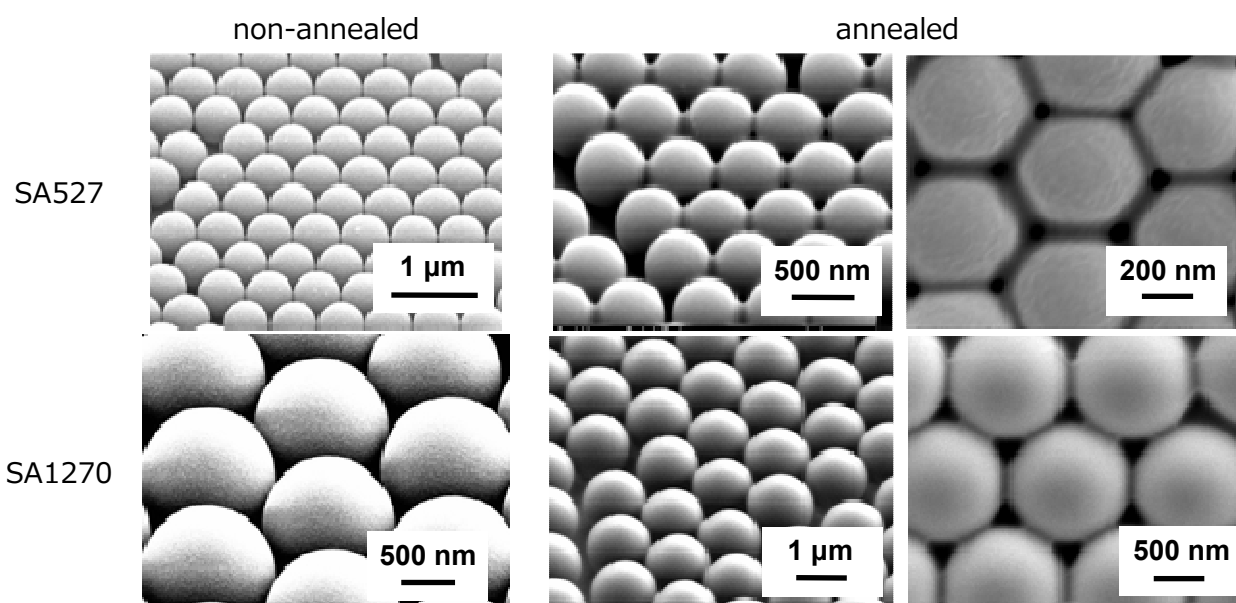


Figure 2.13 FE-SEM photos of SA527 and SA1270 particle monolayers before and after heat treatment.

2.2.3.2 AFM による観察

AFM を用いて観察した粒子膜の画像を Figure 2.14 および 2.15 に示す。またコントロールとして TCPS、標準粒子として PMMA 粒子（カバーガラスにラテックスを滴下し、自然乾燥させたもの）も合わせて観察した（Figure 2.16）。

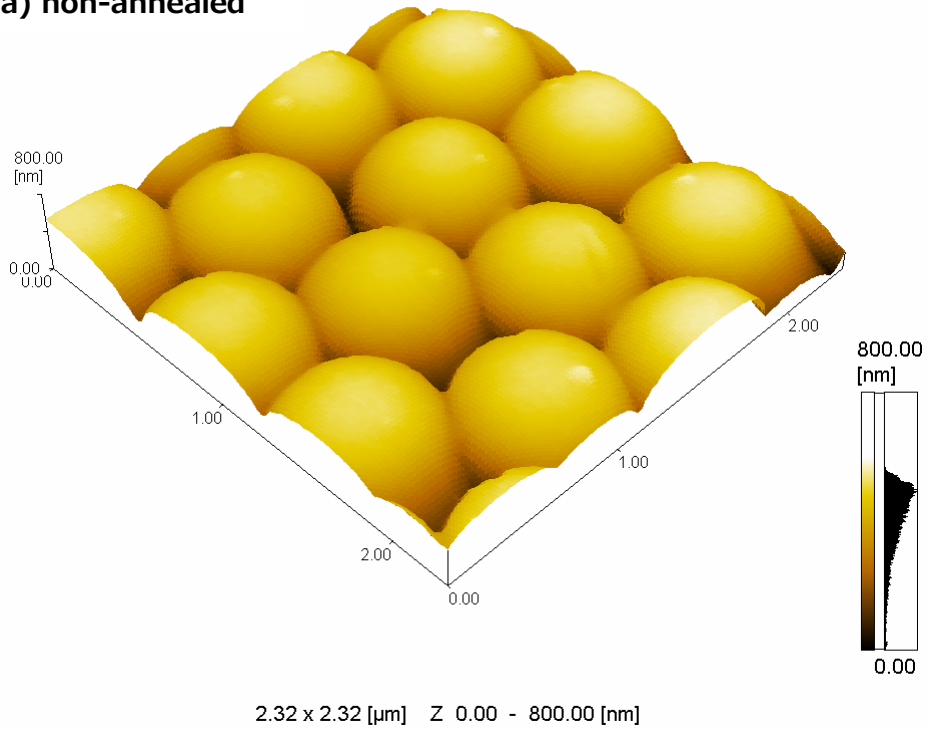
AFM においては粒子同士の融着は顕著ではなかった。しかし、粒子膜の凹凸の間隔（ピッチ）を測定したところ、実際の粒子径よりも大きいことがわかった。TEM から算出した粒子径と、AFM で測定した粒子膜のピッチとを比較した結果を Table 2.7 に示す。TEM で測定した粒子径と AFM から算出した粒子径は異なっている。この原因として考えられることは、AFM の測定原理に由来する問題点である。AFM の測定においては、探針が試料表面に接触することによって試料表面の形状を観察する。このとき AFM の測定精度は探針のアスペクト比（縦横比）に依存している³³⁾。試料が球状（もしくはそれに近い曲面）の場合には、AFM の探針が粒子の側面と接触する可能性があり、実際の粒子径よりも大きく計測されてしまう（Figure 2.17）。Table 2.7 において粒子径（AFM）/粒子径（TEM）が粒子によらずほぼ一定（1.3~1.4）になっているが、このことは前述の測定誤差が探針に由来していることを裏付けている。探針には測定したい要素、バネ定数、アスペクト比に応じて様々な種類があるが、今回のように凹凸が大きい試料の場合には、よりアスペクト比の高い探針を選択する必要があると考えられる。

Table 2.7 Diameters of particles measured by TEM and AFM.

| | diameter / nm | | AFM/TEM | calculated diameter / nm |
|--------|---------------|---------|---------|--------------------------|
| | TEM | AFM | | |
| PMMA | 474 | 630±20 | 1.33 | — |
| SA527 | 527±8 | 700±30 | 1.34 | 552 |
| SA1270 | 1270±20 | 1740±50 | 1.37 | 1210 |

粒子径 (AFM) / 粒子径 (TEM) の値を利用して、熱処理後の粒子膜の AFM 画像から得られた粒子径を補正した値を Table 2.7 に示す。この結果より、粒子膜は熱処理後も凹凸構造に大きな変化がないことがわかった。

(a) non-annealed



(b) annealed

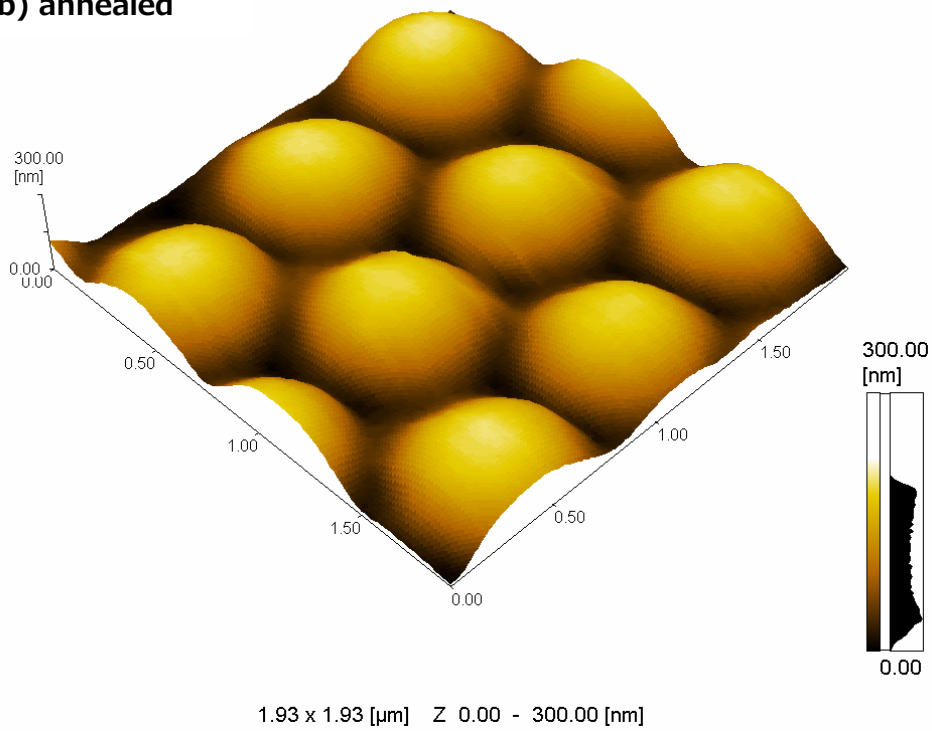
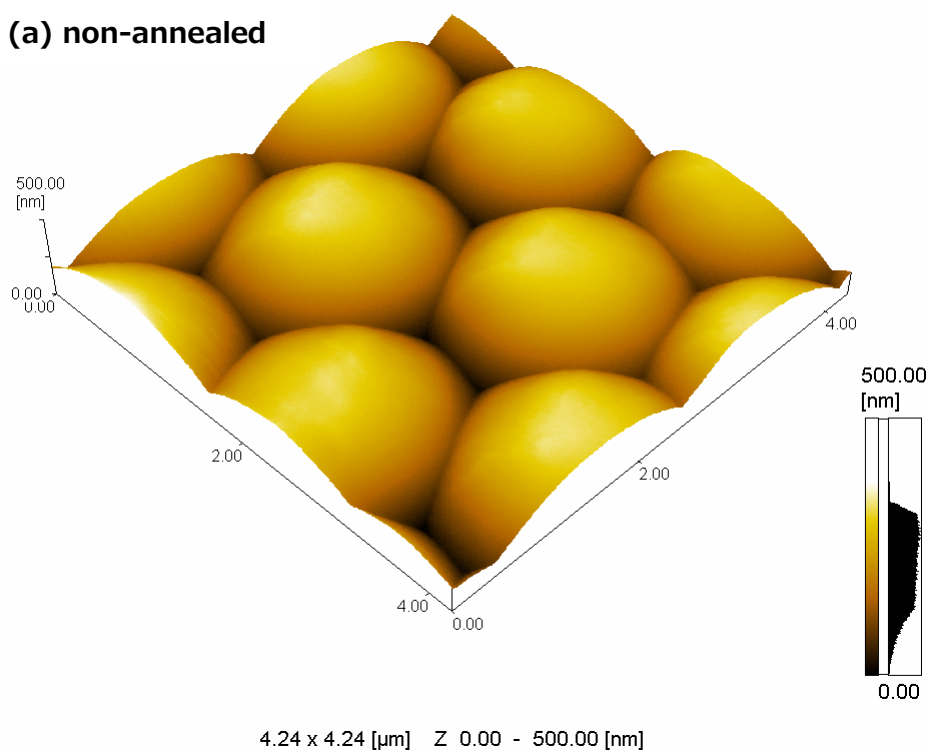


Figure 2.14 AFM images of SA527 particle monolayers.

(a) non-annealed



(b) annealed

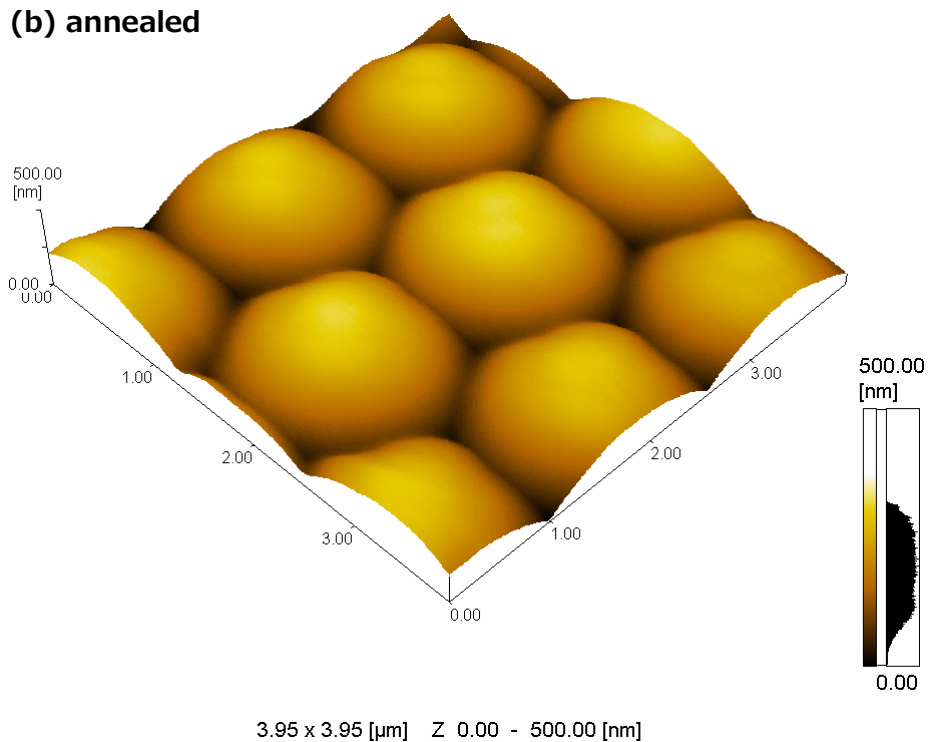
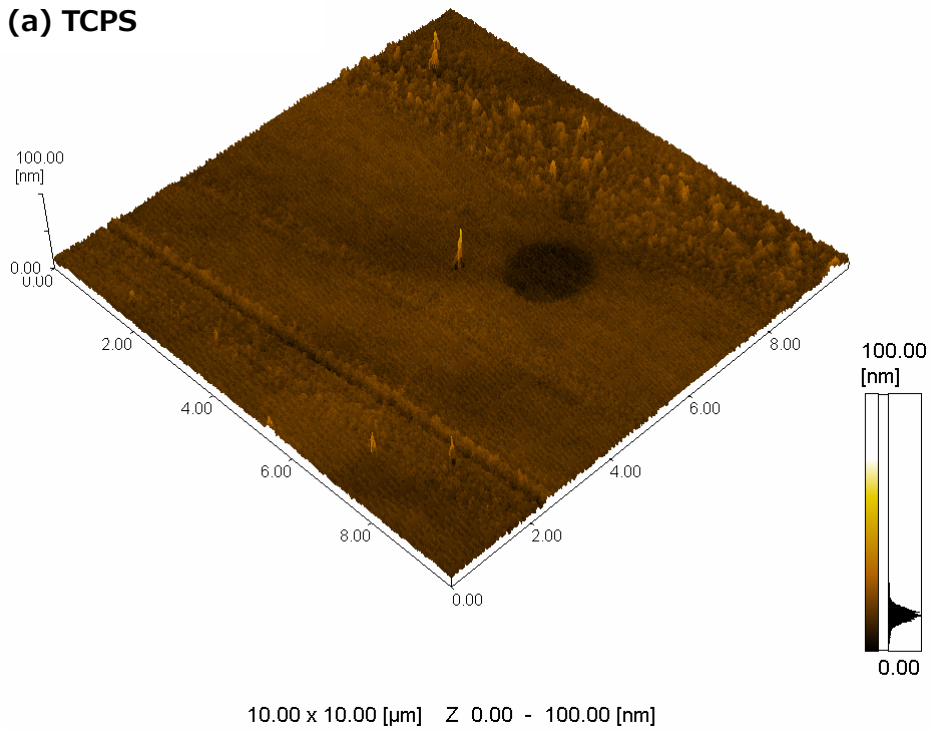


Figure 2.15 AFM images of SA1270 particle monolayers.

(a) TCPS



(b) PMMA standard

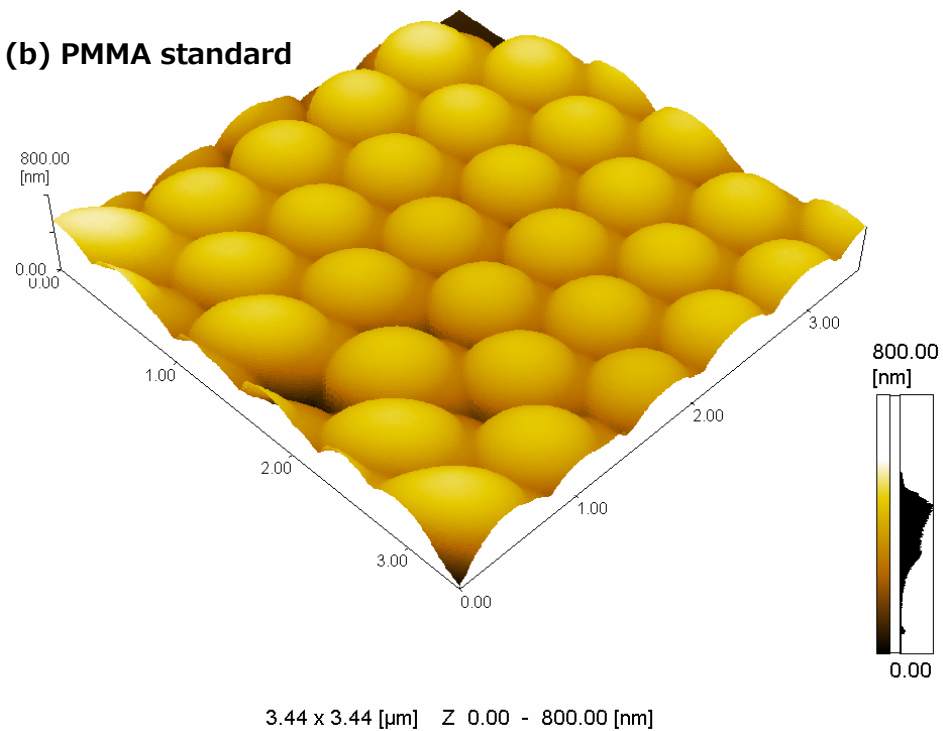


Figure 2.16 AFM images of TCPS (a) and PMMA standard particles (b).

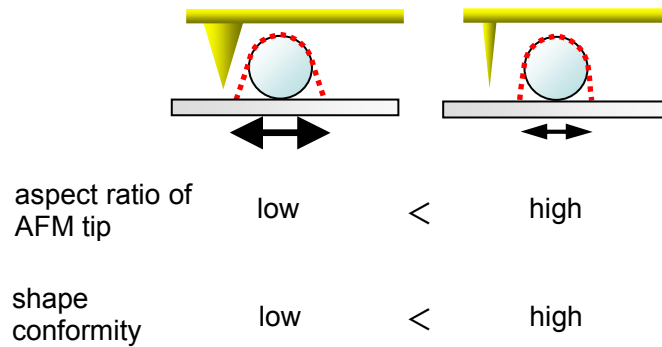


Figure 2.17 Relation between aspect ratio of AFM tip and precision of measurement.

2.2.3.3 静的接触角の測定

ゴニオメーターによって単層粒子膜の静的接触角を測定した。

Table 2.8 より、TCPS と SA 単層粒子膜の接触角は大きく異なり、TCPS は疎水性、SA 粒子膜は親水性であることがわかった。ポリスチレンが疎水性であるのに対し、ポリアクリルアミドは親水性であることが知られている。この差は、SA 粒子表面に提示されている polyAAm の寄与によるところが大きいと考えられる。

また、単層粒子膜の凹凸も接触角に影響を与えていると考えられる。表面の凹凸によって表面積が平滑面の r 倍になったとすると、凹凸面での見かけの水接触角 θ' と平滑面での真の水接触角 θ の間には次のような関係がある。

$$r \times \cos \theta = \cos \theta' \tag{2.11}$$

これを Wenzel の式という。この式から θ が 90° 以上のときは $\theta < \theta'$ 、 θ が 90° 以下のときは $\theta > \theta'$ となる。このことは接触角が 90° 以下である平滑な PS dish より、凹凸のある単層粒子膜の方が接触角が小さくなったという結果と一致する。

接触角は細胞の付着に対して重要な特性であることが報告されている⁴⁰⁾。したがって作製した単層粒子膜の接触角が異なることは、実験上好ましくない。

上記の Wenzel の式では凹凸面と平滑面の接触角の関係を示したが、この式では凹凸面での凹部に残る空気層を考慮していない。この凹部に残る空気層のことを考慮しているのが以下に示す Cassie の式である。

$$\cos \theta' = Q_1 \cos \theta_1 + Q_2 \cos \theta_2 \tag{2.12}$$

- θ' : 見かけの接触角
- Q_1, Q_2 : 成分 1, 2 が表面を占める割合
- θ_1, θ_2 : 成分 1, 2 の真の接触角

Table 2.8 Contact angles of TCPS and particle monolayers.

| code | contact angle θ / degree |
|--------|---------------------------------|
| TCPS | 75.1±1.3 |
| SA489 | 26.5±1.8 |
| SA527 | 26.4±1.5 |
| SA692 | 27.7±1.4 |
| SA1270 | 30.0±1.1 |

ここで成分 2 は空気では θ_2 は 180° である。したがって疎水性表面における粗面の凹部により多くの空気が残っている場合（すなわちより凹部が大きい場合）、接触角がより高い値になることを示している。凹部は粒子が大きくなるほど大きくなる。Table 2.9 で SA527 粒子膜よりも SA1270 粒子膜の方が接触角が大きくなっていると考えられる。

2.2.4 細胞について

ヒトは約 60 兆個、200 種類以上の細胞から構成されている。細胞には多様性があり、例えば脳には神経細胞やグリア細胞、肝臓には肝細胞、膵臓には膵細胞というように各組織には特異的な細胞が存在している。しかしこれらの細胞はもともと 1 個の受精卵である。受精卵は卵割を繰り返し、胞胚期を経て原腸形成、胚葉の分化、形態形成という順に発達し、多様な組織が形成される。近年、再生医療分野において注目されている胚性幹細胞（ES 細胞）は受精後 1 週間経過した胚盤胞の内部細胞塊から得られる。この ES 細胞は理論上全ての細胞へと分化することが可能である（全能性）ため、組織や臓器の再生へ向けた研究が世界中で活発に進められている。また、成体においても組織ごとに幹細胞が存在することが明らかとなった。これらは体性幹細胞と呼ばれ、もともとの組織以外の細胞にも分化できる（可塑性）ことが確認されている。

さて、本研究で用いた細胞はヒト臍帯静脈血管内皮細胞と呼ばれる正常細胞である（臍帯とは胎児に酸素と栄養を運搬するために母体の胎盤から胎児の臍部をつないでいる組織である。2 本の静脈と 1 本の動脈から構成されている。近年、出産時に臍帯内に残った臍帯血中の造血幹細胞が骨髄と同程度含まれていることから白血病の治療に利用されている）。以下の節において詳説するが、内皮細胞は血管内壁に存在し、周囲の細胞組織との物質交換、血液凝固作用、炎症作用、血管の収縮を制御する役割を有する。

<血管の構造と血管内皮細胞について>

ほぼ全ての組織は血液による栄養分や酸素、老廃物の運搬を必要としている。そのため血管は全身に発達している。血管には大きく分けて動脈、静脈、毛細血管があり、それぞれ異なる構造を有しているが、いずれの場合も内皮細胞が内壁を被覆し、血液と周囲の組織間の物質交換を調節しているという点では共通している。血管は基底膜と呼ばれる足場に接着し、その外周には平滑筋細胞、さらにその外周には周皮細胞（pericyte）といった細胞が階層構造を形成している（Figure 2.18b）。動脈は静脈よりも平滑筋の層が厚く、弾性繊維であるエラスチンが豊富であるため弾力性がある。また毛細血管は内皮細胞、基底膜、周皮細胞から構成され、より簡単な構造である（Figure 2.18a）。基底膜は厚さ 50~100 nm で、内皮細胞から分泌された細胞外マトリックス（IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ナイドゲン）で構成される。

生体における血管の構築には発生段階における脈管形成、そして既存の血管から新たに血管が発達する血管新生の 2 種類がある。脈管形成においては内皮細胞の集合塊が

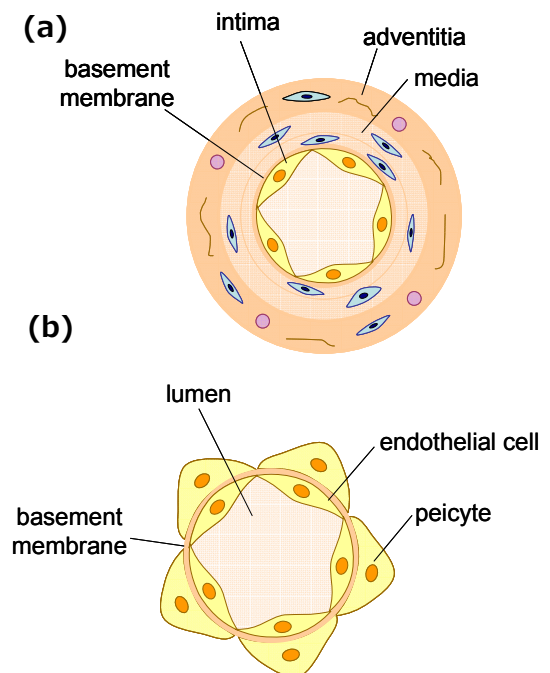


Figure 2.18 Cross-sectional drawings of artery (a) and capillary vessel (b)¹¹⁾.

血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) による刺激を受け、VE-カドヘリン (vascular endothelial cadherin) を主体とする細胞-細胞間結合を形成して Figure 2.18b のような管腔を形成する。微細な毛細血管の管腔形成では、内皮細胞の鎖状構造がそれぞれ小胞を細胞内に産出し、この小胞を融合・伸張させて中心部に配列させることで管腔を形成する場合もある (Figure 2.19) ⁴¹⁾。

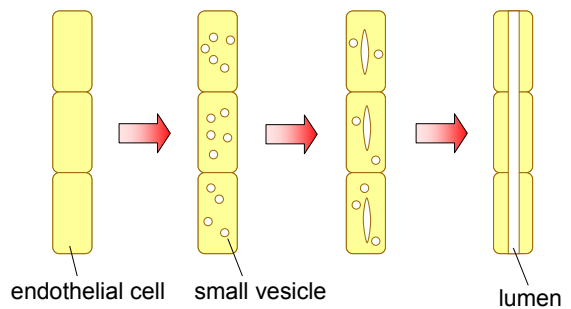


Figure 2.19 Illustration of formation of capillary vessel.

一方、血管新生では既存の血管から内皮細胞が発芽することによって新たな血管の分枝が形成される (Figure 2.20) ⁴²⁾。低酸素状態や炎症刺激によって VEGF が過剰に産生され、また低酸素状態においては低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor, HIF) による直接の転写制御が生じると、内皮細胞の発芽、増殖、そしてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloprotease, MMP) による細胞外マトリックスの分解が活発になり、新たな血管が発達する。この血管新生は腫瘍組織の発達にも重要な役割を果たしているため、癌治療の分野においても活発に研究されている。

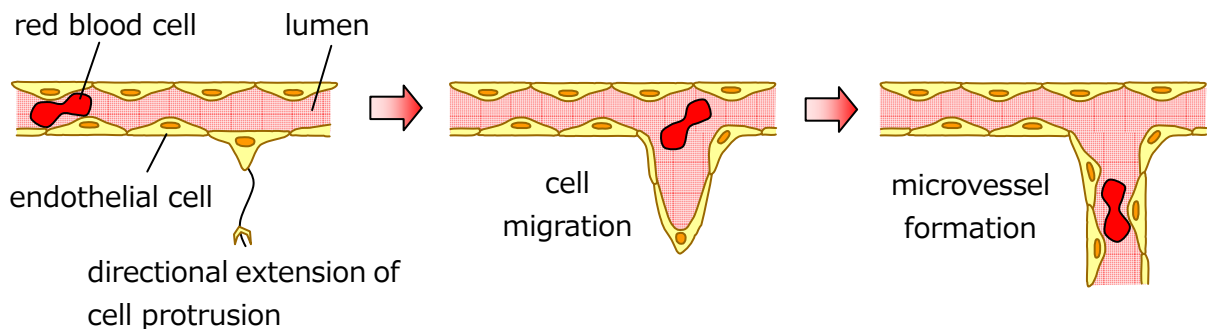


Figure 2.20 Illustration of angiogenesis

<血清について>

細胞培養用のメディウムでは基本培地にウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) や仔ウシ血清 (fetal calf serum, FCS) といった動物由来の血清を添加している場合がほとんどである (基本培地は塩類、アミノ酸、糖、ビタミン及びその他の微量必須栄養素を混合した等浸透圧性 pH 平衡溶液である。このような基本培地は完全ではなく、補助試薬の添加が必要となる。補助試薬を添加しない場合、培養細胞を短期間生存させることはできるが、増殖を維持することはできない)。血清とは血液を凝固させ血小板や凝固因子を除いたものを指し、タンパク質、電解質、非タンパク質性含窒物、脂質、炭水化物、接着因子、ホルモン、結合タンパク質および担体タンパク質、酵素、阻害物質、およびその他の多種多様な未知の成分など 1,000 種類を超える様々な成分を含んでいる。しかし補助試薬としての利用を考えた場合、血清成分には未知の因子も多く、また血清のロット間の個体差もある。

<成長因子と細胞増殖について>

細胞の増殖には水溶性成長因子が大きな役割を担っている。成長因子は生体内において血液中や ECM 中に含まれている。また組織が損傷した際には周囲の細胞から成長因子が産生される。成長因子は細胞膜表面の成長因子レセプターに結合することによって細胞内シグナル伝達を誘導し、細胞周期の進行、細胞の増殖が起こる。細胞増殖が進行することでメディウム中の成長因子は消費されていき、不足する

と細胞の増殖は一時的に停止する。このとき新鮮なメディウムに交換すると細胞は再び増殖を開始するが、成長因子の存在しない状態が長時間続いた場合には細胞はアポトーシスを起こして死んでしまう。また正常細胞の場合には培養容器に隙間がなくなると増殖を停止する。これは細胞の接触阻害 (contact inhibition) と呼ばれている。血管壁を被覆している血管内皮細胞は通常この接触阻害により細胞周期は停止状態 (G0 期) である。組織の損傷や低酸素状態になると周囲から血管新生因子が産生され、血管新生を起こす。

2.2.5 細胞接着について

細胞は足場や隣接する細胞と接着することによってその形態や分化形質を維持している。細胞接着機構には種々の細胞骨格系のタンパクおよびシグナル伝達系のタンパクの結合部位が存在し、細胞接着は細胞骨格の形成とシグナル伝達の誘導の両面に対して重要な役割を持っている。また細胞骨格とシグナル伝達の間にも密接な関連が存在し、細胞骨格の変形によってシグナル伝達が起こることもわかっている。例えば血管内皮細胞の場合には血流の剪断応力による機械的刺激によって細胞の伸展方向、増殖、移動または細胞死などの機能が制御されており、また引張応力によっても伸展方向の配向 (アクチンストレスファイバーの配向) が起こる⁴⁸⁾。また骨芽細胞の場合も機械的刺激によって増殖および分化が誘導されることが知られている⁴⁹⁾。細胞に応力が加わると細胞膜の変形、そして細胞骨格系 (アクチンフィラメント、中間径フィラメント、微小管) の変形が起こるため、これらの機械的刺激が細胞増殖の機構にも直接ないしは間接的に関係を持っていると考えられている。このように機械的刺激がシグナル伝達のような生化学反応に変換される現象をメカノトランスダクション (mechanotransduction) と呼ぶ。

2.2.5.1 インテグリンを介した細胞接着⁴²⁾

細胞が基板に接着するとき、細胞は基板の全体に接着しているのではなく、限定された領域を介して基板と接着している。このとき細胞は接着斑やヘミデスモソームを形成している。これらの形成には細胞膜上に存在するインテグリンと呼ばれる細胞膜貫通型レセプタータンパクが関わっている (Figure 2.21)。インテグリンは細胞外マトリックスのレセプターとして機能し、細胞接着や増殖のシグナル伝達に関わっている。ここでは接着斑の形成に着目して細胞内シグナル伝達系について述べる。

細胞膜表面に存在するインテグリンは α -サブユニット (18 種類) と β -サブユニット (8 種類) で構成され、現在までに 24 種類のインテグリンが確認されており、それぞれ特異的なリガンドと結合する。インテグリンは Ca^{2+} や Mg^{2+} 、 Mn^{2+} のような二価カチオン存在下で細胞外マトリックス上の接着分子と結合することによって活性化される。活性化されたインテグリン分子同士は細胞表面上でクラスタリングし、接着斑 (focal adhesion) を形成する (Figure 2.22)。インテグリンのクラスタリングに伴い、細胞内タンパク質のリン酸化、細胞内 pH の変化 (pH7.00 から pH7.20 に上昇)、 Ca^{2+} の細胞内流入、接着斑の形成、アクチンフィラメントの配向が起こる⁴⁸⁾。そしてそれらの結果、細胞接着、伸展、移動、分化、増殖が起こる。インテグリンはそのほかにアポトーシスや細胞周期にも関係しており、インテグリンは細胞増殖に対して大きな影響力を持っていることがわかる。

2.2.5.2 カドヘリンを介した細胞接着⁴²⁾

カドヘリンは Ca^{2+} 依存の細胞間接着を仲介する細胞接着分子である。カドヘリンの構造を Figure 2.22 に示す。内皮細胞に見られる VE-カドヘリンもカドヘリン・スーパーファミリーのひとつである。カドヘリンによる接着には接着結合とデスモソームがあり、それぞれアクチンフィラメントと中間径フ

フィラメントと結合する。

カドヘリンはトランス結合することによって細胞間を連結する。またカドヘリンに結合する p120 や α -カテニン、 β -カテニンは細胞骨格であるアクチンフィラメントや中間径フィラメントと結合するだけでなく、シグナル伝達を調整する役割も果たしている。細胞質内の p120 は Rho と結合して Rho を不活性化し、Rac や Cdc42 を活性化することが報告されており、またカドヘリンとカテニンは接触阻害による細胞の増殖抑制に関与しているとされているが、詳細についてはまだ不明である。VE-カドヘリンによる細胞-細胞間接着の形成は、Rho に作用して細胞張力の増大、接着斑形成の促進、および伸展の抑制に作用すると考えられている⁴⁷⁾。Rho、Rac、Cdc42 が細胞接着においてどのような役割を果たしているのかは次節で述べる。

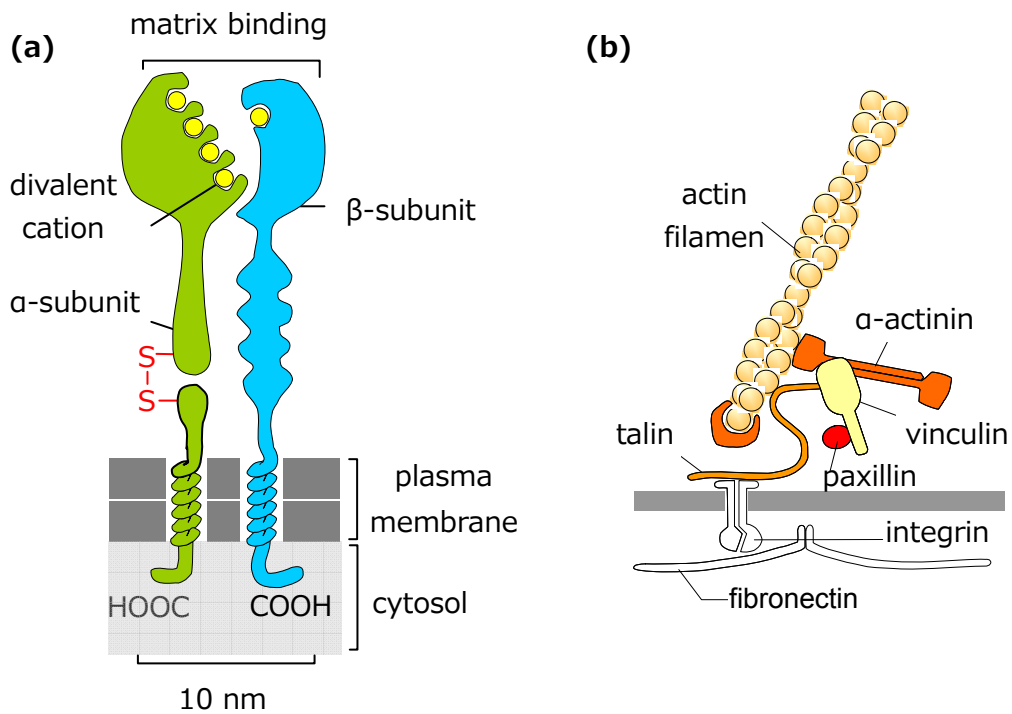


Figure 2.21 Structure of integrin (a) and integrin-mediated cell adhesion (b)⁴²⁾.

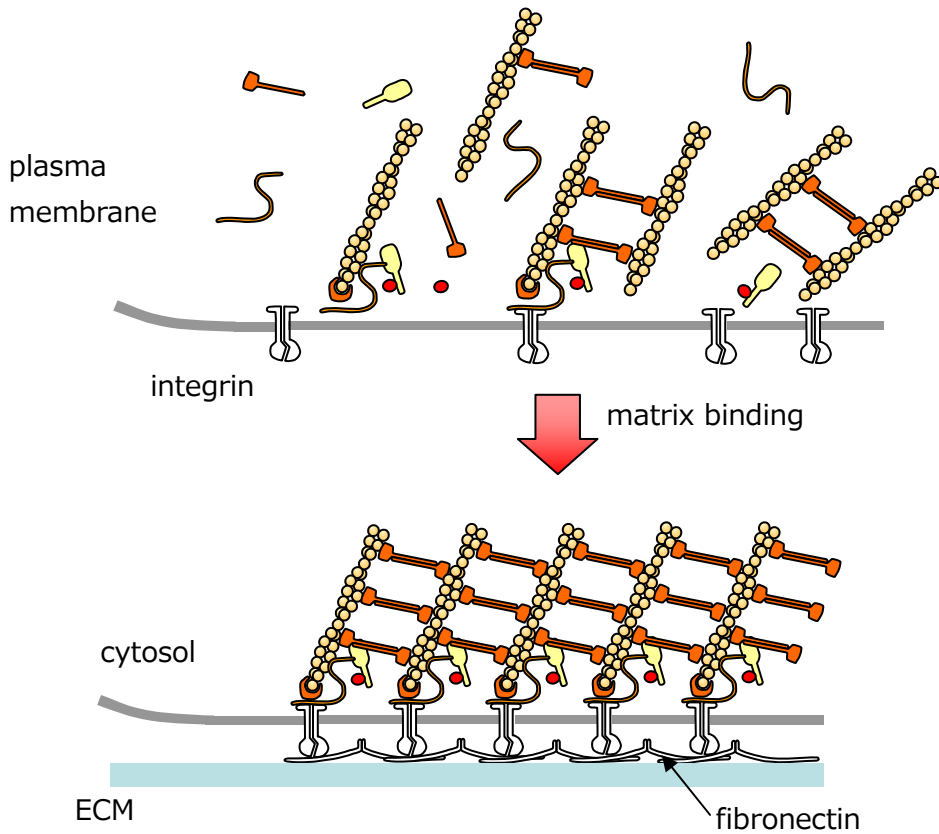


Figure 2.22 Formation of a focal adhesion by clustering of activated integrins³⁶⁾.

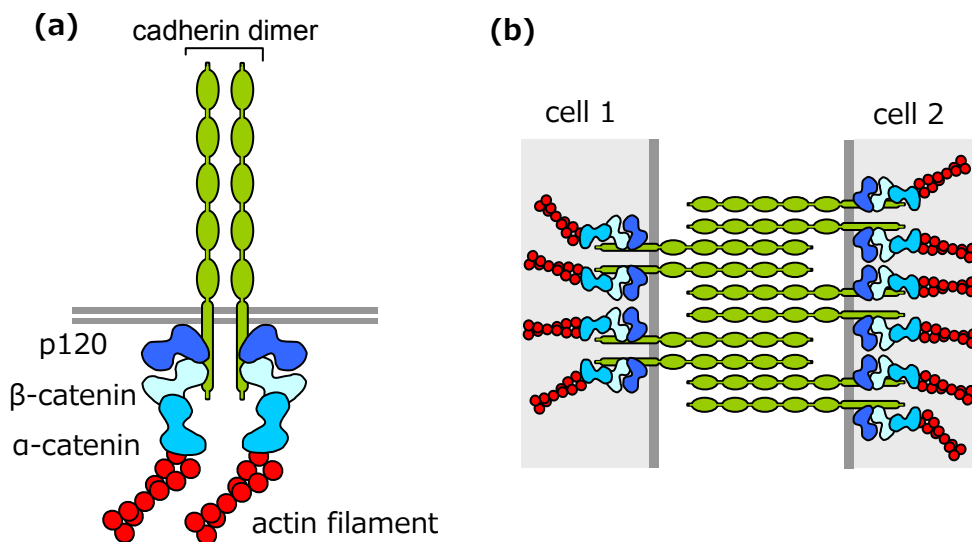


Figure 2.23 Structure of cadherin (a) and cadherin-mediated cell-cell adhesion³⁶⁾.

2.2.5.3 細胞接着と細胞内シグナル伝達^{44,45)}

ここでは細胞接着と関連するシグナル伝達系について説明する。細胞は接着して移動または変形するとき細胞骨格を発達させ、仮足を伸展させる。このとき糸状仮足（フィロポディア）の伸展、葉状仮足（ラメリポディア）の伸展、接着斑やアクチンストレスファイバーの形成が見られるが、これらはそれぞれ Cdc42、Rac、Rho と呼ばれる Rho ファミリーのシグナル伝達物質の活性化によって生じる現象である（Figure 2.24）。

これらのシグナル伝達の上流にはインテグリンやカドヘリンのような細胞接着レセプターや EGF レセプターのような成長因子レセプターが存在し、細胞接着や水溶性成長因子によって細胞移動や細胞骨格の形成が誘導される。例えば細胞移動速度はインテグリンのクラスタリングによる接着斑の形成に伴って減少したり、EGF のような成長因子が存在することによって増加する⁴⁶⁾。また内皮細胞は細胞密度が高い場合には細胞-細胞間接着のシグナル伝達により接着斑を減少させる⁴⁸⁾。また Rho、Rac、Cdc42 の間にはお互いに関連があると考えられている。以下に細胞の移動を例にとって説明する（Figure 2.25）。細胞運動には細胞接着や細胞骨格の再編成が時間的・空間的に制御されることが必要であり、Rho ファミリー G タンパクは重要な役割を果たしている。細胞は移動するとき糸状仮足（filopodia, フィロポディア）を足場に接着させ、そして葉状仮足（lamellipodia, ラメリポディア）を伸展させる。これはそれぞれ Cdc42 と Rac の活性化を伴う。伸展後は Rho の活性化に伴い細胞の移動が起こり、細胞の後端は Rac や Cdc42 の活性化に伴って接着斑が崩壊することによって退縮する。この一連の流れを繰り返して細胞は移動する⁴⁸⁾。本研究においても細胞の仮足の伸展を観察することによって、細胞の接着メカニズムの検討を行っている。

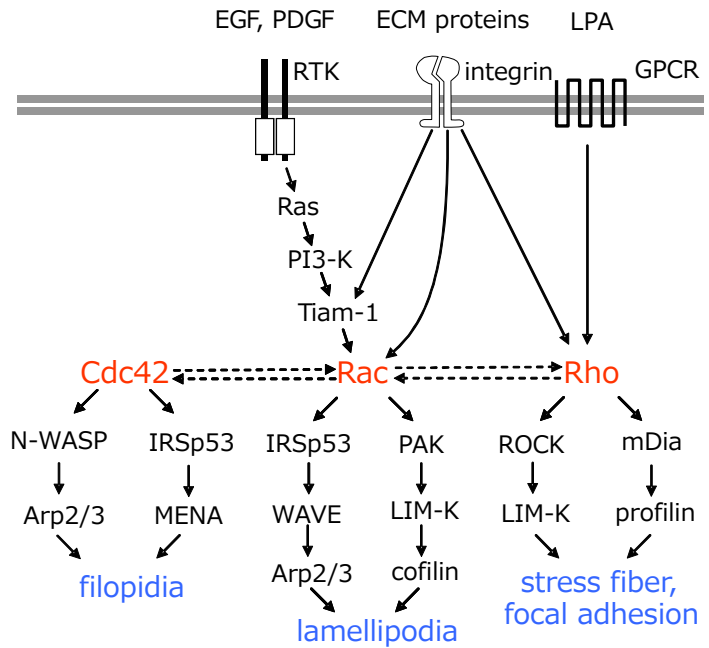


Figure 2.24 Intracellular signaling pathways related to cell adhesion.

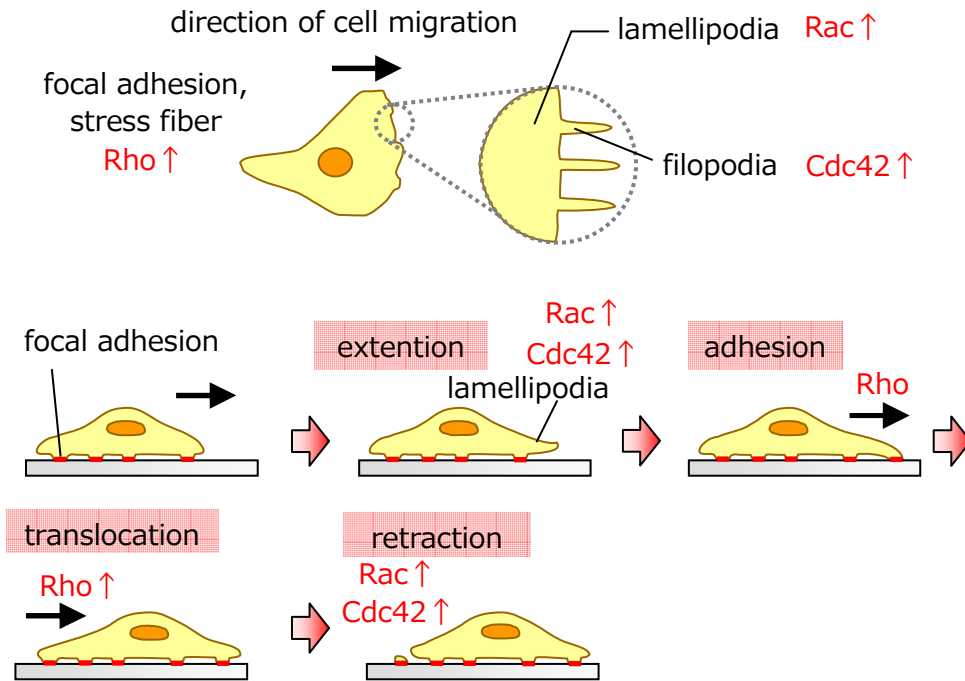


Figure 2.25 Relationship between cell migration and intracellular signaling.

2.2.5.4 フィブロネクチン (FN) について⁴²⁾

本研究では細胞の接着を促進させるために細胞接着性タンパクであるウシ血漿フィブロネクチン (bovine plasma fibronectin, FN) を利用している。FN はジスルフィド結合を介した2本のサブユニット (サブユニットの分子量: 220~250 kDa) の二量体として存在する。ECM タンパク質の1種であり、細胞を足場に接着させる役割を有している。細胞外マトリックスとは細胞と細胞の間もしくは細胞の直下に存在しており、コラーゲンやエラスチンといった構造タンパク質、種々のプロテオグリカン、そしてフィブロネクチンやラミニンといった細胞接着性タンパクが含まれる。ECM は機械的強度の保持、水分や成長因子の保持、細胞との接着といった役割を持っている。フィブロネクチンは Figure 2.26 に示したように、コラーゲンやヘパリン、フィブリンなどと相互作用する部位を持ち、さらに RGD (Arg-Gly-Asp) 配列や PHSRN (Pro-His-Ser-Arg-Asn) 配列といった細胞接着部位を有している。インテグリンはこれらのアミノ酸配列を認識して結合する。フィブロネクチンは濃度依存的に細胞の接着を促進させることができるが、高濃度のフィブロネクチンは逆に細胞の伸展を抑制してしまうことが知られている³⁷⁾。

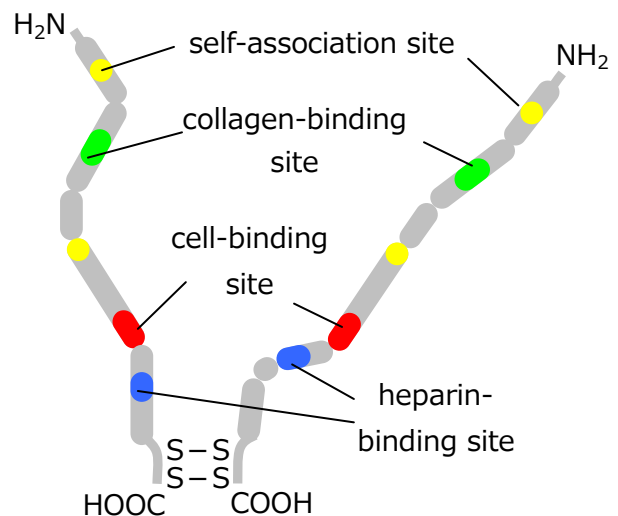


Figure 2.26 The structure of fibronectin.

2.2.5.5 ウシ血清アルブミン (BSA) について⁴⁰⁾

本研究では細胞の接着をブロックするためにウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)

を用いている。アルブミンは肝臓で合成される分子量 66kDa の球状タンパクである。血中に最も多く含まれる (50~65%、40~50 mg/mL) タンパクとして有名で、その役割は浸透圧の調整、物質の保持・運搬 (疎水性の物質に対して吸着して水溶性に変化させ、血中循環を可能にする)、pH 緩衝作用、各組織へのアミノ酸・脂肪酸の供給である。比較的豊富に存在するため安価であり、細胞の接着に無関係なタンパク質であることから、他のタンパク質の非特異的吸着を抑制するためのブロッキング剤として利用されることが多い。本実験では基板にアルブミンを吸着させることによってその他の細胞接着性タンパクの吸着を抑制し、細胞の接着を妨げるために利用している。

2.2.6 細胞の接着形態の観察

2.2.6.1 細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm²

2.2.6.1.1 光学顕微鏡および蛍光顕微鏡による観察

<未処理の場合 (Figure 2.27, 2.39) >

TCPS においては細胞がストレスファイバーを形成していることがわかった。一方、SA527 粒子膜および SA1270 粒子膜においては細胞は明確なストレスファイバーの形成は見られなかった。また SA527 粒子膜においては培養 24 時間後に細胞が集合している様子が観察された。したがって粒子膜の凹凸構造が何らかの理由で細胞接着に影響を与えていると考えられる。

このように細胞が基板に接着するのは、細胞培養メディウムに細胞接着性タンパク質が含まれているためである。それらのタンパク質は基板に対して非特異的に吸着し、細胞は細胞接着性タンパク質を認識して結合することによって接着する。またメディウム中には EGF、VEGF、bFGF のような水溶性成長因子が含まれており、それらが細胞膜表面のレセプターと結合することによって細胞の移動や増殖が促進されると考えられる。したがって凹凸構造による細胞接着への影響と、メディウム中の細胞接着性タンパク質や成長因子という要素が細胞の接着形態に影響を与えていると考えられる。

<FN コートした場合 (Figure 2.28, 2.31) >

FN を基板に吸着させると、いずれの基板においても細胞の接着および伸展が促進された。これは 2.2.5.4 で述べたように FN と細胞が接着することによって細胞内シグナル伝達が誘導され、細胞の伸展や移動が促進されるためであると考えられる。細胞外マトリックスタンパク質が細胞の伸展や移動に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。また 24 時間培養後には細胞が増殖していることがわかった。

<BSA コートした場合 (Figure 2.29, 2.32) >

BSA を基板に吸着させると、いずれの基板においても球形の細胞が多く観察された。浮遊している状態の細胞の形態は球形であるため、2.2.5.5 で述べたように BSA によって細胞の接着および伸展が抑制されたと考えられる。メディウム中の細胞接着性タンパク質の吸着が BSA によって抑制されたと考えられる。また 24 時間後の細胞数はあまり変化していなかったことから、細胞の変形・伸展が抑制されたことによって細胞増殖も抑制されたと考えられる。

<タンパク質の吸着について>

材料表面に対するタンパク質の吸着の主な駆動力は静電相互作用と疎水性相互作用である。静電相互作用は可逆的な吸着であるのに対し、疎水性相互作用はタンパク質の変性を伴うため、非可逆的な吸着だと言われている。タンパク質の吸着は必ずしも不変ではなく、溶液中に複数種のタンパク質が存在す

る場合、吸着したタンパク質が別のタンパク質に置き換わる（吸着交換）場合がある。これは一般的に Vroman effect⁵⁰⁾と呼ばれる概念で説明することができる。Vroman effect とは、タンパク質の吸着における分子量の影響を考慮した概念である。タンパク質が吸着する際にはまず低分子量のタンパクから吸着し、その後時間の経過と共に、より熱力学的に安定な、分子量の大きなタンパク質との吸着交換が起こるようになる。最終的には分子量の大きなタンパク質が安定に吸着する。

またタンパク質の吸着に対しては材料表面の濡れ性が大きな影響を与えることが知られており、細胞が接着しやすい接触角は約 70°と言われている³⁴⁾。今回実験に使用した TCPS は約 75°、SA 粒子膜は 20~30°であったことを考慮すると、TCPS の方がよりタンパク質を吸着しやすい材料であると考えられる。

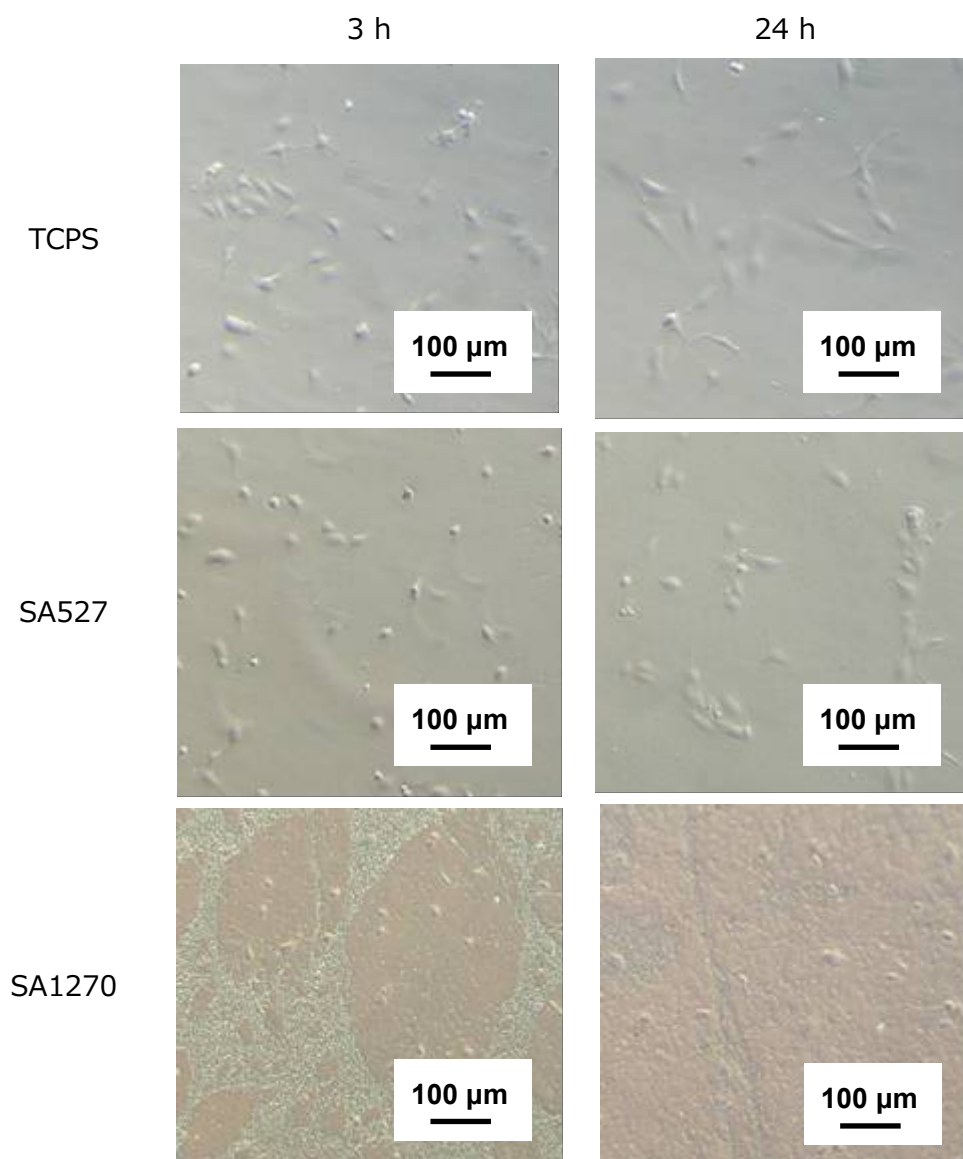


Figure 2.27 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto non-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm².

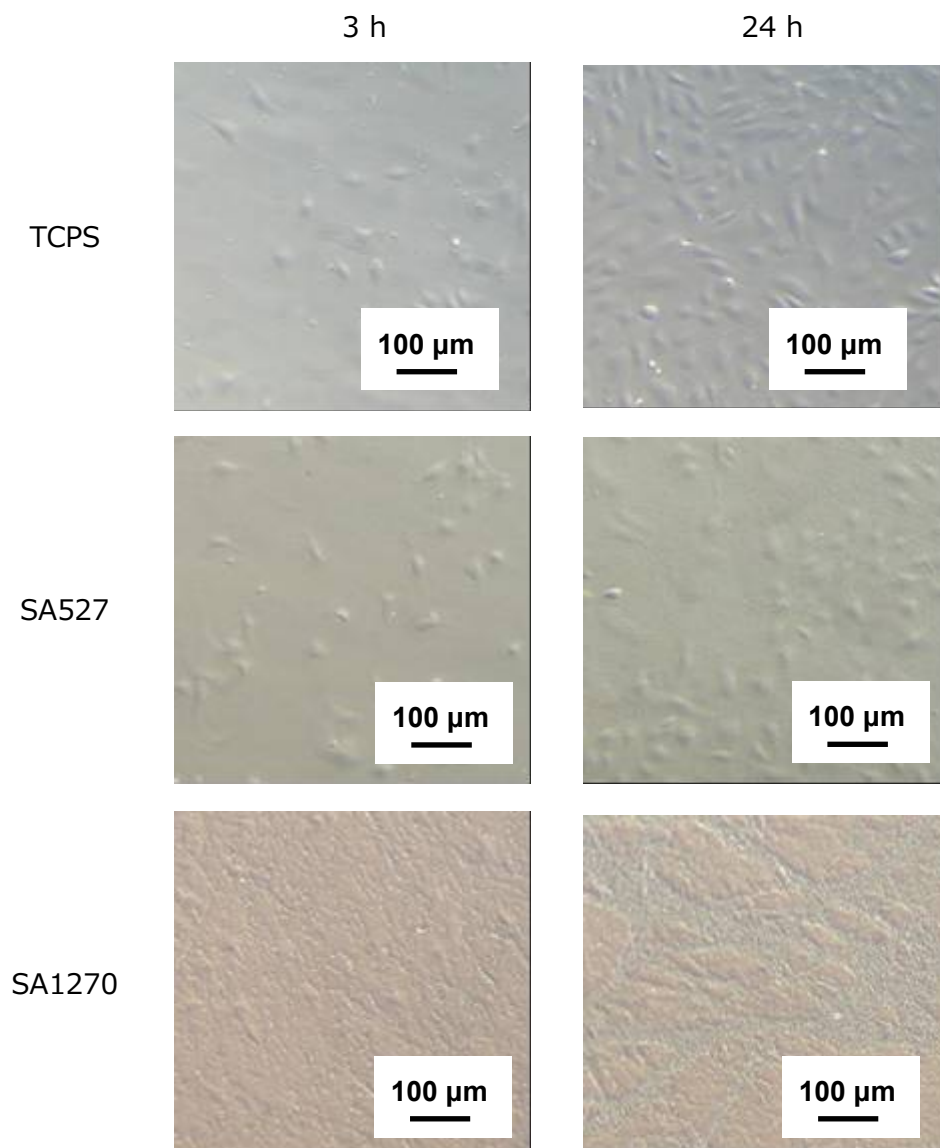


Figure 2.28 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto FN-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm².

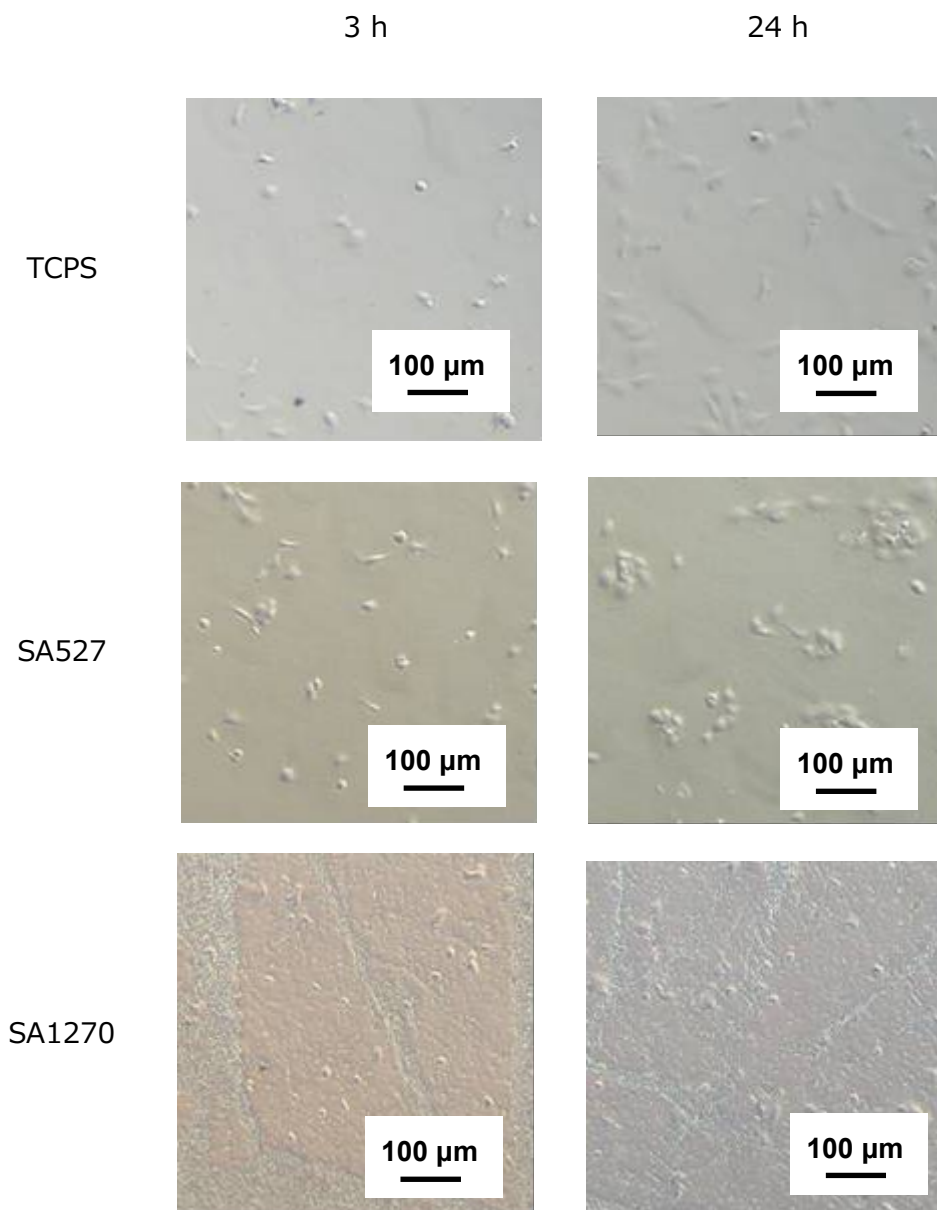


Figure 2.29 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto BSA-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm².

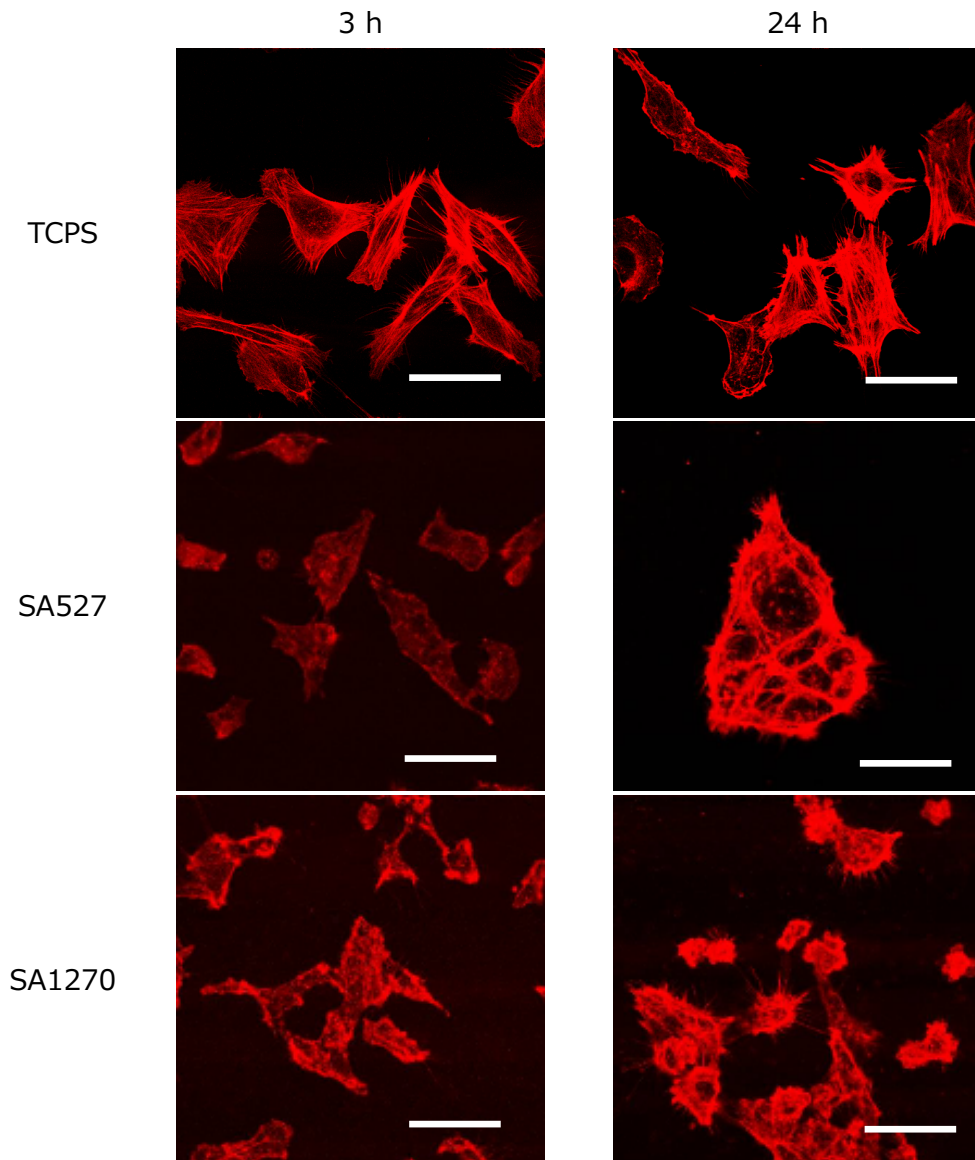


Figure 2.30 Confocal microscopic images of actin cytoskeletons of HUVECs adhering onto non-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm². Scale bars indicate 50 μm.

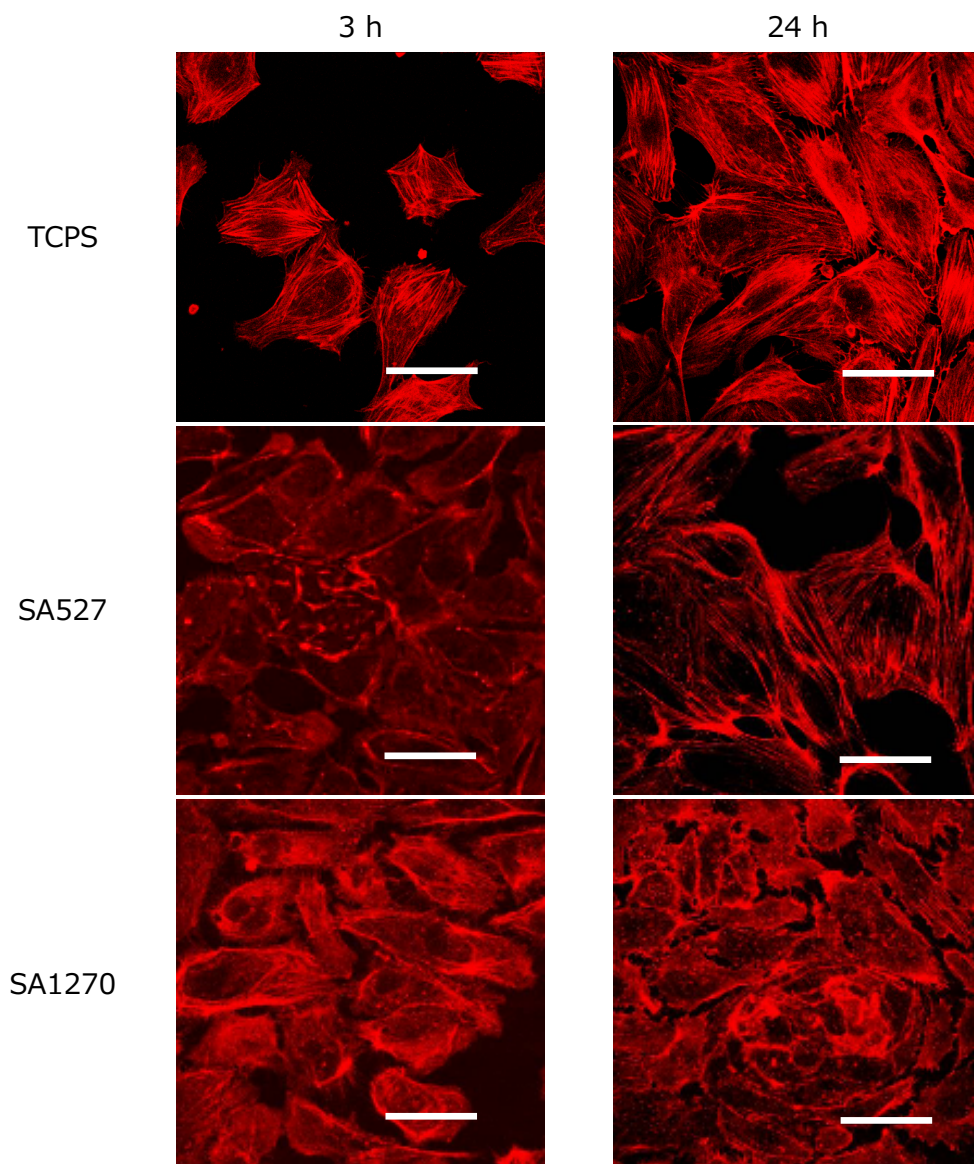


Figure 2.31 Confocal microscopic images of actin cytoskeletons of HUVECs adhering onto FN-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm². Scale bars indicate 50 μ m.

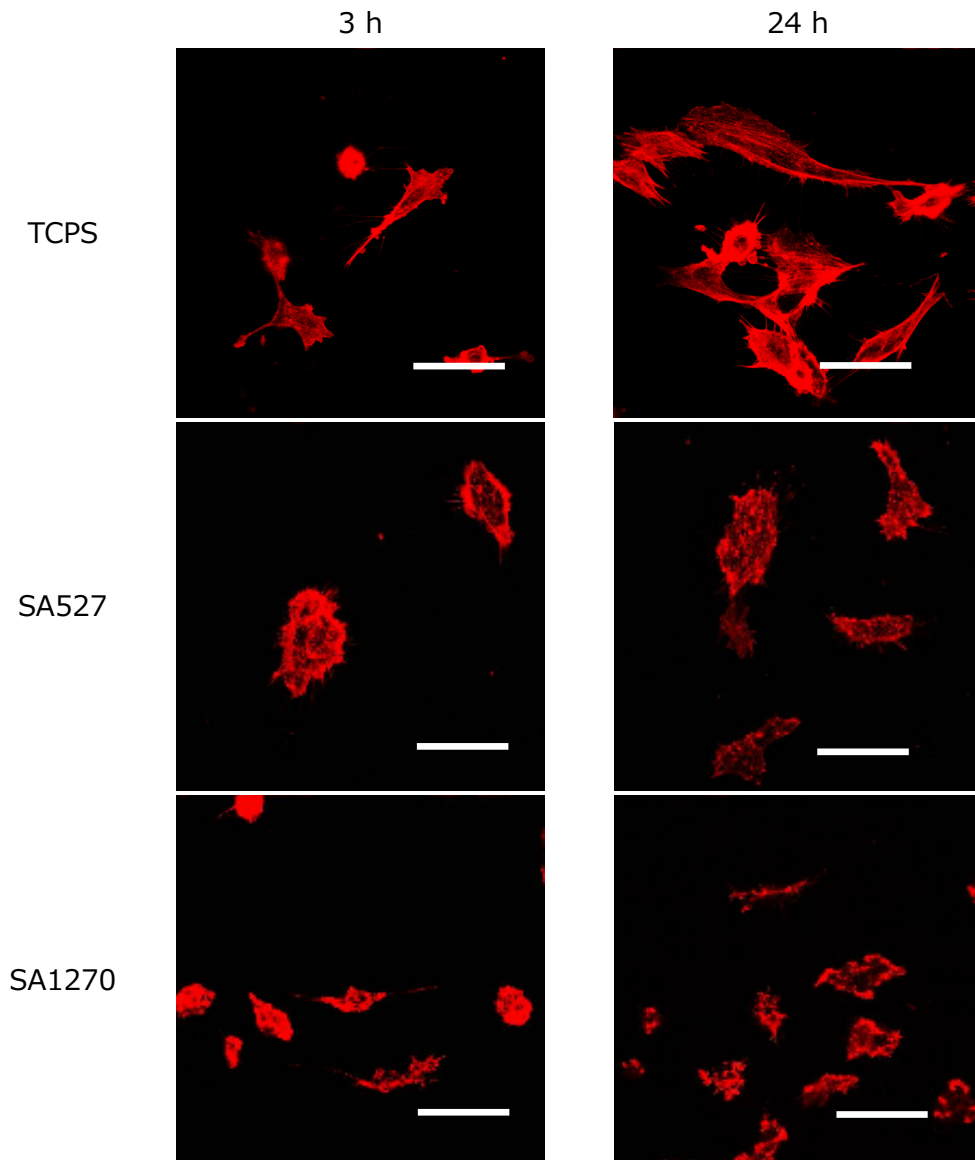


Figure 2.32 Confocal microscopic images of actin cytoskeletons of HUVECs adhering onto BSA-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm². Scale bars indicate 50 μ m.

2.2.6.1.2 FE-SEM による観察

細胞が基板に対してどのように接着しているかを調べるために、FE-SEM によって細胞の接着形態および細胞が基板上に伸展させる糸状仮足（フィロポディア）の観察を行った。

<未処理の場合>

・培養 3 時間後 (Figure 2.33)

TCPS において細胞はフィロポディアを活発に伸展させている様子が観察されたが、SA527 粒子膜上ではフィロポディアは粒子の頂点部分のみに接着していることがわかった。したがって SA527 粒子膜上の細胞は接着可能な領域が粒子の頂点部分に制限されており、フラットな基板よりも細胞が伸展しにくいと考えられる。また SA1270 粒子膜の場合、細胞のフィロポディアは SA527 粒子膜と同様に粒子の頂点部分に対して接着しているように見えたが、粒子膜の裏側を観察すると細胞は粒子膜の裏側まで仮足を伸展させている様子が観察された。この現象は SA527 粒子膜においてはほとんど観察されなかった (figure not shown) ことから、粒子膜の凹凸構造のサイズ（ピッチ）が細胞接着に影響を与えていると予想される。

SA1270 粒子膜においてフィロポディアが粒子膜の裏側まで伸展する理由は 3 つ考えられる。すなわち細胞のフィロポディアの大きさに対して①粒子間の間隙が大きいこと、②粒子の頂点間距離が長いこと、③粒子の曲率が小さいことである。粒子間の間隙が大きければとフィロポディアがその間隙に伸展する確率は高くなるであろう。そしてフィロポディアが飛び越えられるギャップは 1 μm 程度と言われているため、頂点間距離もフィロポディアの伸展に影響を与えているはずである。また、粒子の曲率が小さいということはより平面に近いということである。したがって粒子の表面をフィロポディアが伸展して、最終的に粒子膜の裏側に到達したと考えることもできる。

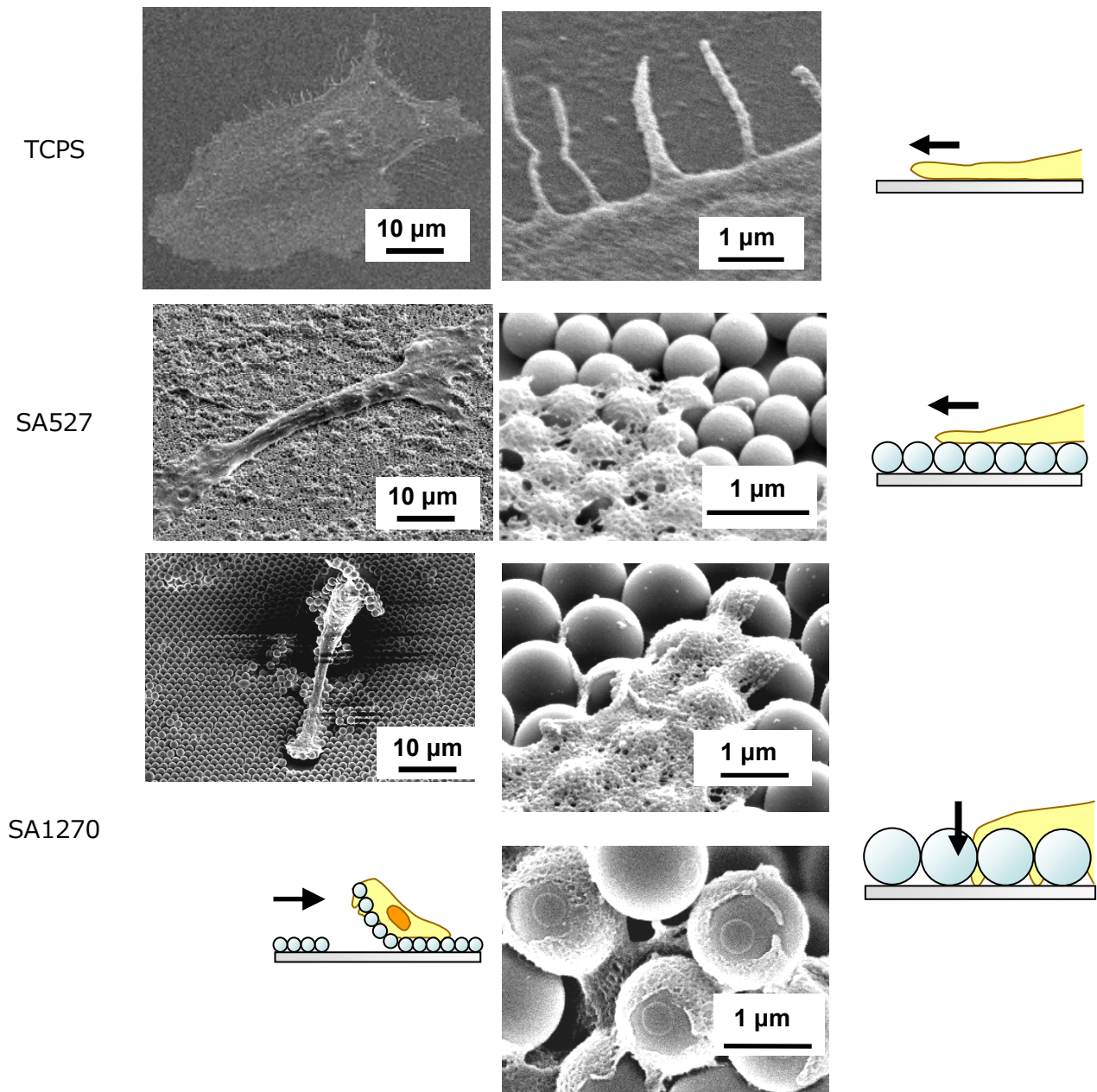


Figure 2.33 FE-SEM views of HUVECs adhering onto the non-coated TCPS and non-coated SA particle monolayers. They were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm² and were cultured for 3 h.

・培養 24 時間培養後 (Figure 2.34)

24 時間後になると、それぞれの基板の差はより明確になった。まず TCPS では細胞が無秩序に接着・伸展・増殖していた。それに対し、SA527 粒子膜においては細胞同士が集合し、ドメインを形成していた。これは細胞の接着面が制限されているために伸展しにくく、細胞同士が接着することによって安定化していると考えられる。結果的に SA527 粒子膜は細胞-細胞間の相互作用を促進させる基板であるということが出来る。一方、SA1270 粒子膜では孤立した細胞がほとんどであった。これは SA1270 粒子膜において細胞の移動や増殖が抑制されていることを示している。一般的に、細胞の変形が小さい場合には細胞の増殖が抑制される。SA1270 粒子膜はフィロポディアの伸展が抑制されるために細胞の変形が抑制され、さらにフィロポディアが粒子を被覆するために細胞の移動や変形が物理的に抑制されてしまうことが低い細胞増殖性の原因であると考えられる。すなわち SA1270 粒子膜は細胞-基板間および細胞-細胞間の相互作用が弱い基板と考えられる。

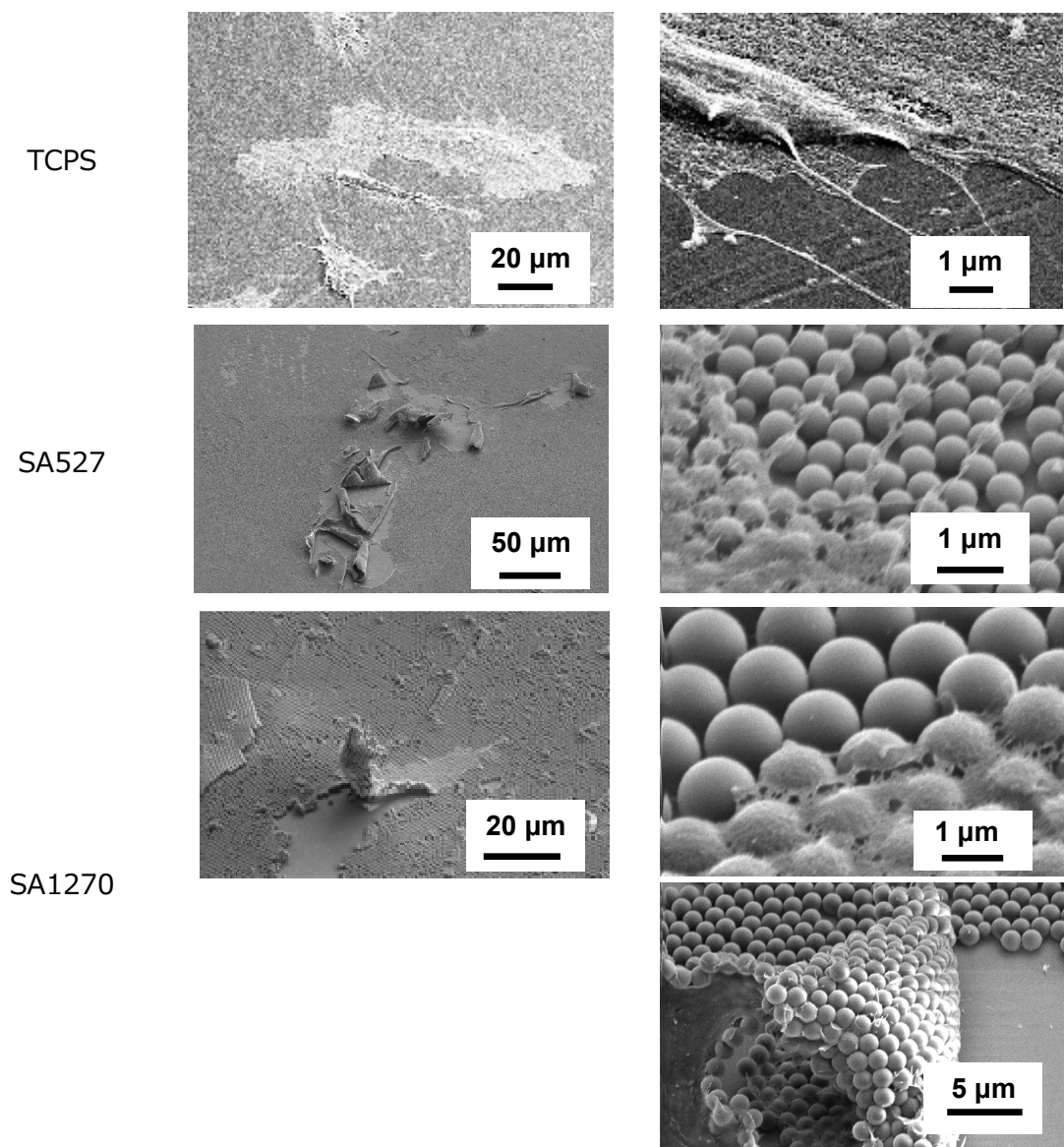


Figure 2.34 FE-SEM views of HUVECs adhering onto the non-coated TCPS and non-coated SA particle monolayers. They were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm² and were cultured for 24 h.

以上の結果を総合すると、以下の仮説が考えられる。まず TCPS は細胞接着性が高く、細胞が伸展しやすい。その反面、細胞同士の相互作用は弱い (Figure 2.35a)。一方、SA527 粒子膜では細胞は TCPS よりも伸展しにくい、細胞-細胞間の相互作用が強く、細胞ドメインを形成する (Figure 2.35b)。SA1270 粒子膜では細胞が伸展しにくく、結果的に細胞が粒子膜の隙間に仮足を伸ばし、基板に対して個々の細胞が強く固定化される。そのため細胞同士の相互作用もほとんど見られず、孤立した細胞が多い (Figure 2.35c)。

この仮説の真偽を検証するため、以降の実験ではタイムラプス観察や免疫染色によって細胞接着および細胞挙動について調べた。

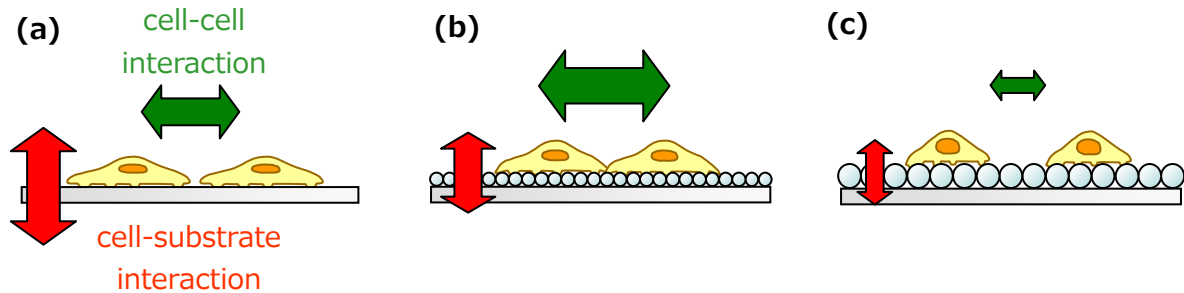


Figure 2.35 Comparison of cell-cell and cell-substrate interactions of cells adhering onto TCPS (a), SA527 (b), and SA1270 (c).

<FN コートした場合>

・培養 3 時間後 (Figure 2.36)

各基板に FN をコートして同様の実験を行ったところ、TCPS では細胞の伸展はほぼ変化しなかった。これはもともと細胞接着性が高いためであろう。ただし TCPS を高濃度の FN 溶液でコートした場合、細胞が強固に接着してしまうために細胞の移動が抑制されるという報告がある⁵¹⁾。一方、粒子膜上の細胞の伸展が促進された。FN の効果が見られた。

そこでフィロポディアを観察したところ、SA527 粒子膜および SA1270 粒子膜上の細胞はフィロポディアを粒子の頂点部分に対して接着させていることがわかった。SA1270 粒子膜においては、粒子膜の裏側にはフィロポディアが観察されなかったこれは FN をコートしたことによってフィロポディアが粒子の表面に強固に接着できるようになり、基板に対して水平に伸展するようになったためであると考えられる。

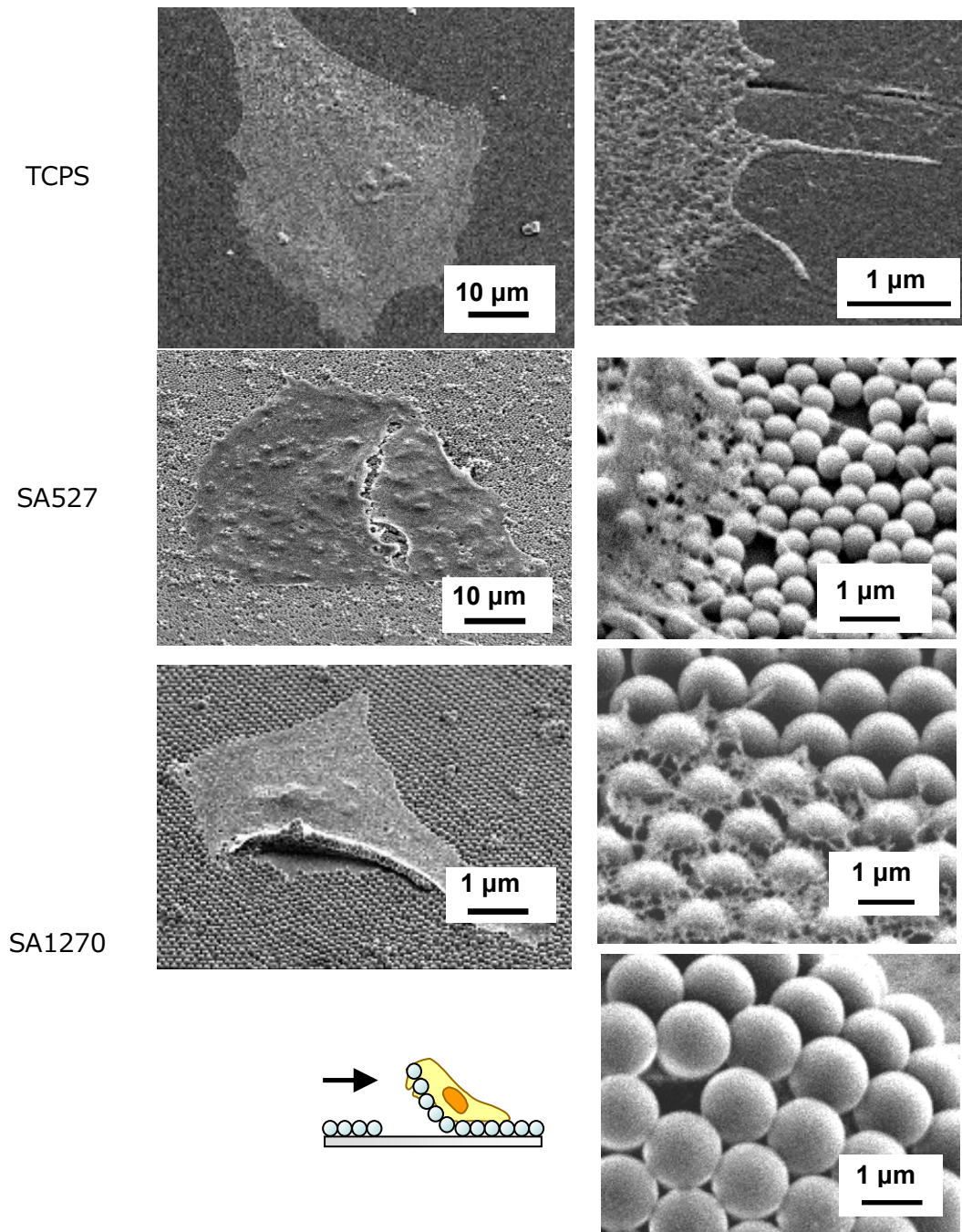


Figure 2.36 FE-SEM views of HUVECs adhering onto the FN-coated TCPS and FN-coated SA particle monolayers. They were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm² and were cultured for 3 h.

・培養 24 時間後 (Figure 2.37)

いずれの基板においても細胞の接着形態は培養 3 時間後とほぼ同じであったが、細胞数は明らかに増加していたことから、細胞の増殖が示唆された。未処理の場合と比較して異なる点は、SA527 粒子膜において細胞がドメインを形成しなかったことである。この結果は、細胞–ECM 間接着と細胞–細胞間接着のバランスが細胞の形態や移動挙動を決定することを示唆している。SA1270 粒子膜においては、3 時間後と同様に、細胞は仮足を粒子膜の内部に伸展させることなく、水平に伸展することがわかった。

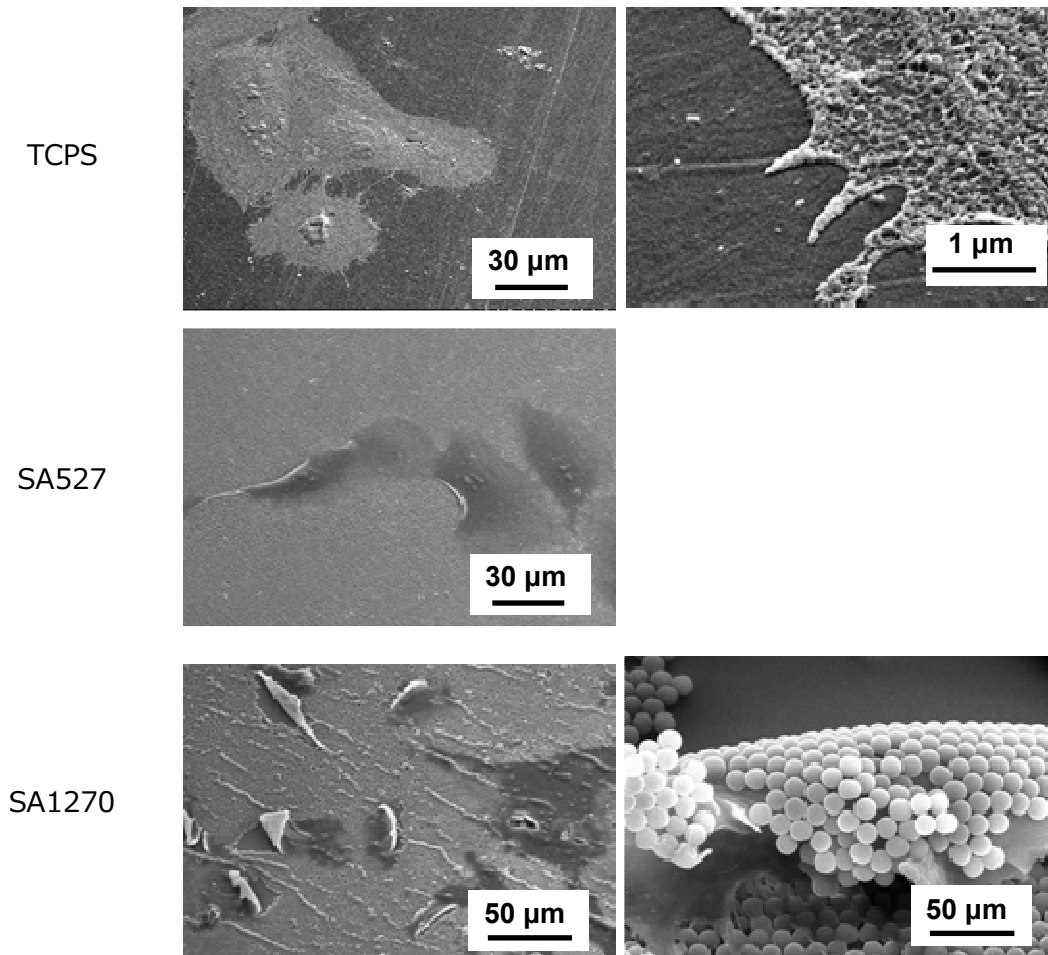


Figure 2.37 FE-SEM views of HUVECs adhering onto the FN-coated TCPS and FN-coated SA particle monolayers. They were seeded with the density of 1.0×10^4 cells/cm² and were cultured for 24 h.

本実験の結果、細胞接着や細胞形態を決定している要因は、基板表面の構造という物理的要因や、基板に吸着したタンパク質の種類や量（そしてそれに付随する細胞内シグナルの発現）という生物化学的要因であることが明らかになった。粒子膜の凹凸構造を利用することによって、細胞–基板間の相互作用の制御が可能であることが示された。さらに細胞–基板間の相互作用が変化することによって細胞–細胞間の相互作用も変化することが示された。以上の結果から単層粒子膜は細胞接着の制御が可能な基板であるということが実証された。

2.2.6.2 細胞播種密度 5.0×10^4 cells/cm²

既に述べた通り、細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm² の場合には SA1270 粒子膜上の細胞の伸展・移動・増殖が抑制されるという結果が得られた。そこで細胞播種密度を高めることが細胞同士の相互作用を高めるのに有効ではないかと考えた。細胞播種密度の重要性は、肝細胞の細胞機能や発現型の維持に播種密度が重要な要素であるという報告⁵²⁾や、間葉系幹細胞の神経細胞への分化が播種密度に依存する⁵³⁾といった報告からも明らかである。本研究における播種密度の重要性を調べるために、まず 5.0×10^4 cells/cm² の場合について実験を行った。

・培養 3 時間後および 24 時間後

<未処理の場合 (Figure 2.38, 2.41, 2.43) >

培養 3 時間後と 24 時間後に観察を行った。細胞播種を高めることによって細胞同士の相互作用がより多く見られるようになった。TCPS では 3 時間後、24 時間後ともに細胞の接着および伸展が見られた。一方、SA527 粒子膜においては 3 時間後では細胞は単独で存在していたが、24 時間後では細胞同士が集合し、ドメインを形成している様子が明確に観察された。したがって SA527 粒子膜上では細胞同士の相互作用が促進されている。また SA1270 粒子膜では、細胞同士の相互作用はあまり観察されず、24 時間後においても細胞の増殖は見られなかった。FE-SEM による観察 (Figure 2.43) では、細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm² のときにも見られたような粒子膜の裏側まで仮足が伸展する現象が 5.0×10^4 cells/cm² のときにも同様に観察された。

<FN コートした場合 (Figure 2.39, 2.42, 2.44) >

FN をコートすると細胞はより広く伸展した。TCPS、SA527 および SA1270 粒子膜のいずれの場合においても細胞は増殖した。これは細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm² の場合と同じである。また未処理の場合に見られたような試料間での細胞形態と細胞挙動に差異は見られなくなった。

<BSA コートした場合 (Figure 2.40) >

TCPS では細胞は播種後すぐには接着せず、接着した後も伸展を抑制していた。一方、SA 粒子膜では BSA をコートしてもほとんどの細胞は接着した。これは粒子膜の凹凸構造が細胞の初期接着に有利に働いているためだと考えられる。

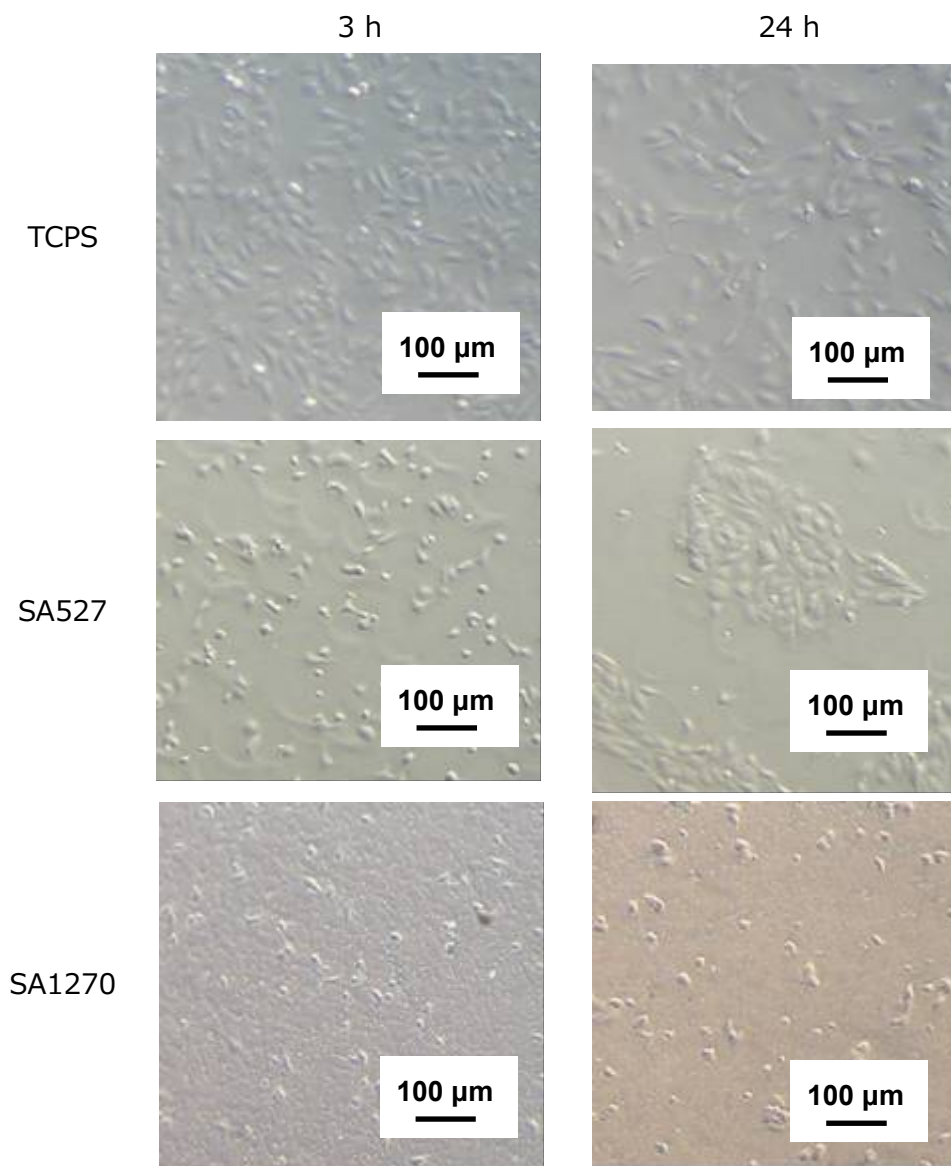


Figure 2.38 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto non-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 5.0×10^4 cells/cm².

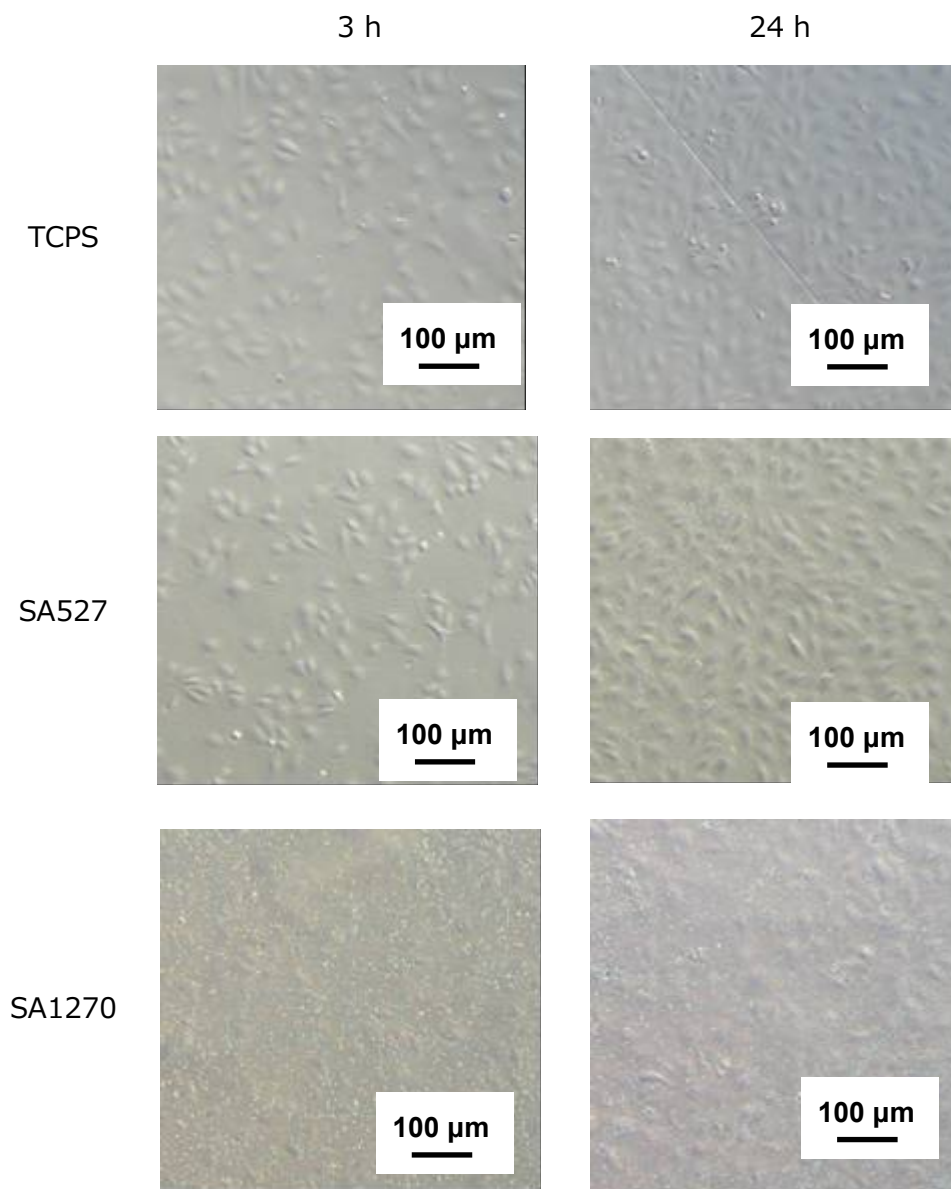


Figure 2.39 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto FN-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 5.0×10^4 cells/cm².

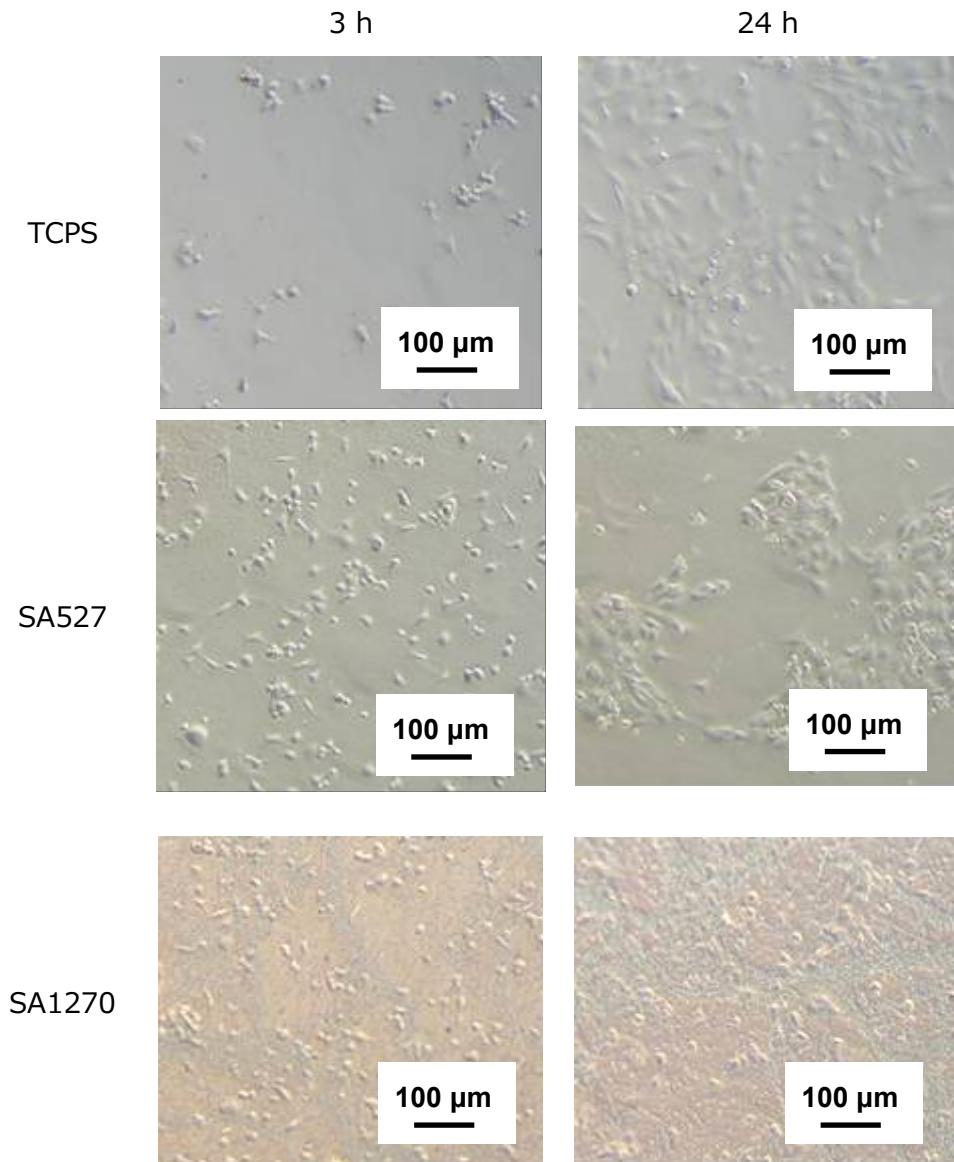


Figure 2.40 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto BSA-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 5.0×10^4 cells/cm²

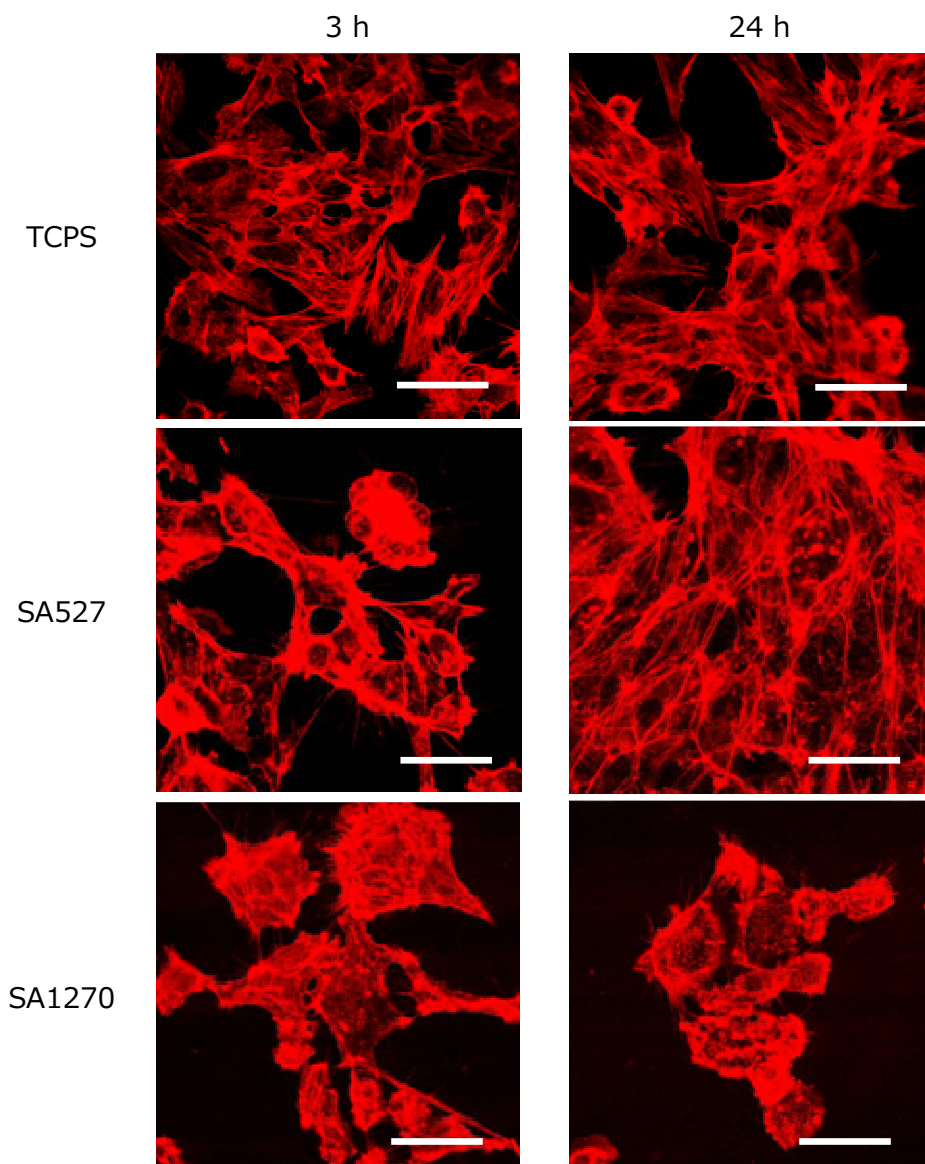


Figure 2.41 Confocal microscopic images of actin cytoskeletons of HUVECs adhering onto a non-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 5.0×10^4 cells/cm². Scale bars indicate 50 μm.

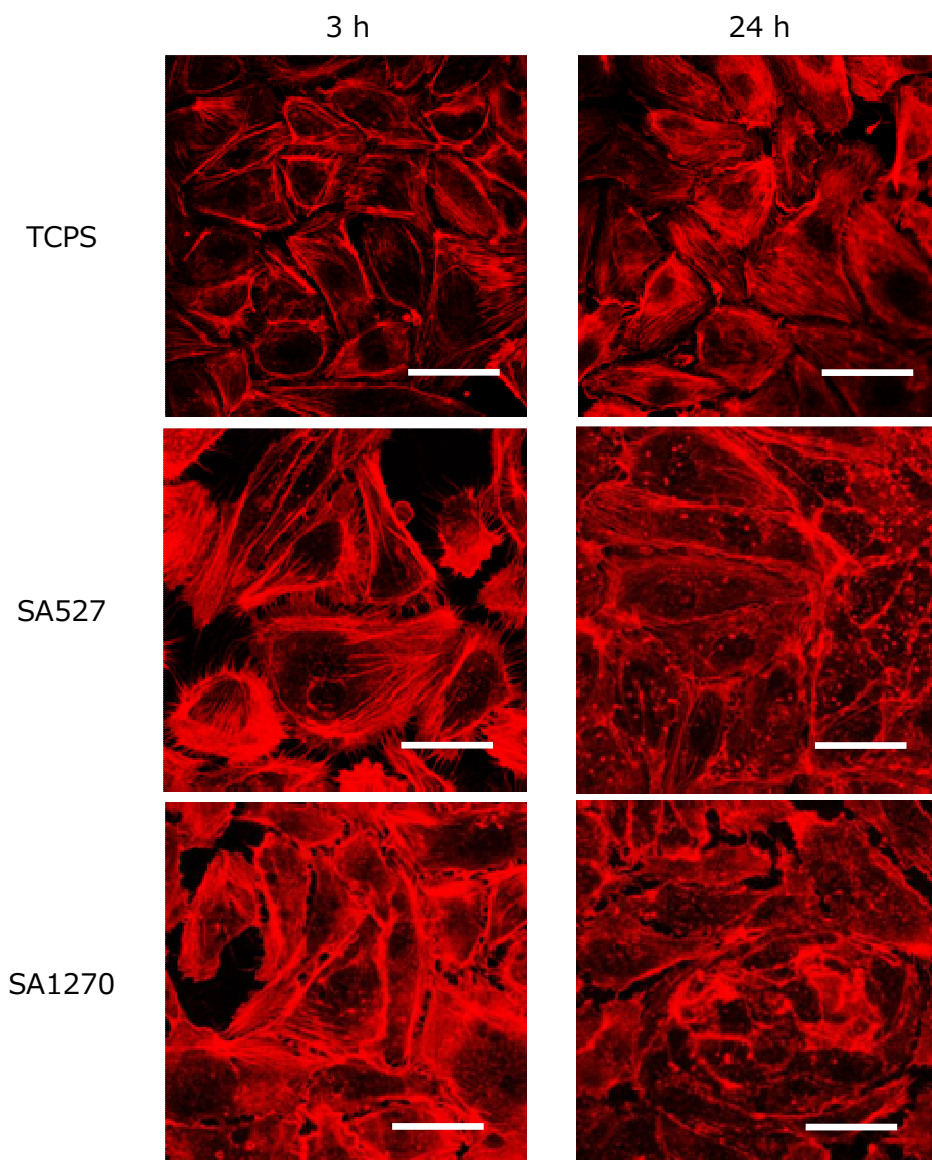


Figure 2.42 Confocal microscopic images of actin cytoskeletons of HUVECs adhering onto FN-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 5.0×10^4 cells/cm². Scale bars indicate 50 μm.

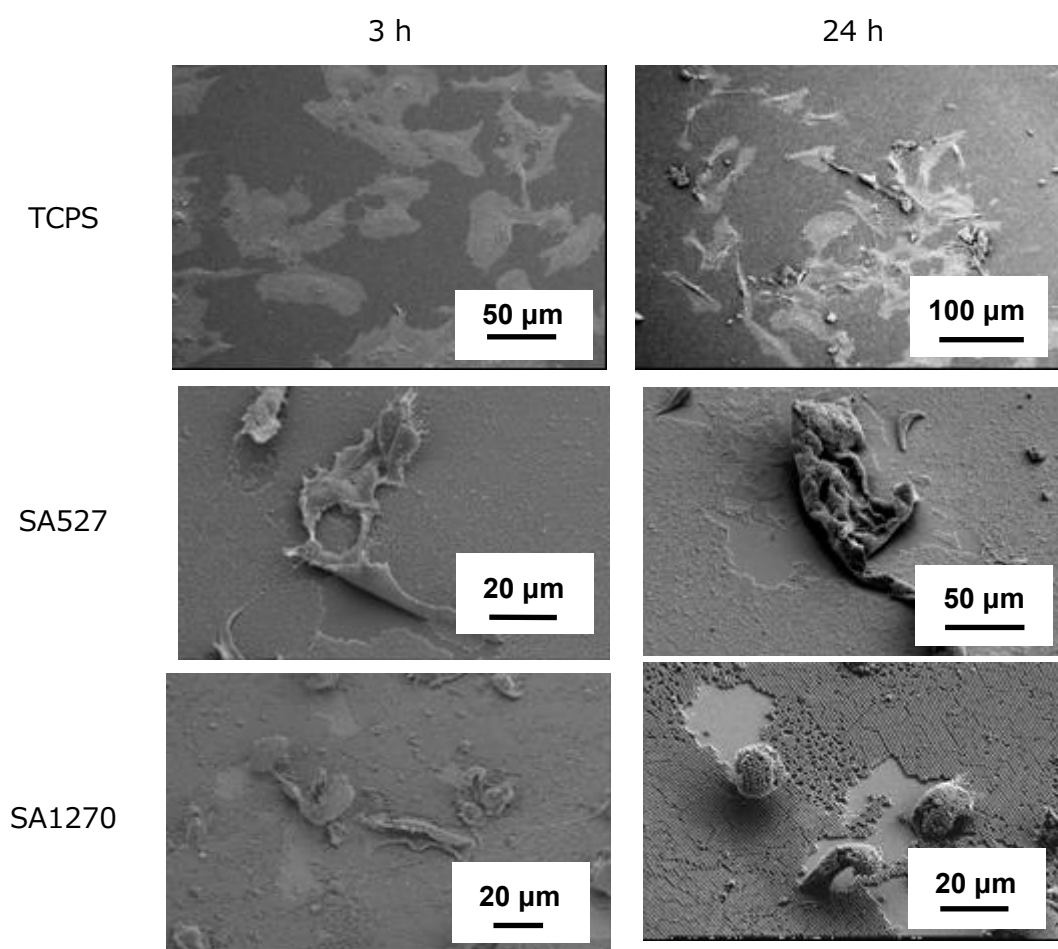


Figure 2.43 FE-SEM images of HUVECs adhering onto the non-coated TCPS and SA particle monolayers. They were seeded with the density of 5.0×10^4 cells/cm².

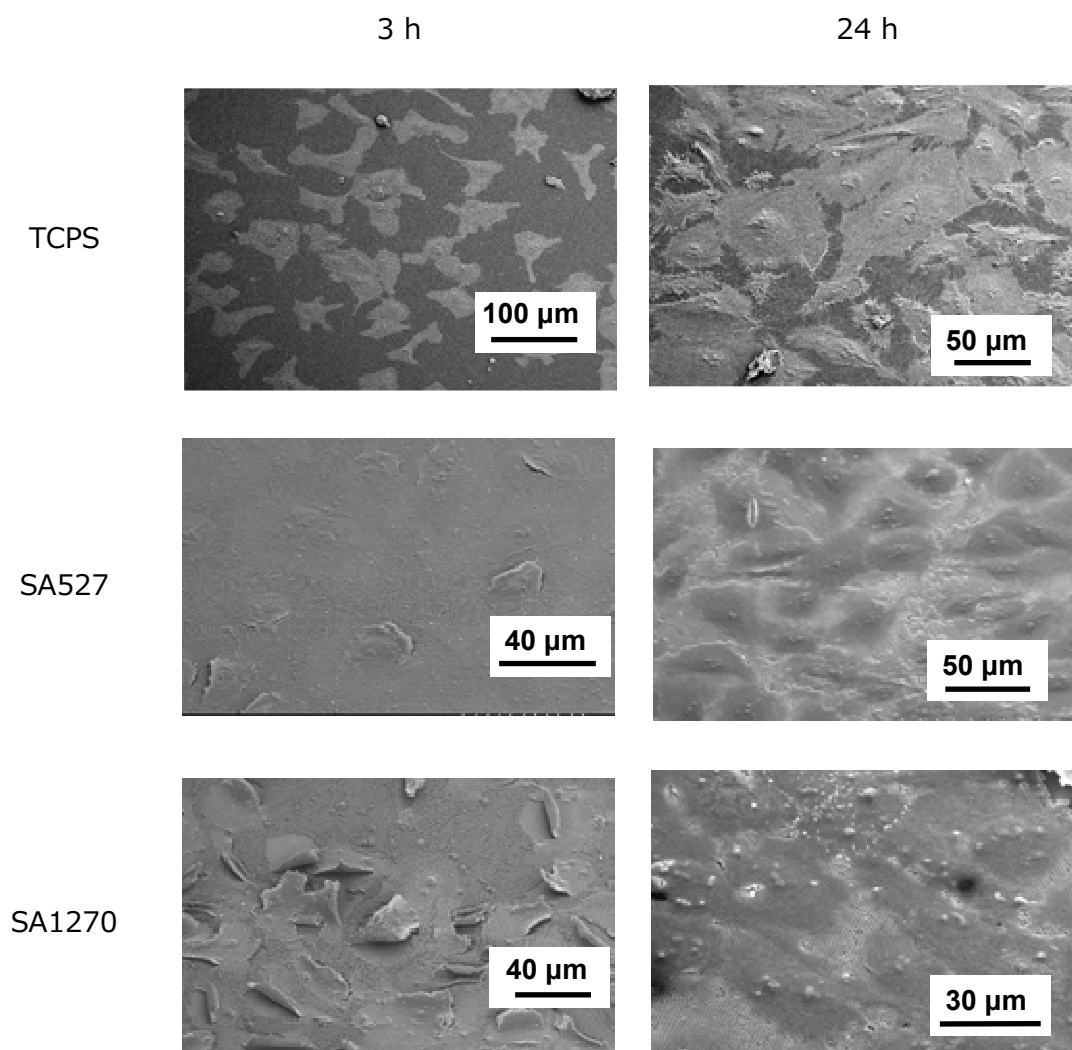


Figure 2.44 FE-SEM views of HUVECs adhering onto the FN-coated TCPS and SA particle monolayers. They were seeded with the density of 5.0×10^4 cells/cm².

2.2.6.3 細胞播種密度 2.0×10^5 cells/cm²

SA1270 粒子膜においては細胞播種密度 5.0×10^4 cells/cm² の場合においても細胞同士の相互作用が弱かったため、さらに播種密度を上げて細胞播種密度 2.0×10^5 cells/cm² の場合についても同様の実験を行った。

・培養 3 時間後および 24 時間後

<未処理の場合 (Figure 2.45, 2.48) >

TCPS および SA527 粒子膜では細胞は播種直後から基板に伸展し、24 時間後において均一な単層の細胞を得ることができた。とりわけ SA527 粒子膜においては培養 24 時間後に細胞の配列化が見られた。したがって SA527 粒子膜上の細胞は TCPS 上の細胞と比較して細胞-細胞間相互作用が促進されているのではないかと考えられる (Figure 2.50a, b)。一方、SA1270 粒子膜においては培養 3 時間後では細胞は基板には接着するが細胞-細胞間相互作用はほとんど見られなかった。しかし培養 24 時間後になると、細胞-細胞間の相互作用が確認できた。したがって播種密度を 2.0×10^5 cells/cm² まで高くすることによって、SA1270 粒子膜においても時間の経過と共に細胞同士が相互作用できるようになったと考えられる (Figure 2.50c)。

<FN コートした場合 (Figure 2.46, 2.49) >

FN をコートすると、いずれの基板においても細胞は一様に接着・伸展し、それぞれの基板の特徴は現れなくなった。

<BSA コートした場合 (Figure 2.47) >

培養 3 時間後において、BSA コートした TCPS 上の細胞は未処理および FN コートした TCPS と比較して明らかに接着しにくくなり、その結果、細胞同士が集合してスフェロイド (spheroid) 状の凝集塊を形成した。しかし細胞播種 24 時間後になると、細胞は基板に接着している様子が観察された。これは Vroman 効果によって、時間の経過と共に TCPS に対して吸着した BSA とメディアウムに含まれるの細胞接着性タンパク質との交換吸着が生じ、細胞が接着可能になったためであると考えられる。しかし細胞は完全なコンフルエントには達しておらず、細胞の存在しない部分も散見された。

一方、SA527 粒子膜上の細胞は、培養 3 時間後において基板に対して均一に接着した。BSA をコーティングした場合にこのような挙動が観察されたことは興味深い。通常 BSA をコーティングすると細胞接着は抑制されるが、SA527 粒子膜においては未処理の場合とほぼ同等の細胞接着性を保持していた。この原因として 2 つのことが考えられる。1 つは SA527 粒子膜が細胞の初期接着性に優れているということである。粒子膜が有する微細な凹凸構造が滑り止めのような役割を果たしている、もしくは凹凸構造とインテグリンとのサイズの対応関係において有利に作用していることが予想される。また、もう 1 つの要因としては、SA527 粒子膜は TCPS と比較して BSA が吸着しにくい、もしくは他の細胞接着性タンパク質との交換吸着が起こりやすいことが考えられる。タンパク質の吸着性を実際に評価するためには、吸着したタンパク質を定量する必要があるだろう。しかし実際のタンパク質の吸着量は微量であるため、定量は非常に困難である。

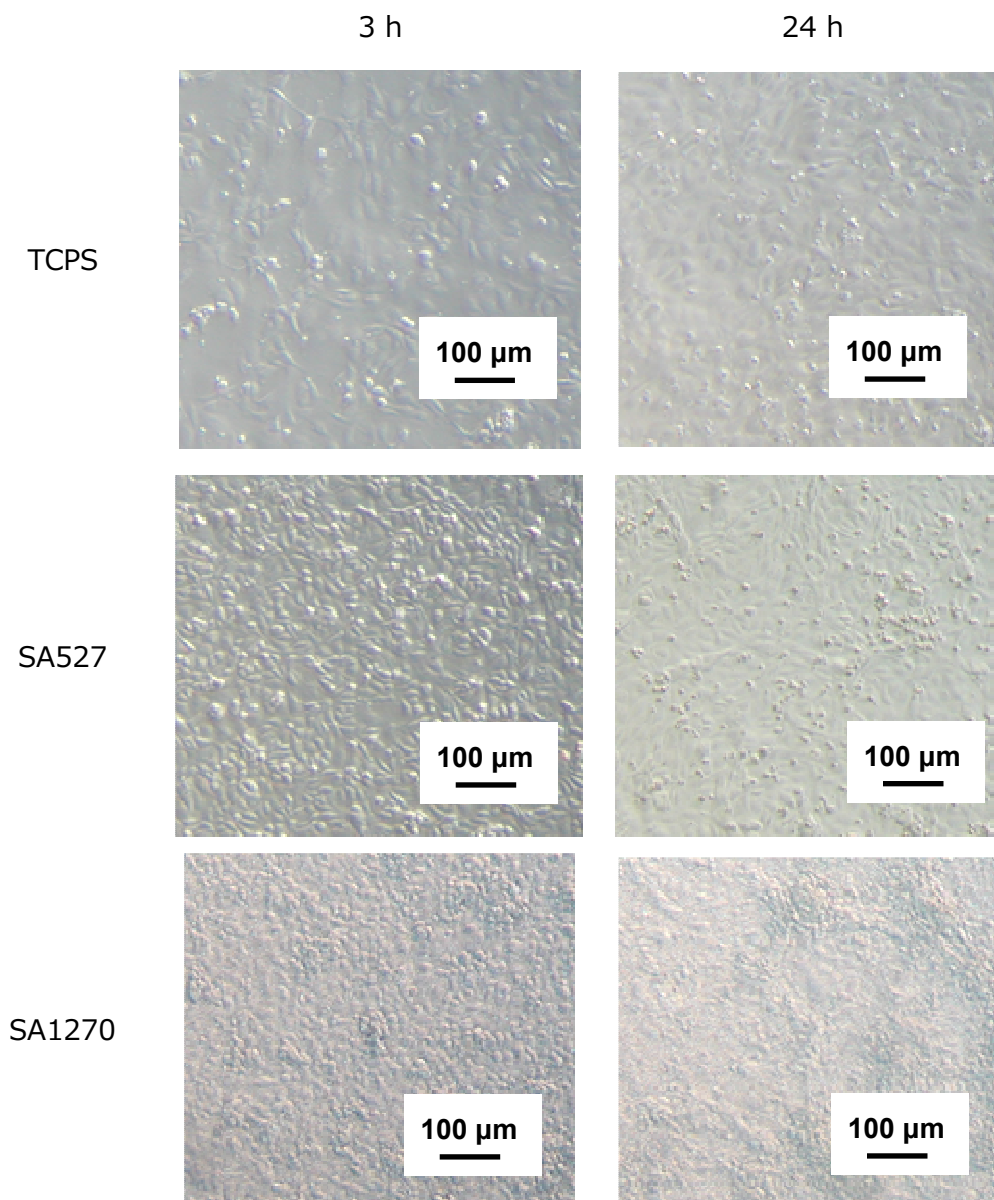


Figure 2.45 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto non-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 2.0×10^5 cells/cm².

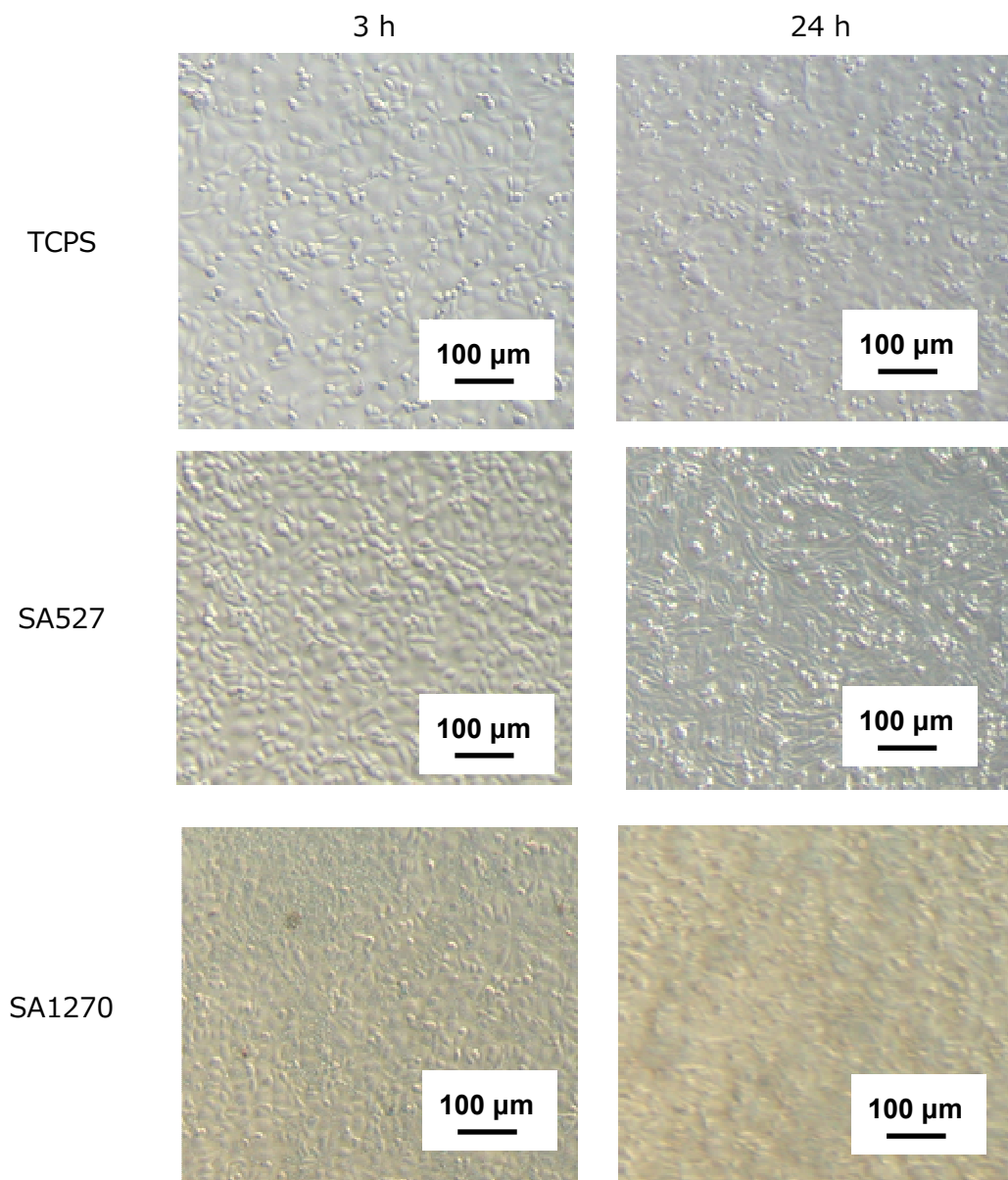


Figure 2.46 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto FN-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 2.0×10^5 cells/cm².

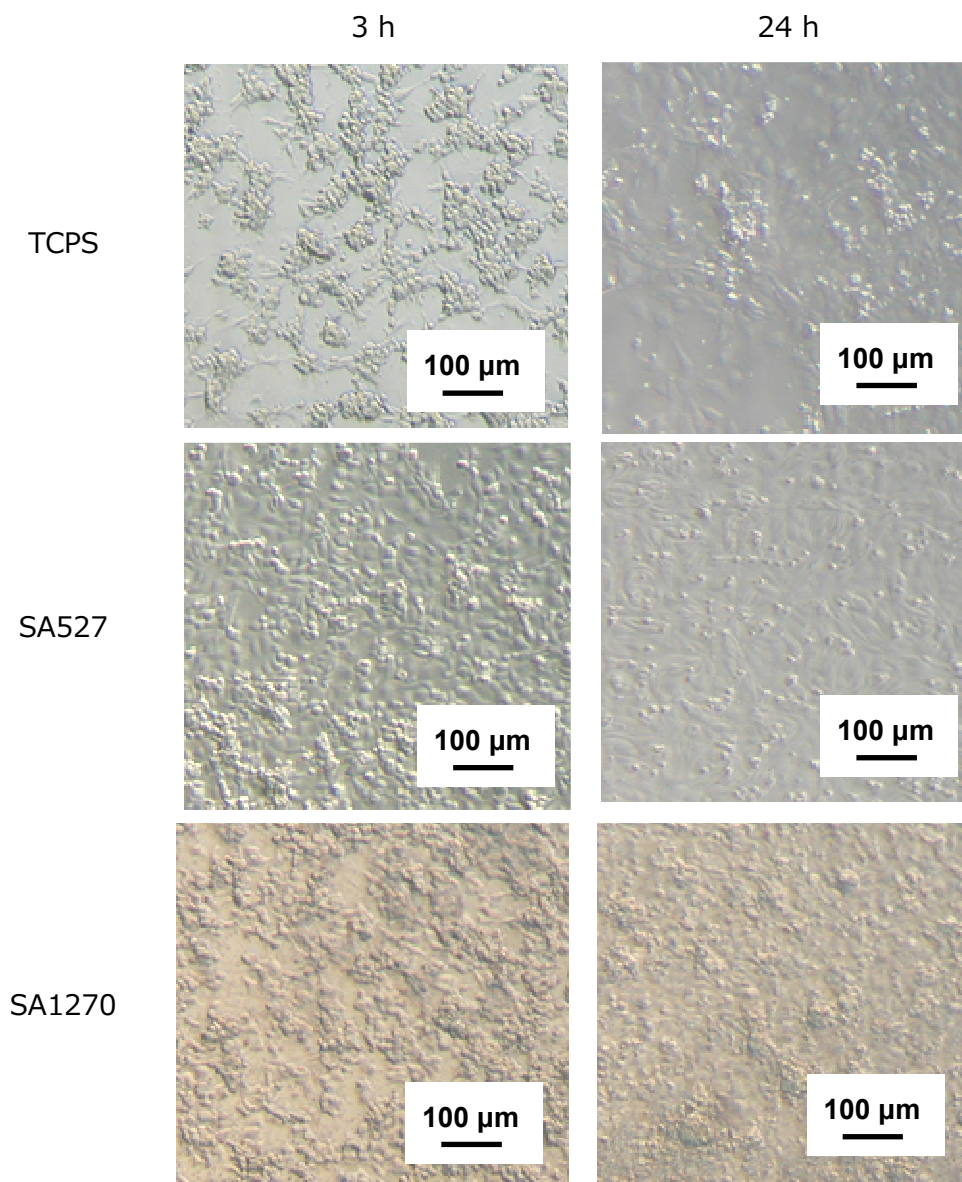


Figure 2.47 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto BSA-coated PS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 2.0×10^5 cells/cm².

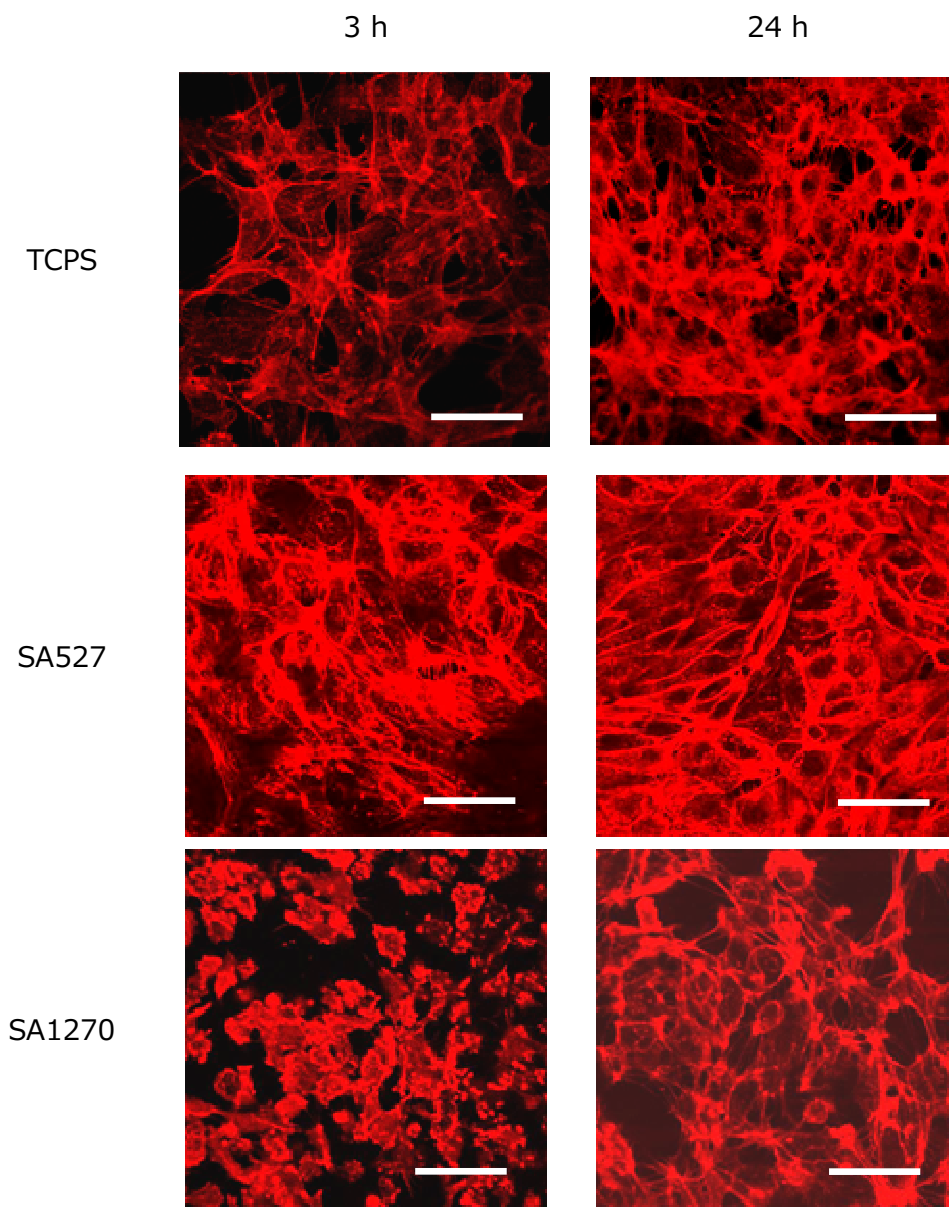


Figure 2.48 Confocal microscopic images of actin cytoskeletons of HUVECs adhering onto non-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 2.0×10^5 cells/cm². Scale bars indicate 50 μm.

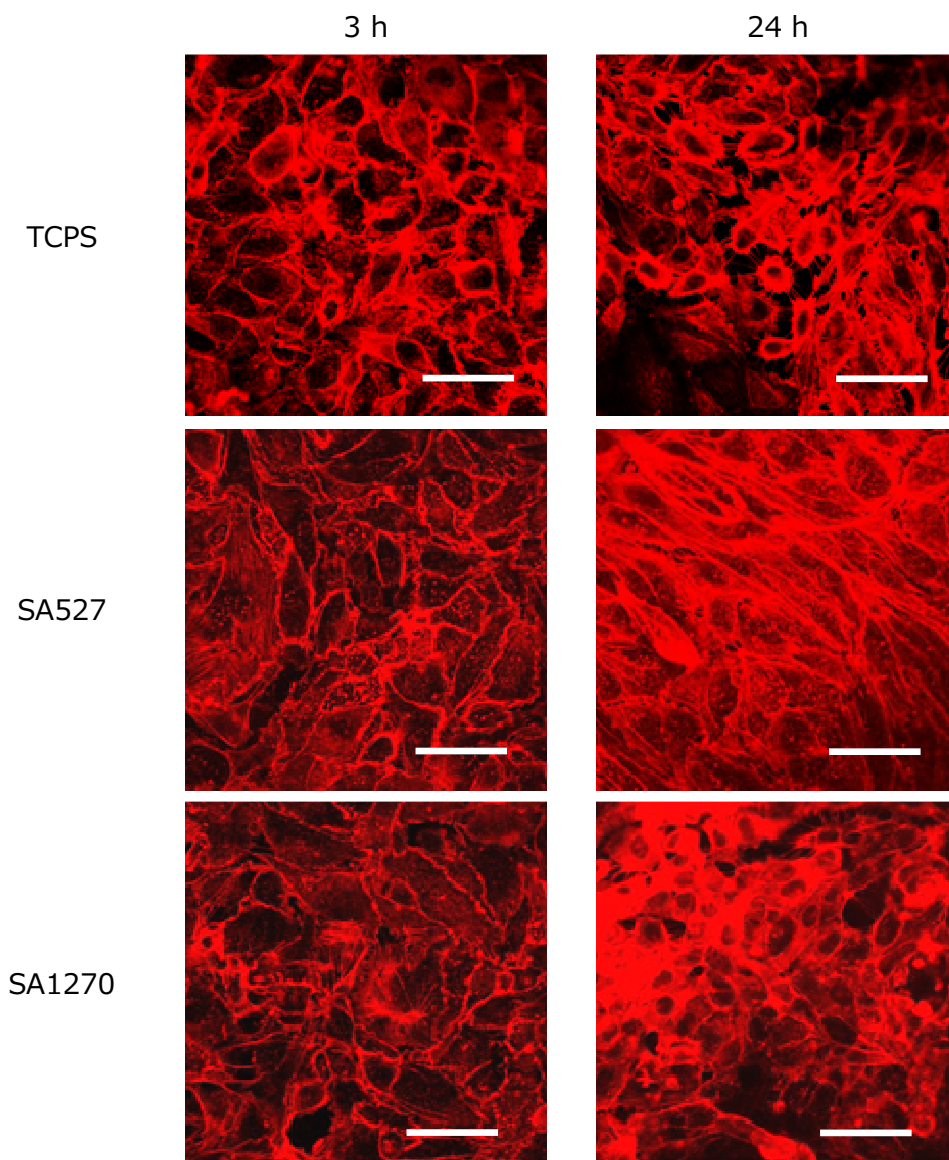
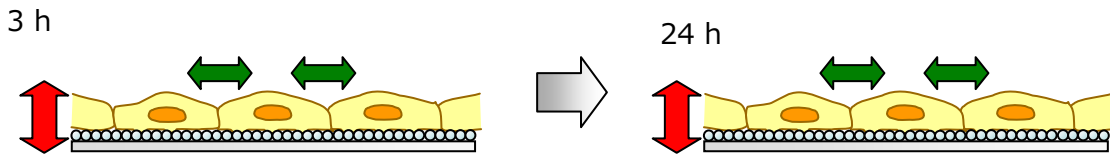
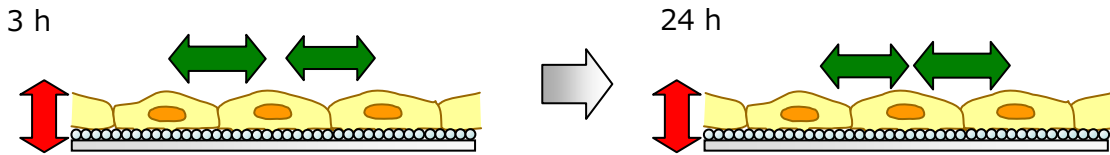


Figure 2.49 Confocal microscopic images of actin cytoskeletons of HUVECs adhering onto FN-coated TCPS and SA particle monolayers. Cells were seeded with the density of 2.0×10^5 cells/cm². Scale bars indicate 50 μ m.

(a) TCPS



(b) SA527 particle monolayer



(c) SA1270 particle monolayer

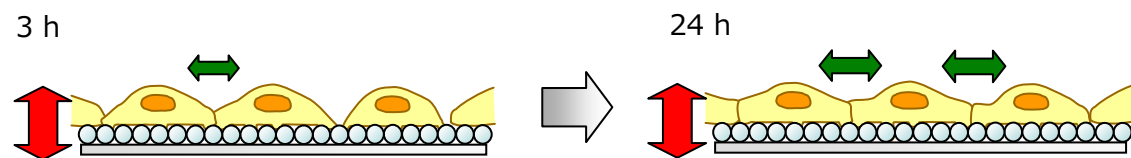


Figure 2.50 Illustration of cell-cell and cell-substrate interactions.

2.2.7 タイムラプス顕微鏡法による観察 (Figure 2.51, 2.52, 2.53)

Figure 2.51~2.53 に撮影した写真を示した。この結果より、TCPS では培養時間が経過しても細胞の形態は全く変化していないことがわかる。細胞は基板上をランダムに移動しており、細胞同士が接触することになる。TCPS 上で細胞は接触後、再び細胞の存在しないスペースに移動し、増殖することを繰り返していた。一方、SA527 粒子膜上の細胞は、播種直後から細胞同士が相互作用し、細胞が集合してドメインを形成した。これは細胞-基板間の接着が弱い（不安定）ため、細胞同士が接着して安定化しているものと考えられる。このタイムラプス観察によって、SEM や共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による観察結果が裏付けられた。一方、SA1270 粒子膜上の細胞は、他の基板と比較して細胞は複雑な挙動を示した。具体的には、細胞ドメインを形成しようとする細胞や、全く移動しない細胞、移動→停止→移動といったパターンを繰り返す細胞が混在していた。これは SEM で観察したように、細胞が粒子膜の裏側まで伸展するため、細胞の変形や移動が制限されていると考えられる。そのため細胞の自由な移動が制限されて、不規則な挙動を示したと考えられる。

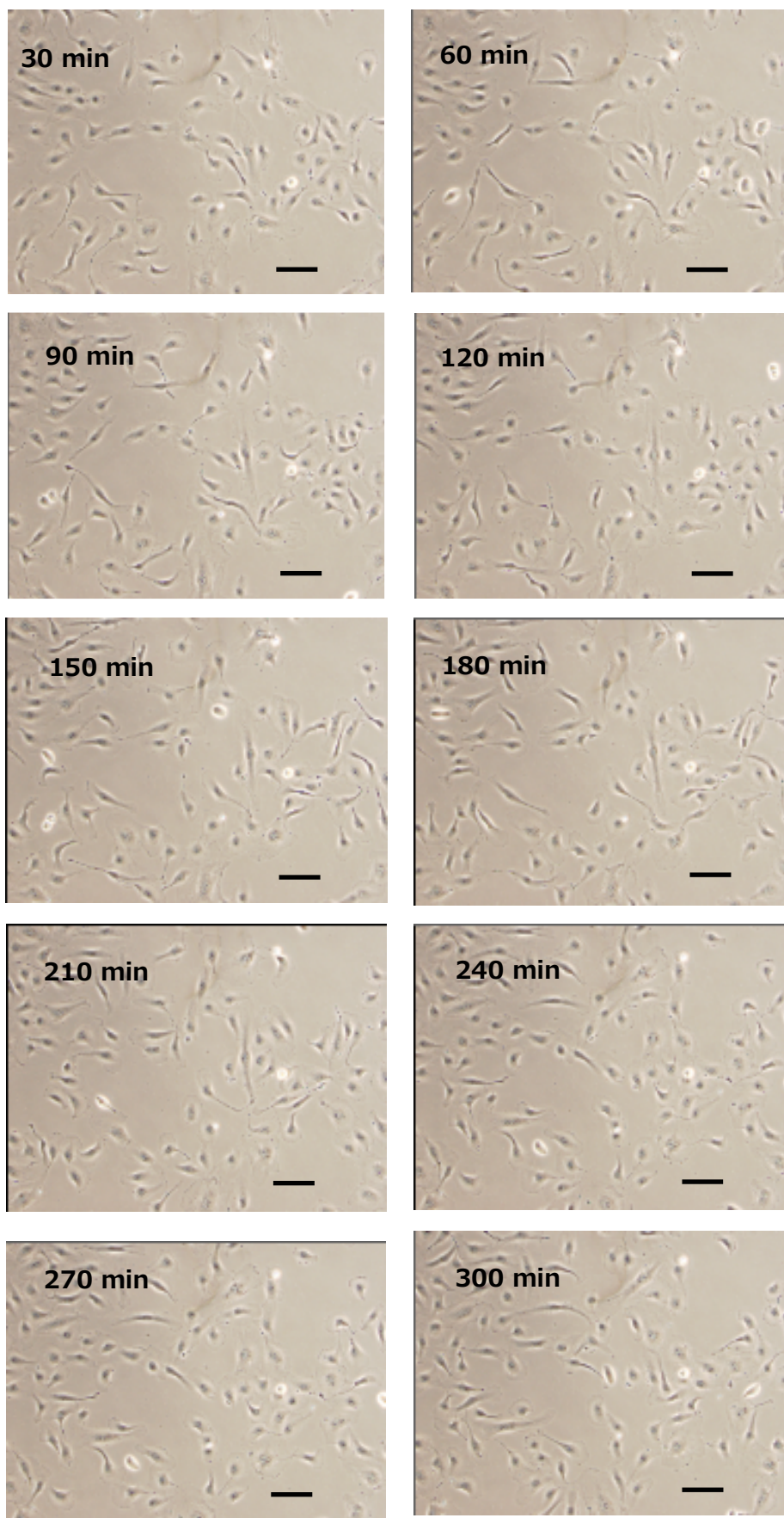


Figure 2.51 Time-lapse observations of HUVECs adhering onto a TCPS. Scale bars are 100 μm.

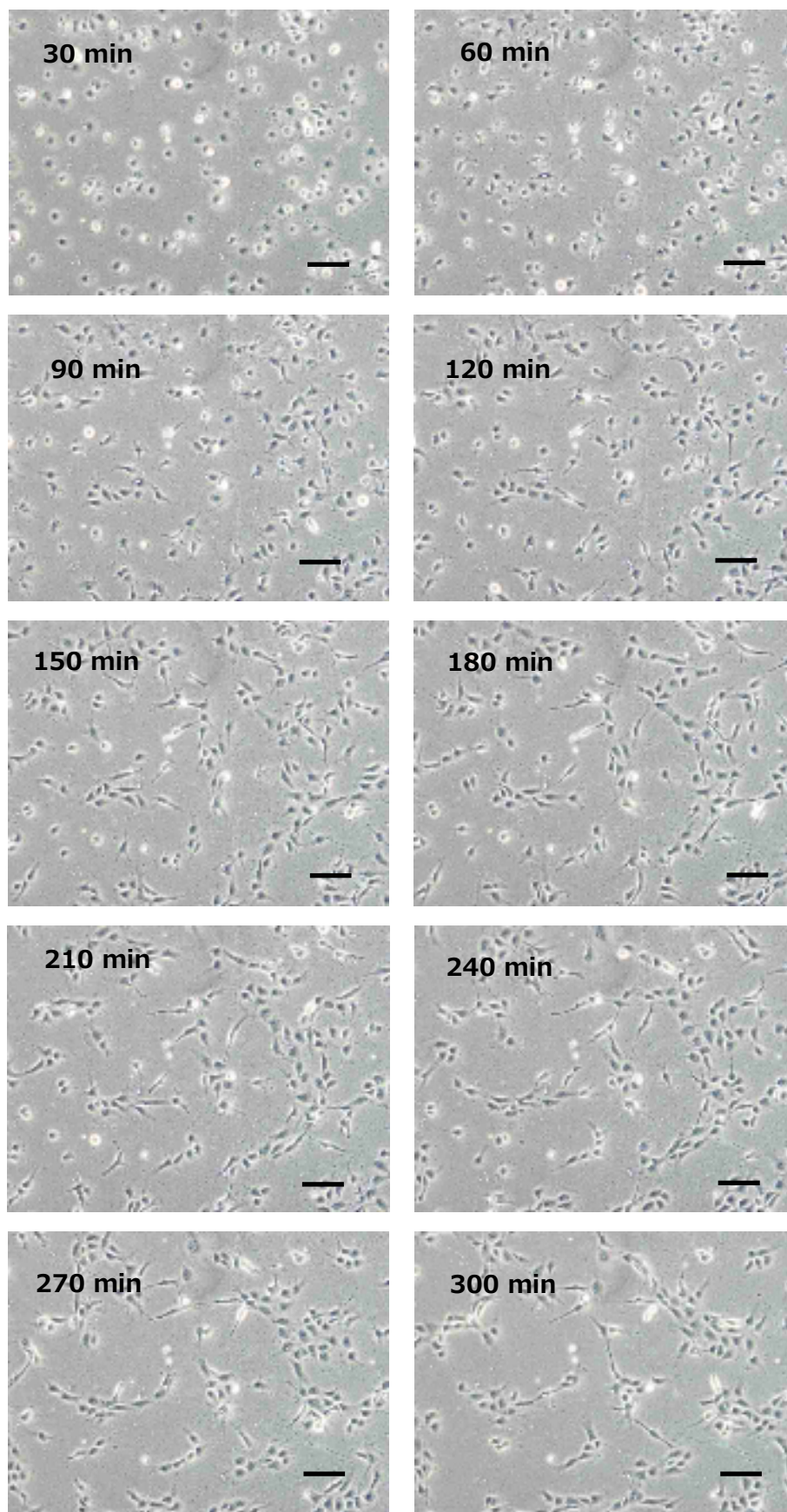


Figure 2.52 Time-lapse observations of HUVECs adhering onto an SA527 particle monolayer. Scale bars are 100 μm.

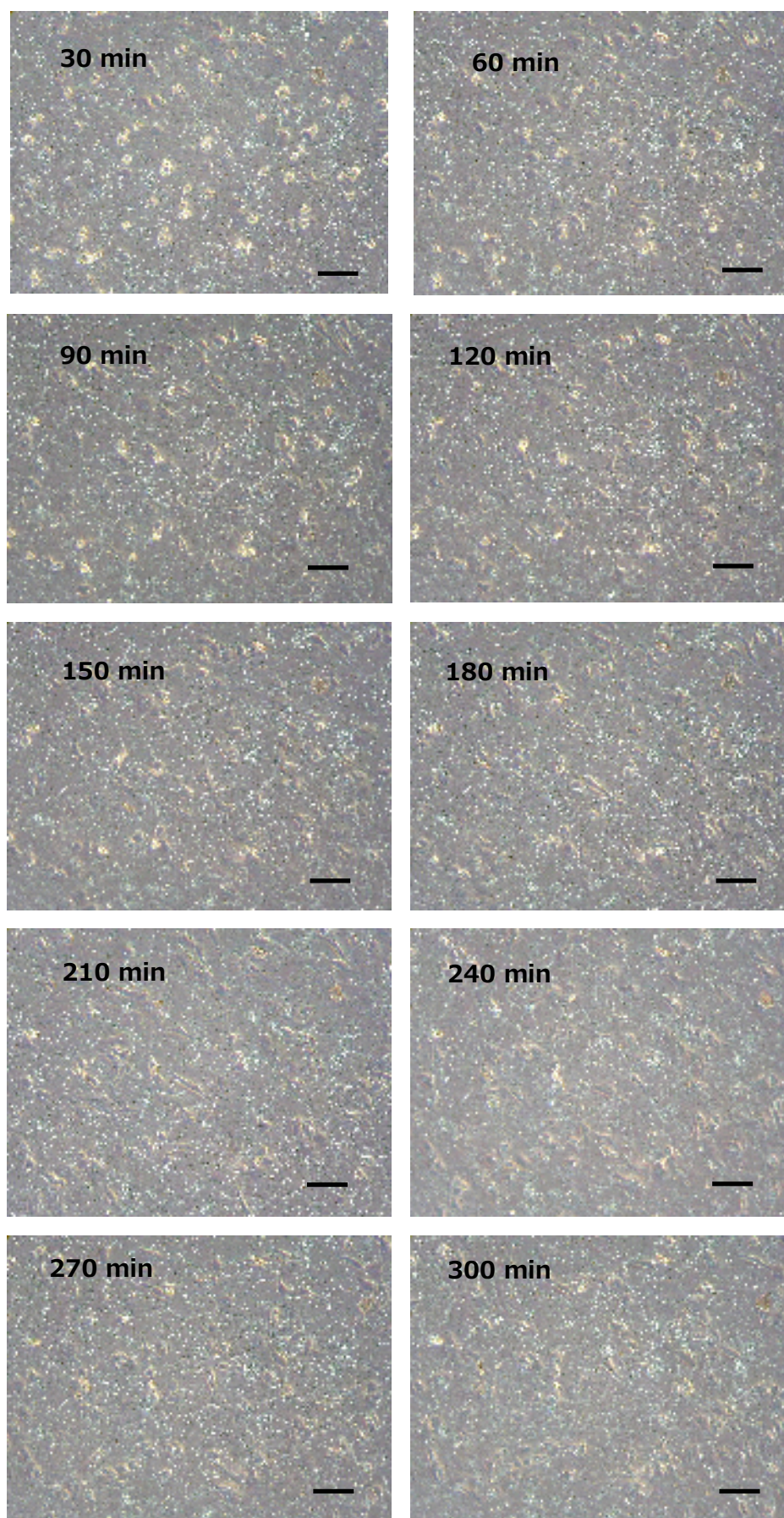


Figure 2.53 Time-lapse observations of HUVECs adhering onto a SA1270 particle monolayer. Scale bars are 100 μm .

2.2.8 免疫染色による細胞-基板間接着の観察

それぞれの細胞播種密度においてビンキュリンを染色し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、播種密度 1.0×10^4 cells/cm² の場合のみビンキュリンが染色されていることが確認された。ビンキュリンはカドヘリンが介在する細胞-細胞間接着にも関与しているため、細胞数が多い場合には、細胞-基板間接着と細胞-細胞間接着を区別できない。したがって播種密度 1.0×10^4 cells/cm² の場合のみを実験データとして掲載した。

Figure 2.54 より、それぞれの基板においてビンキュリンの局在に差があることが明らかになった。TCPS 上ではビンキュリンが細胞内部に点在しており、アクチンの染色像と重ね合わせると、ビンキュリンがアクチンストレスファイバーの末端に局在していることがわかった (Figure 2.54 upper column)。したがって TCPS ではインテグリンのクラスタリングが起こり、細胞が接着斑を形成することが示唆された (Figure 2.55a)。SA527 粒子膜上の細胞にもビンキュリンが点在している様子が観察されたが、TCPS 上のビンキュリンよりもサイズが小さく不明瞭であった (Figure 2.54 middle column)。SA527 粒子膜においてもインテグリンのクラスタリングは起こるが、クラスタリングは粒子の頂点部分に限定されている可能性がある (Figure 2.55b)。また SA1270 粒子膜においてはビンキュリンの局在は核以外ではほとんど観察されず、ストレスファイバーも観察されなかった (Figure 2.54 lower column)。SA1270 粒子膜上ではインテグリンのクラスタリングは起こらないと考えられる (Figure 2.55c)。

ここで注意すべきことは、粒子の曲率 (curvature) がストレスファイバーの形成および接着斑の形成に影響を与えているかもしれないということである。粒子の曲率は SA527 粒子 > SA1270 粒子となり、SA1270 粒子の方がより平面に近い。細胞が SA1270 粒子 1 個を「平面」と認識すれば、細胞の糸状仮足 (フィロポディア) が粒子の表面に沿って伸展することになり、SEM で観察したように最終的に粒子膜の裏側まで到達してしまう。つまり接着斑の形成には、細胞の糸状仮足 (フィロポディア) と基板の凹凸のサイズの対応関係が重要だと考えられる。また SA1270 粒子膜ではストレスファイバーが形成されなかったが、これも粒子の曲率に関係している可能性がある。ストレスファイバーはアクチンフィラメントが束になったものであるが、細胞が粒子の表面に沿って伸展してしまうと、曲率の関係で個々のアクチンフィラメントの伸長が抑制されてしまうと考えられる。

2.2.9 免疫染色による細胞-細胞間接着の観察

それぞれの細胞播種密度においてβ-カテニンを染色し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡にて観察した (Figure 2.56)。その結果、TCPS では播種密度が高いほど細胞-細胞間接着が発達していることがわかった。それに対し、SA527 粒子膜では細胞数に関係なく、強固な細胞-細胞間接着が形成されていた。したがって、SA527 粒子膜は細胞同士の相互作用を増大させていることがわかった。また SA1270 粒子膜で播種密度が 1.0×10^4 cells/cm² のときにはほとんど細胞同士の相互作用が見られなかったが、播種密度が増加するにつれて細胞-細胞間接着が発達することがわかった。

β-カテニンの観察結果とビンキュリンの観察結果を総合して考察すると、以下の通りになる。まず TCPS は細胞が接着・伸展しやすい基板であり、細胞がランダムに移動し、増殖するにつれて細胞-細胞間の相互作用が増大する。それに対して SA527 粒子膜は凹凸構造によってフィロポディアの伸展が抑制され、インテグリンのクラスタリングも制限されるため、TCPS に比べて細胞は接着・伸展しにくい。そのため細胞-細胞間接着を形成することによって細胞がドメインを形成し、安定化すると考えられる。SA1270 粒子膜では、細胞が接着・伸展しにくく、細胞同士の相互作用も少ない。このように考えると、基板の凹凸構造によって細胞接着を制御することにより、細胞-基板間の相互作用を変化させ

ることが可能である。その結果、細胞の伸展挙動や移動挙動が変化する。さらに、細胞の形態によって細胞-細胞間の相互作用が変化するため、基板の凹凸構造によって細胞-細胞間接着の形成を制御することも可能である。この粒子膜の特性は非常にユニークである。なぜなら、基板の形状によって細胞同士の相互作用を制御することによって、HUVEC に毛細血管を形成させることが可能になるかもしれないからである。そこで、次に細胞を長期間培養することにより、HUVEC が管腔を形成するかどうかを検討した。

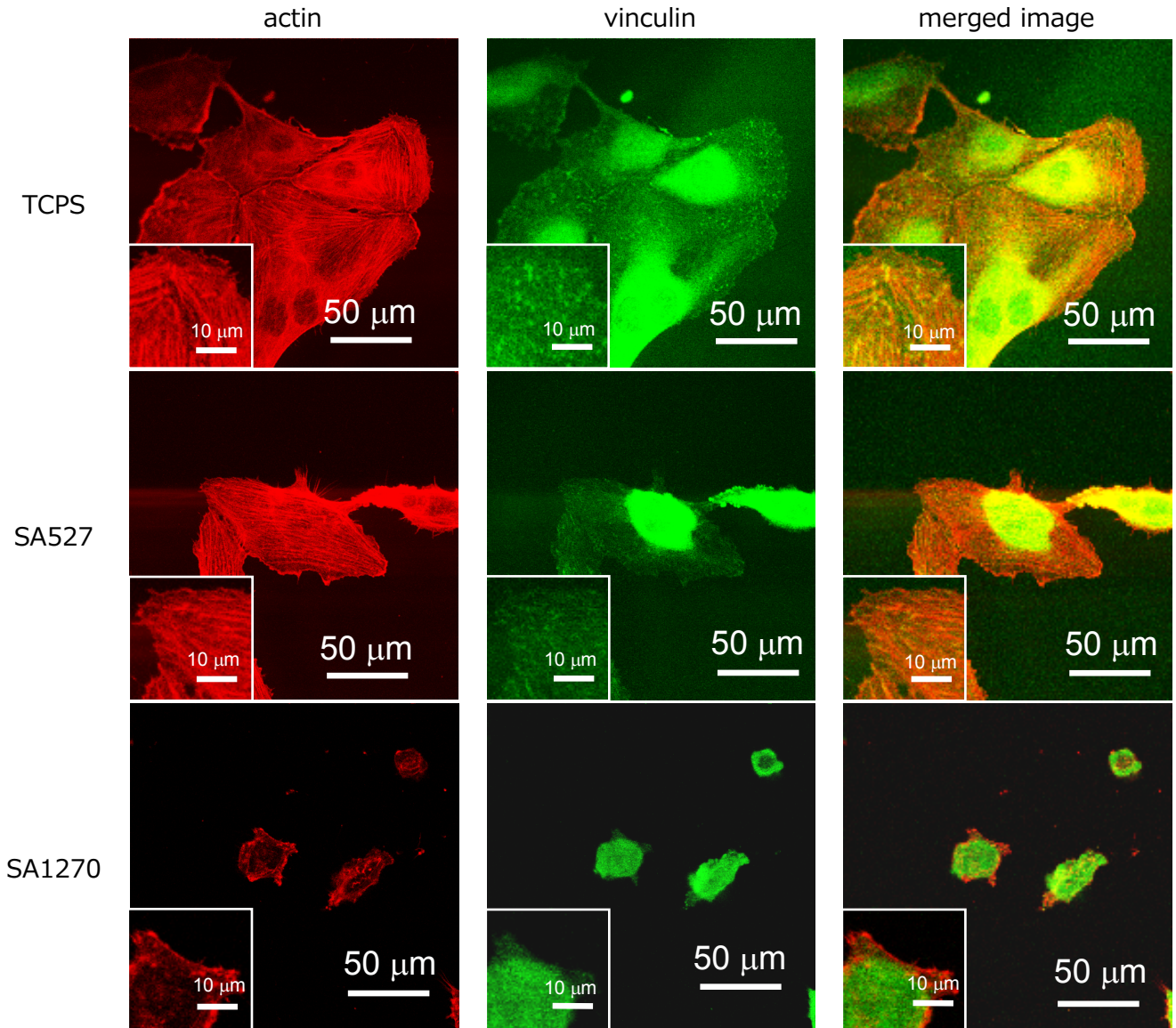


Figure 2.54 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and vinculin (green) of HUVECs. Cells were seeded with 1.0×10^4 cells/cm² and incubated for 1 d.

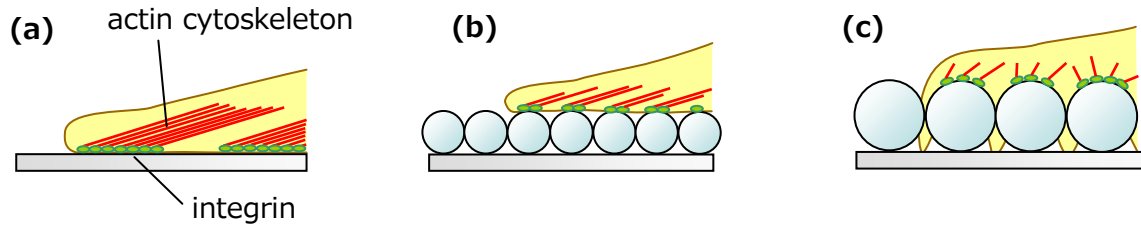


Figure 2.55 Illustrations of cell-substrate adhesion on TCPS (a), SA527 (b), and SA1270 (c) particle monolayers.

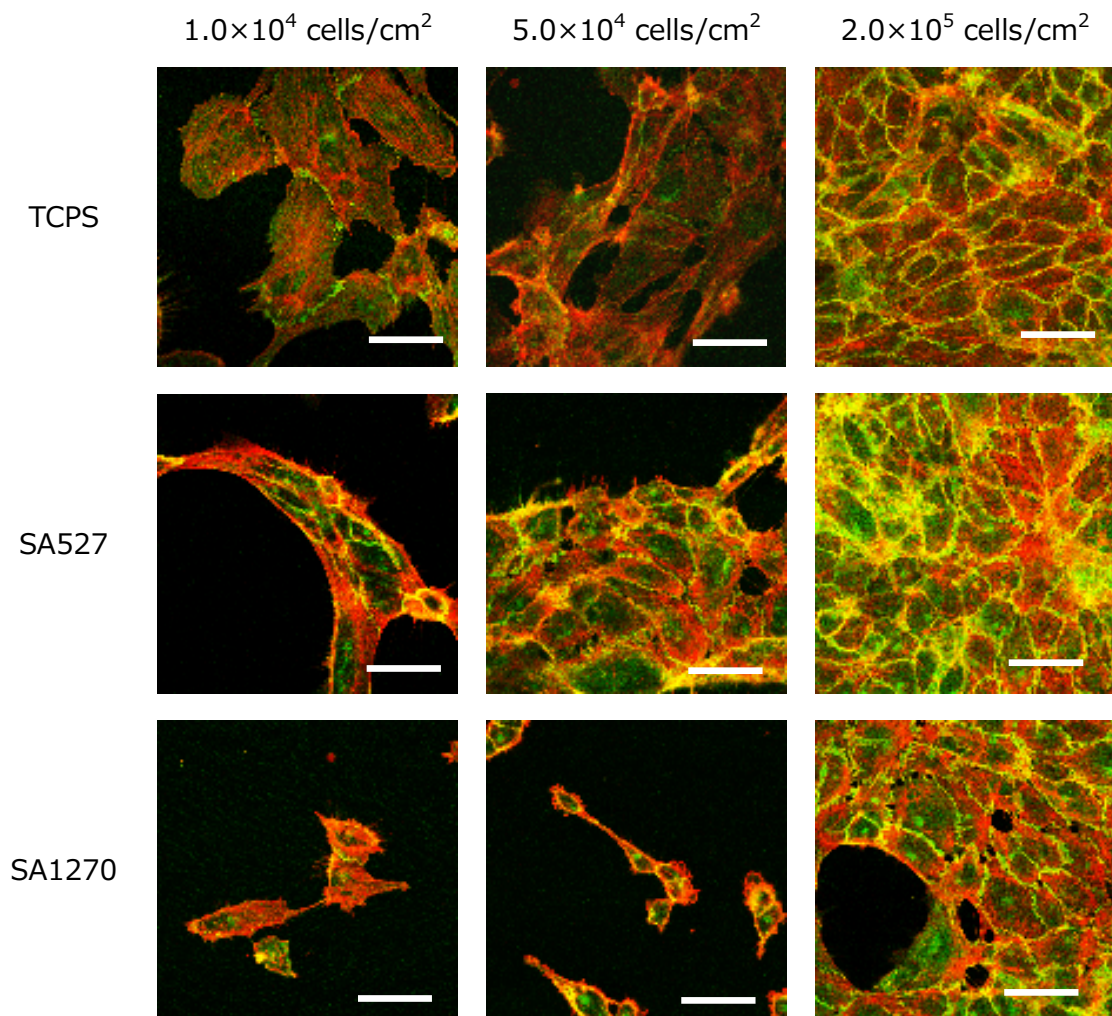


Figure 2.56 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and β -catenin (green) of HUVECs 1 d after incubation. Scale bars are 50 μ m.

2.2.10 細胞増殖性の評価

血球計算盤によって算出した細胞増殖性の結果を Figure 2.57 に示す。細胞の増殖性は TCPS > SA527 粒子膜 > SA1270 粒子膜となった。

①SA527 粒子膜における増殖

SA527 粒子膜における細胞増殖性は TCPS よりも低かった。TCPS では細胞はランダムに移動しながら増殖を繰り返すため、増殖効率は高くなる。一方、SA527 粒子膜において細胞はドメインを形成する。すなわち細胞ドメインの内部に存在する細胞は周囲に細胞が存在するために接触阻害によって増殖が停止するはずである。つまり細胞ドメイン辺縁部に存在する細胞のみが増殖することになると考えられる。

②SA1270 粒子膜における増殖

SA1270 粒子膜においては細胞がほとんど増殖しないという結果になった。これは細胞の伸展が抑制されたために増殖が抑制されたことを示している。

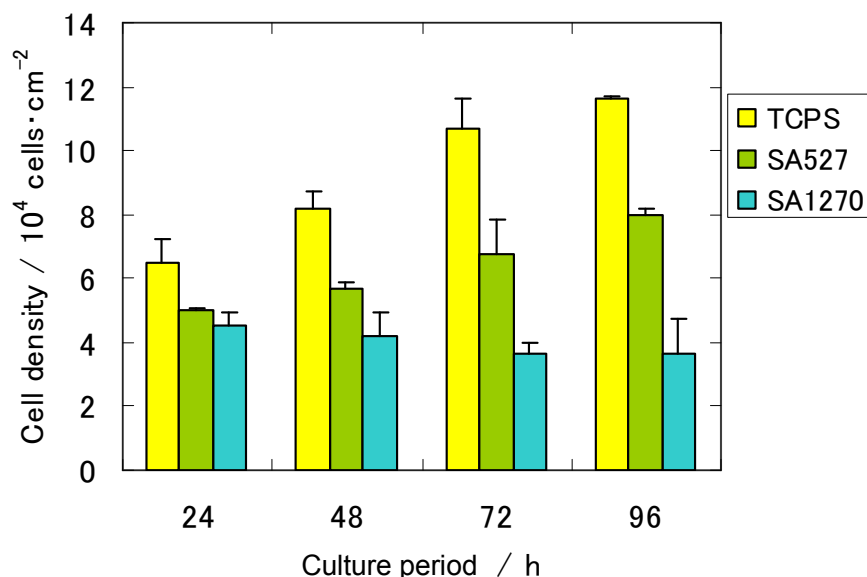


Figure 2.57 Proliferation of HUVECs adhering onto the non-coated TCPS and non-coated SA particle monolayers.

2.2.11 細胞の長期間培養

未処理、FN コート、または BSA コートした TCPS、SA527 粒子膜、SA1270 粒子膜に細胞を播種し、長期間培養を行った。その結果、48 時間後にメディアムを交換したとき、メディアムをマイクロピペットを使用して滴下したことによって細胞がシート状の組織として剥離してしまった (figure not shown)。そのため、長期間培養を行うためには慎重な実験操作が必要であることがわかった。

剥離したシート状の細胞をそのまま培養すると、再び基板に対して接着することが確認された。したがって剥離した細胞の生存が示唆された。このように培養細胞をピペッティングで回収できる培養基材としてはナノピラーシート^{54,55)}が挙げられる。ナノピラーシートとは直径 500 nm、高さ 1 μm の円柱が等間隔 (約 1 μm) で配列した基板である。この基板を用いると細胞の接着形態が球状になり、培養した後にピペッティングによって細胞を分散した状態で剥離できる。この基板の利点は、細胞の剥

離・分散のためにトリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いないため、細胞にダメージを与えないということである。しかしながら、これまでにナノピラーシートを用いて細胞シートを作製したという報告はない。これは接着している細胞の形態が球状であることから、ナノピラーの形状によって細胞の伸展が抑制され、細胞-細胞間の相互作用が起こりにくくなっていると考えられる。しかし粒子膜を用いれば細胞シートをピペッティングによって簡便に剥離・回収できる可能性がある。そこで第3章ではこの性質を利用して細胞シートの作製を試みることにした。

また、長期間培養をもう一度行い、細胞が剥離しないように慎重に7日間培養を行ったところ、細胞は増殖したが、管腔は形成されないことがわかった (figure not shown)。これは細胞が基板上をランダムに移動してしまうため、細胞組織の形状を制御できないためであると考えられる。他の研究者による毛細血管の培養では、細胞の接着領域をストライプ状に制限して培養している場合が多い。これは細胞組織の形状が細胞機能の発現にとって重要な役割を果たしていることを意味する。したがって第4章において、粒子膜における細胞接着領域のパターニングを試みた。

2.3 結論

モノマーに St と AAm を用い、ソープフリー乳化重合を行うことによって SA 粒子を作製した。塩化ナトリウムを添加することによって粒子径が増大した粒子が得られた(方法 A)。また分散媒に水と DMF の混合溶媒を用い、さらにスチレンを後から加える二段階重合を行うことによって、さらに粒子径の大きな SA 粒子を作製することができた(方法 B)。ただし添加量を増やすと凝集体が多くなるという弊害もあった。

SA 粒子の単層粒子膜の作製では、L-B 法を利用した。その結果、粒子が密にパッキングされた均一な粒子膜を得ることができた。作製した単層粒子膜の静的接触角を測定したところ、TCPS dish が疎水性であるのに対し、粒子膜は親水性であることがわかった。これは SA 粒子の表面に polyAAM が存在しているためである。

また TCPS、SA527 および SA1270 粒子膜に対して HUVEC を播種密度 1.0×10^4 、 5.0×10^4 および 2.0×10^5 cells/cm² となるように播種して細胞の接着形態の観察を行った。その結果、基板の凹凸構造によって細胞-基板間接着が変化することがわかった。TCPS に接着した細胞はフィロポディアを活発に伸展させ、接着斑やストレスファイバーを発達させた。一方、SA527 粒子膜上の細胞はフィロポディアを粒子の頂点部分に伸展させた。そのためインテグリンのクラスタリングは粒子の頂点部分に制限され、接着斑のサイズが TCPS 上の細胞よりも小さくなった。また SA1270 粒子膜ではフィロポディアが粒子を被覆するように伸展していた。細胞の伸展に対してフィロポディアと凹凸構造のサイズの対応関係が影響を与えていることが示唆された。またフィブロネクチンを基材表面にあらかじめ吸着させておくと細胞の伸展が促進され、凹凸構造の影響が弱まった。したがって粒子膜の凹凸だけでなく粒子の細胞接着性も細胞の伸展に影響を与えることがわかった。

細胞同士の相互作用もそれぞれの基板において異なることがわかった。タイムラプス観察の結果、TCPS では細胞がランダムに移動するのに対し、SA527 粒子膜では細胞播種直後から細胞同士が集合し、ドメインを形成することがわかった。SA1270 粒子膜では細胞の移動や伸展が抑制されていることがわかった。またβ-カテニンの免疫染色の結果、TCPS 上の細胞は細胞数が増えるにしたがって細胞-細胞間接着が形成されたのに対し、SA527 粒子膜では細胞数に関わらず強固な細胞-細胞間接着が形成された。また SA1270 粒子膜上の細胞は細胞同士の相互作用が起こりにくいことがわかった。細胞細胞播種密度を変えることによって細胞同士の相互作用を制御することができた。

2.4 参考文献

- 1) Doua K, Xu Z, Wang XJ, Chen Y, Collins T, "Spectral study of colloidal photonic crystals", *Journal of Luminescence* 102-103, 476-480, 2003.
- 2) Haginoya C, Heike S, Ishibashi M, Nakamura K, Koike K, Yoshimura T, Yamamoto J, Hirayama Y, "Magnetic nanoparticle array with perpendicular crystal magnetic anisotropy", *Journal of Applied Physics* 85, 8327-8331, 1999.
- 3) Maxwell DJ, Taylor JR, Nie S, "Self-Assembled Nanoparticle Probes for Recognition and Detection of Biomolecules", *Journal of American Chemical Society* 124, 9606-9612, 2002.
- 4) Yabu H, Shimomura M, "Simple Fabrication of Micro Lens Arrays", *Langmuir* 21, 1709-1711, 2005.
- 5) Li QT, Chen YF, Dong P, "Improvement of the quality of silica colloidal crystals by controlling

- drying”, *Materials Letters* 59, 3521-3524, 2005.
- 6) 鈴木 良尚, 澤田 勉, 森 篤史, 田村 勝弘, 「遠心沈降法を用いたコロイド結晶の作製」, 高分子論文集 64, 161-165, 2007.
- 7) Villaescusa LA, Mihi A, Rodriguez I, Garcia-Bennett AE, Miguez H, “Growth of Mesoporous Materials within Colloidal Crystal Films by Spin-Coating”, *Journal of Physical Chemistry B* 109, 19643-19649, 2005.
- 8) Hohenesche CF, Stathopoulos V, Unger KK, Lind A, Linden M, “Formation of hierarchically ordered silicas prepared by spray drying of nanosized spheres”, *Characterization of Porous Solids VI Studies in Surface Science and Catalysis* 144, 339-346, 2002.
- 9) Duarte MME, Pilla AS, Sieben JM, Mayer CE, “Platinum particles electrodeposition on carbon substrates”, *Electrochemistry Communications* 8, 159-164, 2006.
- 10) Horozov TS, Binks BP, “Particle behaviour at horizontal and vertical fluid interfaces”, *Colloids and Surfaces A* 267, 64-73, 2005.
- 11) Kralchevsky PA, Denkov ND, “Capillary forces and structuring in layers of colloid particles”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6, 383-401, 2001.
- 12) Park SH, Qin D, Xia Y, “Crystallization of Mesoscale Particles over Large Areas”, *Advanced Materials* 10, 1028-1032, 1998.
- 13) Zasadzinski JA, Viswanathan R, Madsen L, Garnæs J, Schwartz DK, “Langmuir-Blodgett Films”, *Science* 263, 1726-1733, 1994.
- 14) 中浜数理, 「高分子微粒子の組織化を通じた超構造体の作製」, 慶應義塾大学理工学研究科博士論文, 2002.
- 15) 宗兼彰美, 「単層粒子膜をフレームとして組み上げたゲル薄膜の開発」, 慶應義塾大学理工学研究科修士論文, 2003.
- 16) Fujimoto K, Katsuta I, Adachi T, “Producing and patterning of nanocrystals using “atto-incubators” composed of the core-shell particles”, *Colloids and Surfaces A* 290, 118-124, 2006.
- 17) Miyaki M, Fujimoto K, Kawaguchi H, “Cell response to micropatterned surfaces produced with polymeric microspheres” *Colloids and Surfaces A* 153, 603-608, 1999.
- 18) Wang X et al., “Spectroscopic and structural characteristics of Langmuir-Blodgett films of bis[2,3,9,10,16,17,24,25-octakis(octyloxy)phthalocyaninato] rare earth complexes”, *Thin Solid Films* 496, 619-625, 2006.
- 19) Nørgaard K, Laursen BW, Nygaard S, Kjaer K, Tseng HR, Flood AH, Stoddart JF, Bjornholm T, “Structural Evidence of Mechanical Shuttling in Condensed Monolayers of Bistable Rotaxane Molecules”, *Angewandte Chemie International Edition* 44, 7035-7039, 2005.
- 20) Cheyne RB, Moffitt MG, “Hierarchical Nanoparticle/Block Copolymer Surface Features via Synergistic Self-Assembly at the Air-Water”, *Langmuir* 21, 10297-10300, 2005.
- 21) Muthukumar K, Loewe RS, Kirmaier C, Hindin E, Schwartz JK, Sazanovich IV, Diers JR, Bocian DF, Holten D, Lindsey JS, “Synthesis and Excited-State Photodynamics of A Perylene-Monoimide-Oxochlorin Dyad. A Light-Harvesting Array”, *Journal of Physical Chemistry B* 107, 3431-3442, 2003.
- 22) Okano T, Nishiyama S, Shinohara I, Akaike T, Sakurai Y, Kataoka K, Tsuruta T, “Effect of

- hydrophilic and hydrophobic microdomains on mode of interaction between block polymer and blood platelets", *Journal of Biomedical Materials Research* 15, 393-402, 2004.
- 23) Yabu H, Tanaka M, Ijio K, Shimomura M, "Preparation of Honeycomb-Patterned Polyimide Films by Self-Organization", *Langmuir* 19, 6297-6300, 2003.
- 24) Tsukiyama S, Matsushita M, Tanaka M, Tamura H, Todo S, Yamamoto S, Shimomura M, "Enhanced Cell Survival and Yield of Rat Small Hepatocytes by Honeycomb-Patterned Films", *Japanese Journal of Applied Physics* 47, 1429-1434, 2008.
- 25) Tsuruma A, Tanaka M, Yamamoto S, Shimomura M, "Control of neural stem cell differentiation on honeycomb films", *Colloids and Surfaces A* 313-314, 536-540, 2008.
- 26) Fukuhira Y, Kaneko, Yamaga M, Tanaka M, Yamamoto S, Shimomura M, "Effect of honeycomb-patterned structure on chondrocyte behavior in vitro", *Colloids and Surfaces A* 313-314, 520-525, 2008.
- 27) Tanaka M, Takayama, A, Ito E, Sunami H, Yamamoto S, Shimomura M, "Effect of Pore Size of Self-Organized Honeycomb-Patterned Polymer Films on Spreading, Focal Adhesion, Proliferation, and Function of Endothelial Cells", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, 763-772, 2007.
- 28) Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blummel J, Eck W, Kantslehner M, Kessler H, Spatz JP, "Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces", *ChemPhysChem* 5, 383-388, 2004.
- 29) Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP, "Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands", *Biophysical Journal* 92, 2964-2974, 2007.
- 30) Fujimoto K, Takahashi T, Miyaki M, Kawaguchi H, "Cell activation by the micropatterned surface with settling particles", *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 8, 879-891, 1997.
- 31) Miyaki M, Fujimoto K, Kawaguchi H, "Cell response to micropatterned surfaces produced with polymeric microspheres", *Colloids and Surfaces A* 153, 603-608, 1999.
- 32) Peterson IR, "Langmuir-Blodgett films", *Journal of Physics D* 23, 379-395, 1990.
- 33) Goodall AR, Wilkinson MC, Hearn J, "Mechanism of Emulsion Polymerization of Styrene in Soap-Free Systems", *Journal of Polymer Science* 15, 2193-2218, 1977.
- 34) Hearn J, Wilkinson M, Goodall AR, Chaney M, "Kinetics of the Surfactant-Free Emulsion Polymerization of Styrene:-The Post Nucleation Stage", *Journal of Polymer Science* 23, 1869-1883, 1985.
- 35) 北原文雄, 「界面・コロイド化学の基礎」, 講談社, 1994.
- 36) Fitch RM, "The homogeneous nucleation of polymer colloids", *British Polymer Journal* 5, 467-483, 1973.
- 37) Chen SA, Lee ST, "Kinetics and Mechanism of Emulsifier-Free Emulsion Polymerization: Styrene/Hydrophilic Comonomer (Acrylamide) System", *Macromolecules* 24, 3340-3351, 1991.
- 38) Otsuka Y, Kawaguchi H, Sugi Y, "Copolymerization of Styrene with Acrylamide in an Emulsifier-Free Aqueous Medium", *Journal of Applied Polymer Science* 26, 1637-1647, 1981.

- 39) Ramirez-Aguilar KA, Rowlen KL, "Tip Characterization from AFM Images of Nanometric Spherical Particles", *Langmuir* 14, 2562-2566, 1998.
- 40) 筏義人, 「バイオマテリアル 人工臓器へのアプローチ」, 日刊工業新聞社, 1988.
- 41) 高倉伸幸ら, 「基礎から臨床応用までの血管研究がわかる」, 羊土社, 2004.
- 42) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, 中村桂子, 松原謙一 監訳, 「細胞の分子生物学 第4版」, ニュートンプレス, 2004.
- 43) 林正男, 「新 細胞接着分子の世界」, 羊土社, 2001.
- 44) Schmitz AA, Govek E, Bottner B, Van Aelst L, "Rho GTPases: Signaling, Migration, and Invasion", *Experimental Cell Research* 261, 1-12, 2000.
- 45) Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM, "Transmembrane Extracellular Matrix-Cytoskeleton Crosstalk", *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 793-805, 2001.
- 46) Maheshwari G, Brown G, Lauffenburger DA, Wells A, Griffith LG "Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering", *Journal of Cell Science* 113, 1677-1686, 2000.
- 47) Nelson CM, Pirone DM, Tan JL, Chen CS, "Vascular Endothelial-Cadherin Regulates Cytoskeletal Tension, Cell Spreading, and Focal Adhesions by Stimulating RhoA", *Molecular Biology of the Cell* 15, 2943-2953, 2004.
- 48) 三木裕明 編, 「細胞骨格・運動がわかる」, 羊土社, 2004.
- 49) Kapur S, Baylink DJ, Lau KHW, "Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways", *Bone* 32, 241-251, 2003.
- 50) Vroman L, Adams AL et al., "Identification of Rapid Changes at Plasma-Solid Interfaces", *Journal of Biomedical Materials Research* 3, 43-67, 1969.
- 51) Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF, "Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness", *Nature* 385, 537-540, 1997.
- 52) Nyberg SL, Hardin J, Amiot B, Argikar UA, Remmel RP, Rinaldo P, "Rapid, Large-Scale Formation of Porcine Hepatocyte Spheroids in a Novel Spheroid Reservoir Bioartificial Liver", *Liver Transplantation* 11, 901-910, 2005.
- 53) Wautier F, Wislet-Gendebien S, Chanas G, Rogister B, Leprince P, "Regulation of nestin expression by thrombin and cell density in cultures of bone mesenchymal stem cells and radial glial cells", *BMC Neuroscience* 8, 104, 2007.
- 54) Nomura S, Kojima H, Ohyabu Y, Kuwabara K, Miyauchi A, Uemura T, "Cell Culture on Nanopillar Sheet: Study of HeLa Cells on Nanopillar Sheet", *Japanese Journal of Applied Physics* 44, L1184-L1186, 2005.
- 55) Nomura S, Kojima H, Ohyabu Y, Kuwabara K, Miyauchi A, Uemura T, "Nanopillar sheets as a new type of cell culture dish: detailed study of HeLa cells cultured on nanopillar sheets", *Journal of Artificial Organs* 9, 90-96, 2006.

第3章

単層粒子膜を利用した細胞シートの作製

近年、組織工学におけるひとつの手法として「細胞シート工学」に期待が寄せられている。細胞シート工学とは何らかの方法によって細胞シートを作製し、得られた細胞シートを利用して組織の再生を図る方法論である。通常の培養法では細胞をトリプシン（タンパク質分解酵素）処理によって分散状態で回収するため、細胞シートを作製するためには通常とは異なる操作が必要となる。細胞シートの作製法としては大別して3種類の手法が提案されている。

1つは分解性培養基質上にて細胞を培養した後、基質を分解して細胞をシート状のまま回収する方法である。例えば、I型コラーゲンゲル上にて細胞を培養した後、コラゲナーゼによってコラーゲンを分解して細胞シートを得る方法がある¹⁾。またフィブリンゲルを培養基材として用いて細胞を培養すると、細胞自身が分泌するプロテアーゼによってフィブリンが分解され、培養した細胞が自然に剥離して細胞シートが得られる²⁾。ただしこれらの方法には、コラゲナーゼやプロテアーゼによって細胞が分泌した細胞外マトリックスも分解されてしまうという欠点がある。

もう1つは、温度によって細胞接着性が変化する培養基材を用いる手法である。細胞の培養温度は体内温度と同じ37℃であるため、37℃においては疎水性で細胞が接着（タンパク質が吸着）し、それ以下の温度では親水性に変化して細胞の脱着（タンパク質の脱着）が起こるような基板を作製すればよい。この例としては、ポリ*N*-イソプロピルアクリルアミド（PNIPAM）をTCPSやシラン化ガラス表面にグラフトした温度応答性培養皿を利用して細胞シートを回収する方法³⁾が代表的である。PNIPAMは下限臨界共溶温度（LCST）を有し、LCST以上では疎水性、LCST以下では親水性に可逆的に変化する。この基板上で培養した細胞を20℃で20分程度インキュベートすることにより、ほぼ100%の細胞が剥離し、細胞シートが得られる（細胞脱着の駆動力としてポリマーの水和だけでなく細胞骨格の再編成が必要とされ、その至適温度は20℃とされている⁴⁾）。この手法では、細胞だけでなくECMも同時に無傷で剥離させることが可能である⁵⁾。そのため得られた細胞シートが再び宿主組織と接着するまで5分程度と非常に短時間で済むことも特徴である。この他にも温度応答性ポリマーを用いた多数の培養基材が存在する（ K^+ 濃度依存的に細胞脱着を起こすPNIPAMグラフト培養皿⁶⁾、温度応答性ナノコンポジットゲル⁷⁾、温度応答性ポリペプチド⁸⁾、温度応答性メチルセルロース⁹⁾、Pluronic F127[®]ハイドロゲル¹⁰⁾）が、どれもほぼ同じ原理である。

最後の1つは、磁性体を利用した培養・回収法である。磁性ラベル化した細胞を永久磁石によって細胞非接着性基板上に集積させながら培養する。培養後に磁石を除去すると、細胞が基板から離れ、細胞シートが得られる¹¹⁾。この手法の利点は細胞剥離操作に温度変化を必要としないこと、そして磁力によって細胞シートを操作できるということである。磁力を利用して階層構造を有する血管様構造体の構築も試みられている¹²⁾。

本章では、単層粒子膜を用いて細胞シートを作製することを目的とした。SA粒子に加えてポリスチレン（PS）粒子を作製し、SA粒子膜とPS粒子膜における細胞剥離性の比較を行った。PS粒子はSA粒子よりも疎水性であると考えられるため、細胞剥離性にどのような影響を与えるかを調べた。細胞剥離操作としては、マイクロピペットを用いたピペッティングを選択した。もしピペッティングのみで細

胞シートを剥離することができれば、従来法（低温処理や特別な試薬が必要）よりも優れた手法を開発できると考えられる。

3.1 実験方法

3.1.1 PS 粒子の作製および評価

3.1.1.1 試薬

- | | |
|--|---------------|
| ・エタノール (ethanol) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・塩化ナトリウム (sodium chloride, NaCl) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・過硫酸カリウム (potassium persulfate, KPS) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| 再結晶法によって精製後、減圧乾燥を行ったものを使用した。 | |
| ・N,N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide, DMF) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・スチレン (styrene, St) | 和光純薬工業 (株) 一級 |
| 重合禁止剤やオリゴマー除去のため減圧蒸留して用いた。 | |
| ・塩化ナトリウム (sodium chloride, NaCl) | 純正化学 (株) 特級 |

3.1.1.2 PS 粒子の作製

300 mL (または 200 mL) の四つ口フラスコに攪拌棒、冷却管、窒素導入管、セラムラバーを取り付け、St モノマー、蒸留水、70°C の恒温槽中で 300 rpm の回転速度にて攪拌しながら 1 時間窒素置換した後、蒸留水 10 g で溶解した開始剤 KPS の水溶液を注射器で注入し、窒素雰囲気下で 24 時間重合を行った。作製したラテックスを遠心分離にて精製した。25°C、5,000~10,000 rpm で 5~10 分間遠心分離を行って粒子を完全に沈降させ、上清をデカンテーションにより除去した後、残りの固形分を蒸留水で再分散させた。この操作を 5 回繰り返すことにより粒子の精製を行った。

3.1.1.3 PS 粒子の評価

第 2 章で作製した SA 粒子と同様にキャラクタリゼーションを行った。乾燥粒子径を TEM 写真から計算して求めた。粒子の表面電位はコンパクトゼータ電位測定装置 (ZEECOM、マイクロテック・ニチオン (株) 製) を用い、ゼータ電位 (ζ -potential) を測定することにより評価した。

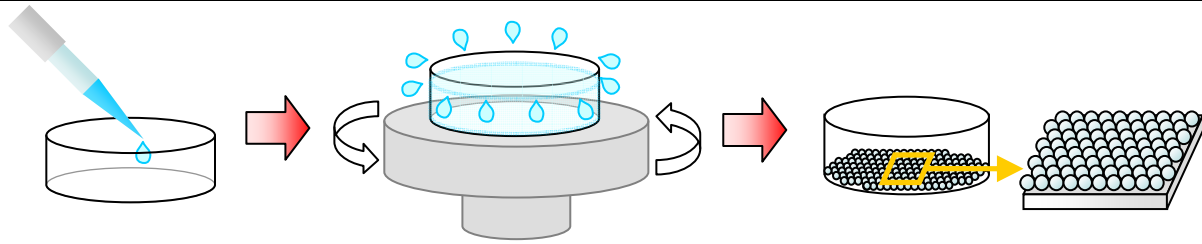
3.1.2 PS 粒子膜の作製および評価

3.1.2.1 ラテックスの溶媒置換

精製した粒子のラテックスを、再び 25°C、10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をデカンテーションにより除去した後、残った固形分を (水/エタノール=2/1) の混合溶媒で再分散した。続いて同様の操作を行い、それぞれ (水/エタノール=1/2) の混合溶媒、99.5%エタノールに再分散させることによって分散媒をエタノールに置換した。

3.1.2.2 スピンコートによる単層粒子膜の作製

0.5~3.0 wt% に調製したラテックス 1 mL を PS dish に注入し、所定時間静置した後、スピンコート機 (SPINCOATER 1H-D3, MIKASA 社) を用い、2,000 rpm, 60 sec の条件でスピンキャストした (Scheme 3.1)。



Scheme 3.1 Preparation of SA particle monolayer by spin-coating.

3.1.2.3 PS 粒子膜の評価

FE-SEM および AFM によって粒子膜の観察を行った。またゴニオメーターを用いて inverted bubble 法によって静的接触角の測定を行った。

3.2.1 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の培養

3.2.1.1 溶液の調製

PBS(-)および PBS(+)の作製、細胞培養メディウム、コラーゲン溶液の調製、トリプシン溶液の調製については 2.1.5.2 を参照。

3.2.1.2 HUVEC の培養方法

基本操作は 2.1.5.3 を参照。

3.2.2 細胞シートの作製条件の検討

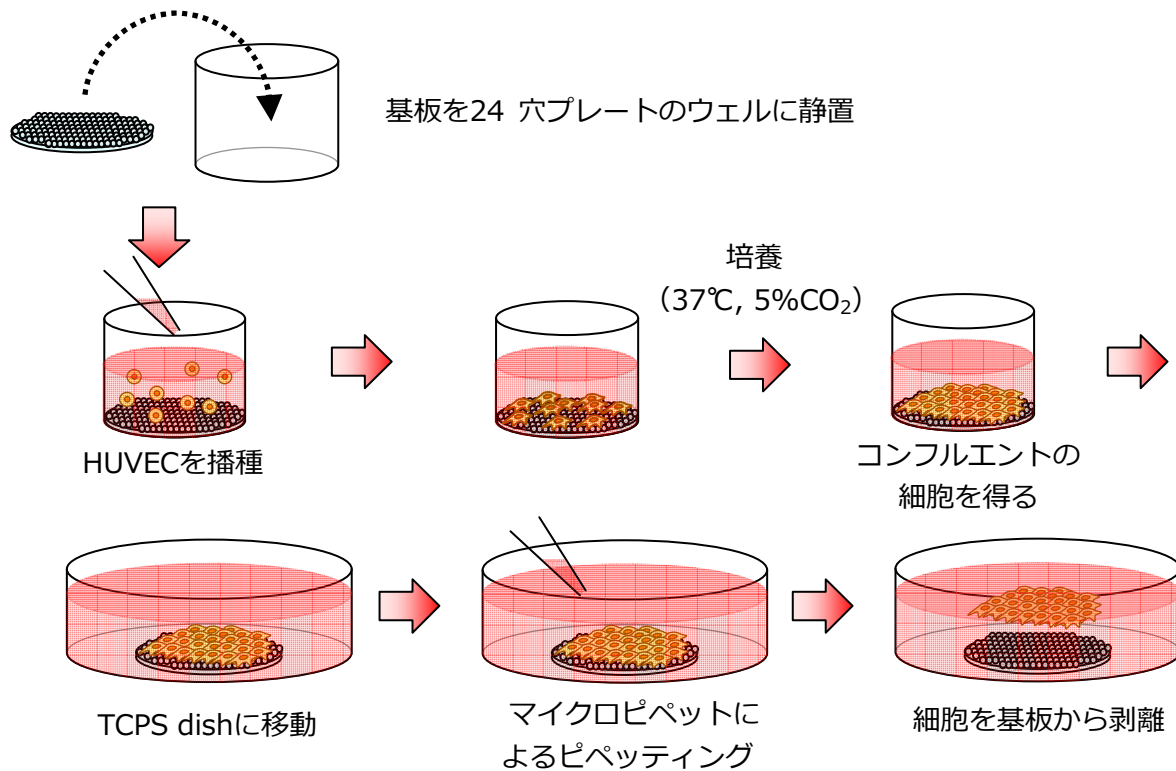
細胞シートを作製できる培養条件を検討するため、基板の種類、細胞の播種密度、培養期間、タンパク質 (FN および BSA) コーティング処理の有無などを検討した。ここでは大別して 2 種類の培養法について検討した。播種直後から既にコンフルエントに近い細胞密度で比較的短時間培養した後に細胞シートを剥離する高密度培養法と、少数の細胞をコンフルエントに達するまで増殖させた後に剥離させる低密度培養法である。

3.2.2.1 高密度培養法による細胞シートの作製

TCPS プレート (正方形、10 mm×10 mm にカットしたもの) または単層粒子膜 (φ15 mm 円形カバーガラス上に累積させたもの) を 24 穴プレートの各ウェル内に静置し、HUVEC を 2.0×10^5 cells/cm² となるように播種した。一定時間 (48 h 以内) 培養してコンフルエントの状態の細胞を得た。その後、基板を細胞培養メディウム 3.0 mL の入った PS dish にピンセットを用いて移動させた。基板に接着した細胞単層に対してマイクロピペットを用いてピペッティングを行うことにより、細胞シートの剥離を試みた。

3.2.2.2 低密度培養法による細胞シートの作製

単層粒子膜を 24 穴プレートの各ウェル内に静置し、HUVEC を 5.0×10^4 cells/cm² となるように播種した。一定時間 (1~7 d) 培養してコンフルエントの状態の細胞を得た。その後、基板を細胞培養メディウム 3.0 mL の入った PS dish にピンセットを用いて移動させた。基板に接着した細胞単層に対してマイクロピペットを用いてピペッティングを行うことにより、細胞シートの剥離を試みた。



Scheme 3.2 Preparation of cell sheet using a particle monolayer.

3.2.3 免疫染色による細胞単層および細胞シートの評価

3.2.3.1 免疫染色による細胞-細胞間接着の観察

2.1.7 と同様の方法で染色し、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡にて観察を行った。

3.2.3.2 免疫染色による ECM 分布の観察

ここでは一次抗体として抗ヒトフィブロネクチンマウス IgG 抗体および抗ヒト IV 型コラーゲンマウス IgG 抗体を用いており、それぞれ 1wt% BSA-PBS 溶液での希釈倍率は 1:200 および 1:100 である。

3.2.4 細胞シートのサイズについての定量的評価

作製した細胞シートの大きさについて画像解析ソフトウェア (SigmaScan Pro, Systat Software Inc., USA) を用いて評価した。

3.2.5 細胞シートの TCPS に対する再接着

剥離した細胞シートを新しい TCPS dish に移して静置し、再接着までに要する時間を調べた。ここでの再接着とは、細胞シート全体が dish の底面に接着し、振とうやピペッティングなどによって剥離しない状態のことを指す。また再接着後の細胞の生存を調べるために播種後 24 h における細胞の形態を光学顕微鏡にて観察した。

3.2.6 細胞剥離後の基板の観察

細胞シートを剥離させた後の基板の様子を光学顕微鏡および FE-SEM によって観察した。

3.2.7 トリパンプルー排除法を用いた細胞生存率の評価

トリパンプルーは Figure.3.1 に示す化学構造を持った深青色の色素であり、タンパク質と強く結合する。トリパンプルーには、生細胞内には取り込まれないが死細胞内には取り込まれるという性質がある。これは死細胞の細胞膜が損傷

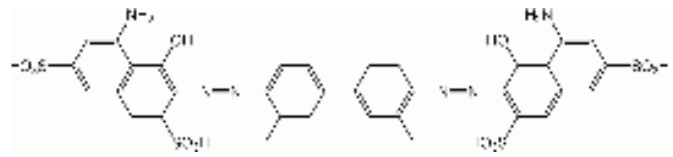
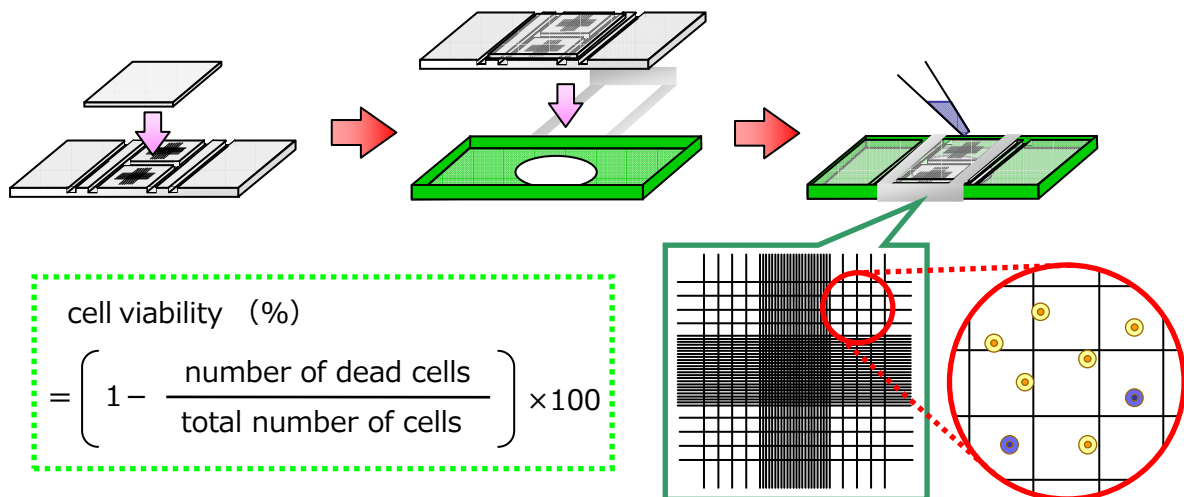


Figure 3.1 Structure of trypan blue.

しているためにその物質透過性が生細胞と比較して高いためである。この性質を利用して死細胞のみを染色することで、サンプル中の死細胞と生細胞を顕微鏡下で判別することが可能である。これがトリパンプルー排除法と呼ばれる細胞生存率の定量的評価法の原理である。この方法の利点はその操作の簡便さにある。ただし生細胞であっても時間の経過と共にトリパンプルーによる染色が進行するため、正確な測定には熟練を要する。

実際の実験操作を以下に示す。培養した細胞および細胞シートをトリプシン溶液によって再分散させた。そして細胞懸濁液 20 μL とトリパンプルー溶液 20 μL を混合した後、混合溶液 20 μL を血球計算盤に注入して細胞数を手動計測した。このとき青色に染色された細胞を死細胞としてカウントし、細胞生存率を算出した。



Scheme 3.3 Trypan blue exclusion test of cell viability.

3.2.8 乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) アッセイによる細胞生存率の評価

乳酸脱水素酵素 (LDH) は代謝経路の 1 つである解糖系における乳酸 \leftrightarrow ピルビン酸の酸化還元反応を触媒する酵素であり、ほぼ全ての組織・臓器内に存在している。そのため LDH を定量することによって細胞数を算出する手法が広く用いられている。また、細胞が細胞膜に障害を受けると LDH が細胞外に漏出するため、漏出 LDH 量を測定することによって死細胞数の定量を行うことも可能である。本実験では市販の LDH アッセイキット (Colorimetric Cytotoxicity Assay Kit, Oxford Biomedical Research Inc., UK) を用いて細胞シートの細胞生存率の評価を行うことを試みた。これは①マイクロピペットによるピペッティング、②基板からの剥離という 2 つの過程において、物理的要因による細胞死を定量的に評価することを目的としている。

このLDH アッセイキットの原理を以下に示す。まず、細胞から放出されたLDHによって乳酸がピルビン酸に酸化される。このときニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) が NADH に還元される。テトラゾリウム塩である2-(4-イオドフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウム塩酸塩 (INT) は NADH によって直ちに還元されて赤色ホルマザンに変化する。生成したINTホルマザンの492 nmの吸光度を測定することによって細胞数を定量する。

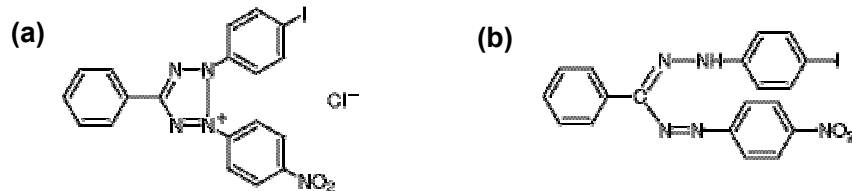
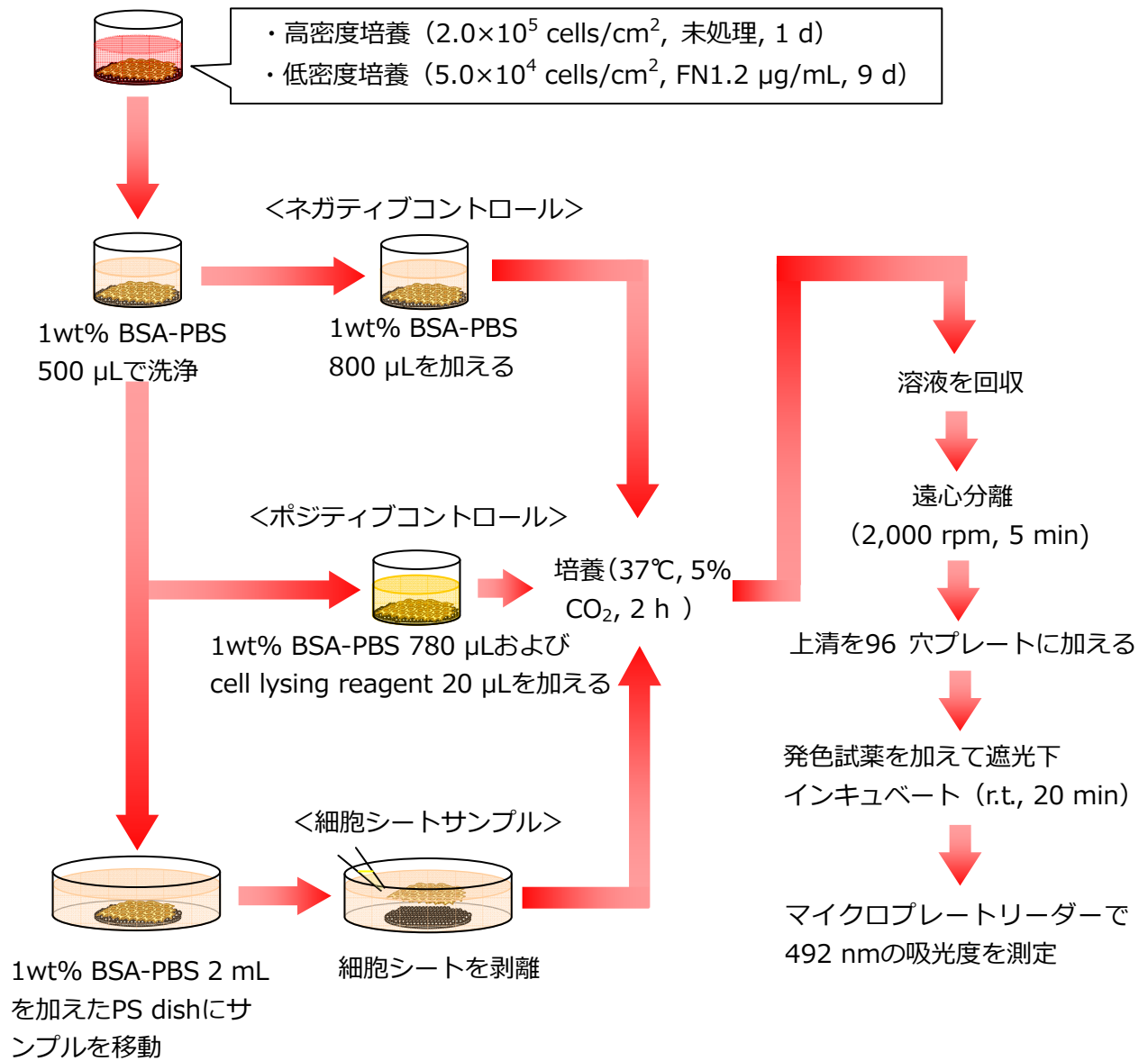


Figure 3.2 Structures of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) (a) and INT formazan (b).

具体的な実験操作は以下の通りである (Scheme 3.4)。培養したサンプルを 1wt% BSA-PBS 500 μL で 2 回洗浄した。ここから、ネガティブコントロール用サンプル、ポジティブコントロール用サンプル、細胞シートサンプルの 3 種類についてそれぞれ異なる操作を行った。まずネガティブコントロール用サンプルでは、1wt% BSA-PBS 800 μL を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 雰囲気下で 2 h 培養を行った。ポジティブコントロール用サンプルでは、細胞を溶解して内部の LDH を全て外液に漏出させるために、1wt% BSA-PBS 780 μL および cell lysing reagent 20 μL を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 雰囲気下で 2 h 培養を行った。細胞シートサンプルでは、あらかじめ 1wt% BSA-PBS 2.0 mL を加えた PS dish にサンプルを移動させ、その後マイクロピペットによるピペッティングによって細胞シートを剥離させた。そして細胞シートが浮遊した状態のまま 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 雰囲気下で 2 h 培養を行った。インキュベート後、溶液をマイクロチューブ (オートクレーブ滅菌済) に回収して遠心分離 (2,000 rpm, 5 min) を行い、上清 100 μL を 96 穴プレートに加えた。さらに各ウェルに substrate mixture (基質および発色試薬の混合溶液) を 100 μL 添加し、室温で遮光下 20 min インキュベートした。サンプルの呈色を確認後、マイクロプレートリーダー (MPR) で 492 nm におけるホルマザンの吸光度を測定し、測定値から細胞シートにおける細胞生存率を算出した。



Scheme 3.4 Detection of cell viability of a cell sheet by LDH cytotoxicity assay.

3.2 結果および考察

3.2.1 PS 粒子の作製および評価

<TEM による粒子径の測定>

作製した PS 粒子の TEM 写真を Figure 3.3 に示す。また重合組成および粒子径を Table 3.1 に示す。PS 粒子では NaCl の添加量を 0~0.2 g まで変化させることによっておよそ 400 nm から 1.4 μm まで粒子径を制御することができた。SA 粒子の重合と比較すると、PS 粒子の重合の方が NaCl の効果は大きいことがわかった。

<ゼータ電位の測定>

それぞれの粒子のゼータ電位を測定したところ、SA 粒子よりも強く負に帯電していることがわかった (Table 3.1)。

3.2.2 スピンコートによる単層粒子膜の作製

<溶媒置換について>

実験において作製した粒子の分散媒は蒸留水であるが、単層粒子膜を作製する前に分散媒を水からエタノールに置換した。分散媒が水とエタノールでスピンコートしたものをそれぞれ作製して比較すると、エタノールに置換した方がより多くの粒子が dish 上に配列した。その原因として 2 つの要因が考えられる。

①水 (分散媒) と基板の親和性の低さ

SA 粒子の表面は親水性 (AAm ドメインの寄与) なのに対し、PS dish 表面は疎水性である。後述する静的接触角の測定結果 (Table 3.7) は、PS dish に対する水の接触角は 81.9° で、PS dish は水と親和性が低いことを示している。したがって均一な水の液体薄膜 (液膜) が形成されにくい。

②水の飽和蒸気圧の低さ

水は蒸気圧が低く、速やかに蒸発しない。そのため大部分の水はスピンコートの遠心力によって除去しなければならなくなり、スピンコートの途中で液滴が形成されやすくなってしまふ。

そこで分散媒を蒸留水からエタノールに置換することにより、液体薄膜を形成させることを試みた。エタノールは水よりも低い表面張力 (22.55 mN/m , 20°C) と高い蒸気圧 (43.89 mmHg , 20°C , 水の蒸気圧 17.51 mmHg) を有し、上述の問題点を解決できると予想された。

また作製した粒子の表面は開始剤 KPS 由来の硫酸基- SO_4^- を有している。この負電荷による静電反発力がラテックスの分散安定性に貢献しているが、粒子の結晶構造を作製する際にはこの静電反発力が障害となる。分散媒をエタノールに置換すると、硫酸基の解離度が低下し、粒子の静電反発力は抑制されると考えられる。

<粒子の沈降速度について>

いま、半径 r 、密度 ρ の球状粒子が密度 ρ' の媒質中にあり、下向きに沈降し始める場合を仮定する。この粒子に働く正味の力 F は、重力と浮力を差し引きして、次のように表される。

$$F = 4/3\pi r^3(\rho - \rho')g \quad (3.1)$$

力 F で粒子の沈降が加速され、速度が次第に大きくなると、それに比例して媒質から受ける抗力 R も大きくなる。そして、最終的に F と R が釣り合った時点で粒子は一定速度 V で沈降するようになる。Stokes は、この場合、抗力 R は次式で表せることを示した。

$$R = 6\pi\eta' rV \quad (3.2)$$

ただし、 η' は媒質の粘度である。(3.1) (3.2) の両式で $F=R$ とすると、最終速度 V を次の Stokes の式で知ることができる。すなわち、

$$V = 2/9 \times r^2(\rho - \rho')g/\eta' \quad (3.3)$$

したがって、この式から、粒子の大きさが 2 倍になると沈降速度は 4 倍になり、単層粒子膜を作製する際のインキュベーション時間は 1/4 になることが予想される。

<単層粒子膜の作製機構>

ここではラテックスを PS dish に滴下してから単層粒子膜が形成するまでの機構について説明する。本実験では、PS dish に PS ラテックスを滴下してから数時間ほど静置した。この間に粒子は重力により自然沈降し、PS dish 表面に堆積する。このとき PS dish と直接接触している 1 層目の粒子はパッキングされてゆく。引き続き 2 層目の粒子もパッキングされてゆくが、スピコートすることによって遠心力がかかり、2 層目の粒子がパッキングされてしまう前に溶液ごと除去してしまうと、1 層目の粒子以外の余分な粒子を除去することができる。スピキャストの過程で溶媒であるエタノールは余分な粒子と共に除去され、その一方で PS dish 上に残ったエタノールは蒸発して粒子間に薄膜が形成されるため、密にパッキングされた単層粒子膜が形成されると考えられる。

3.2.2.1 光学顕微鏡による単層粒子膜の観察

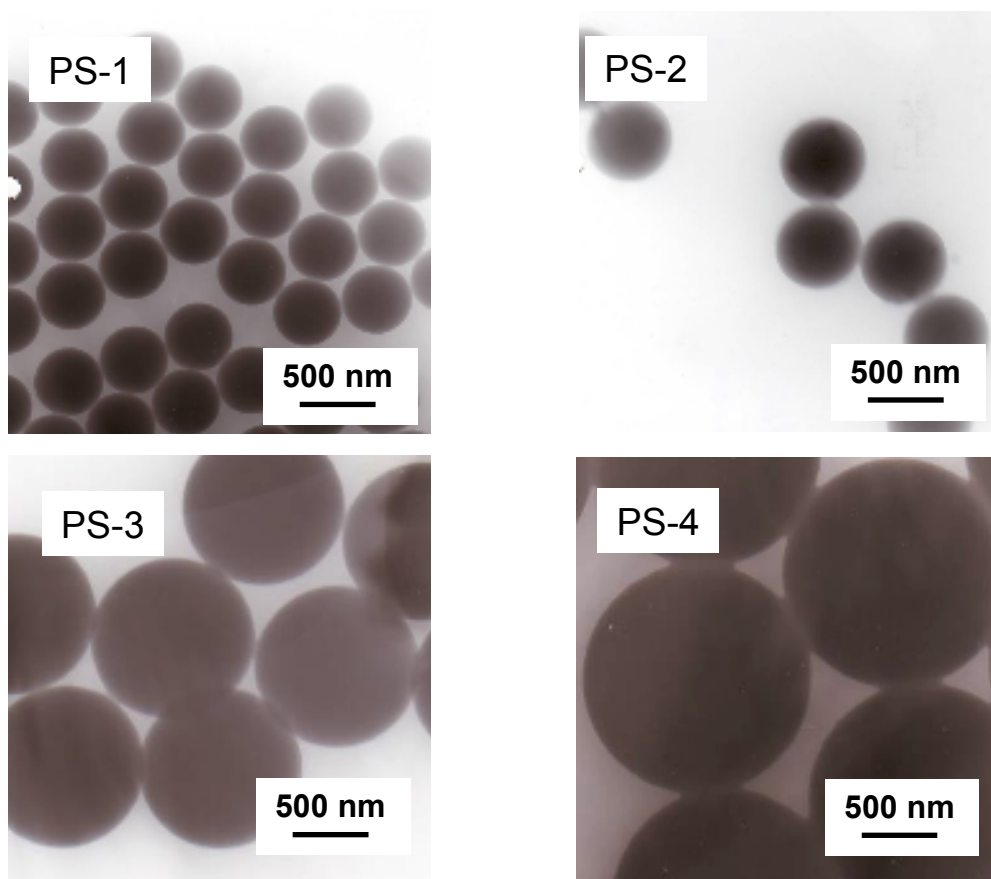
スピコート法で単層粒子膜の作製を行った。ここではラテックスの濃度を 2.0, 2.5 および 3.0wt% に調整し、PS dish に滴下してから 5, 6, 7 および 8 h インキュベートした。上記と同様に 2,000 rpm でスピコートを行い、粒子膜を作製した。光学顕微鏡で観察した画像を Figure 3.4 に示す。これらの条件で最も単層粒子膜が作りやすい条件は、2.5wt% で 6 h または 7 h インキュベートした場合であった。

3.2.2.2 FE-SEM による単層粒子膜の観察

熱処理 (100°C, 30 min) を行った PS-2 粒子膜と熱処理前の粒子膜の比較を行うために、まず FE-SEM によって観察を行った (Figure 3.5)。まず未処理の PS 粒子膜は、PS 粒子が PS dish 上に均一に配列していることがわかった。そして熱処理を行うと、隣接する粒子同士が融着していたものの、粒子膜全体の凹凸構造は保たれていることがわかった。

Table 3.1 Characteristics of PS particles prepared by soap-free emulsion polymerization.

| code | St / g | H ₂ O / g | KPS / g | NaCl / g | dried particle diameter / nm | D _w /D _n | ζ-potential / mV |
|------|--------|----------------------|---------|----------|------------------------------|--------------------------------|------------------|
| PS-1 | 10.0 | 120.0 | 0.1 | — | 414 | 1.000 | -18.33 |
| PS-2 | 10.0 | 120.0 | 0.1 | 0.025 | 532 | 1.004 | -15.67 |
| PS-3 | 10.0 | 120.0 | 0.1 | 0.1 | 968 | 1.000 | -20.43 |
| PS-4 | 10.0 | 120.0 | 0.1 | 0.2 | 1370 | 1.000 | -19.54 |

**Figure 3.3 TEM photos of PS particles.**

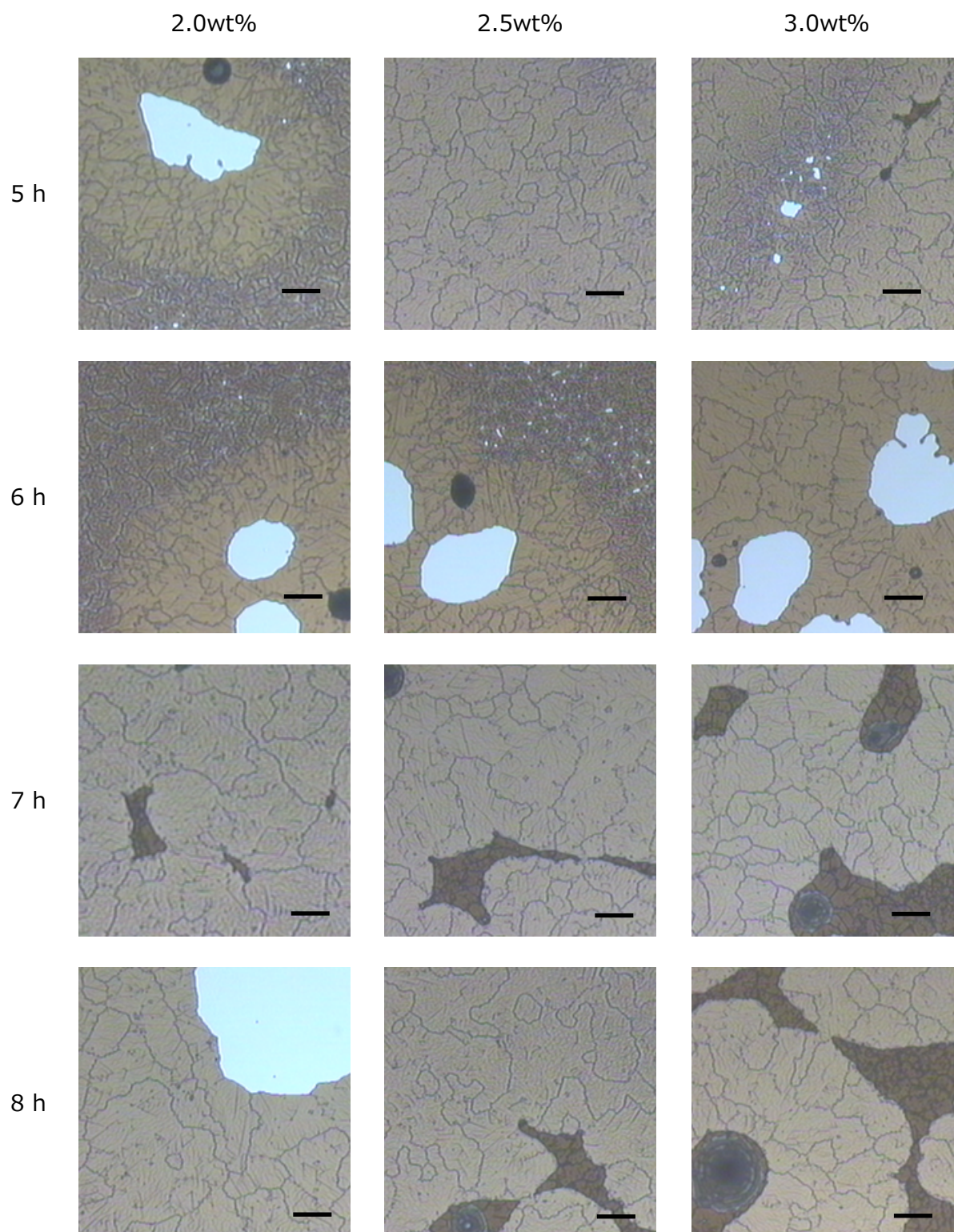


Figure 3.4 Optical micrographs of PS-2 particle monolayer fabricated by spin-coating 2.0, 2.5 and 3.0wt% PS latex on PS dish after 5, 6, 7, and 8 h-incubation. Scale bars indicate 10 μm .

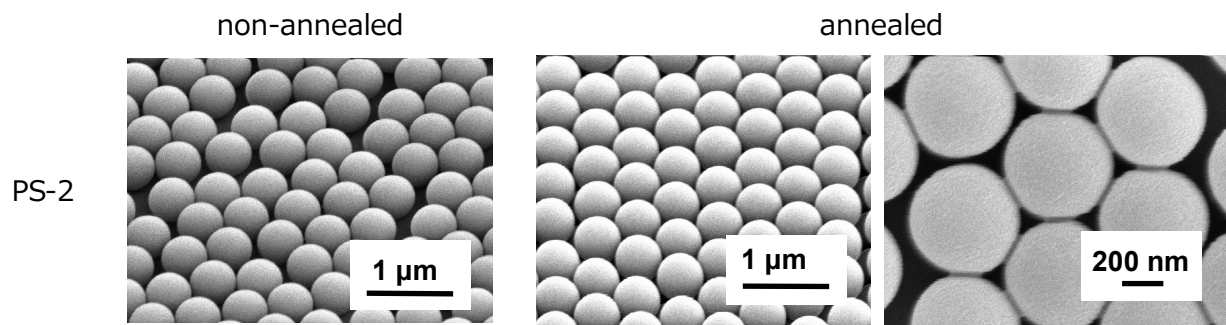


Figure 3.5 FE-SEM images of PS-2 particle monolayer before and after annealing.

3.2.2.3 AFMによる単層粒子膜の観察

AFMによってPS-2粒子膜の観察を行った (Figure 3.6)。その結果、SA粒子と同様に、AFMで測定した粒子間距離はTEMから算出した粒子径よりも約1.4倍大きくなった (Table 3.2)。この補正係数を用いて熱処理後のPS-2粒子膜の粒子間距離を算出すると、540 nmとなった。したがって熱処理後も粒子膜の凹凸のピッチには大きな変化はないことがわかった。

Table 3.2 Diameters of PS particle measured by TEM and AFM.

| | diameter / nm | | AFM/TEM |
|------|---------------|--------|---------|
| | TEM | AFM | |
| PS-2 | 532±22 | 750±10 | 1.41 |

3.2.2.4 静的接触角の測定

PS-2粒子膜の静的接触角の測定を行ったところ、 $57.3 \pm 1.1^\circ$ であった。これはSA粒子膜の接触角よりも大きい (Table 2.9 参照)。したがってPS粒子はSA粒子よりも疎水性が高いことがわかった。これはPS粒子がStのみで構成されているのに対し、SA粒子は表面に親水性のAAmドメインが存在するためである。

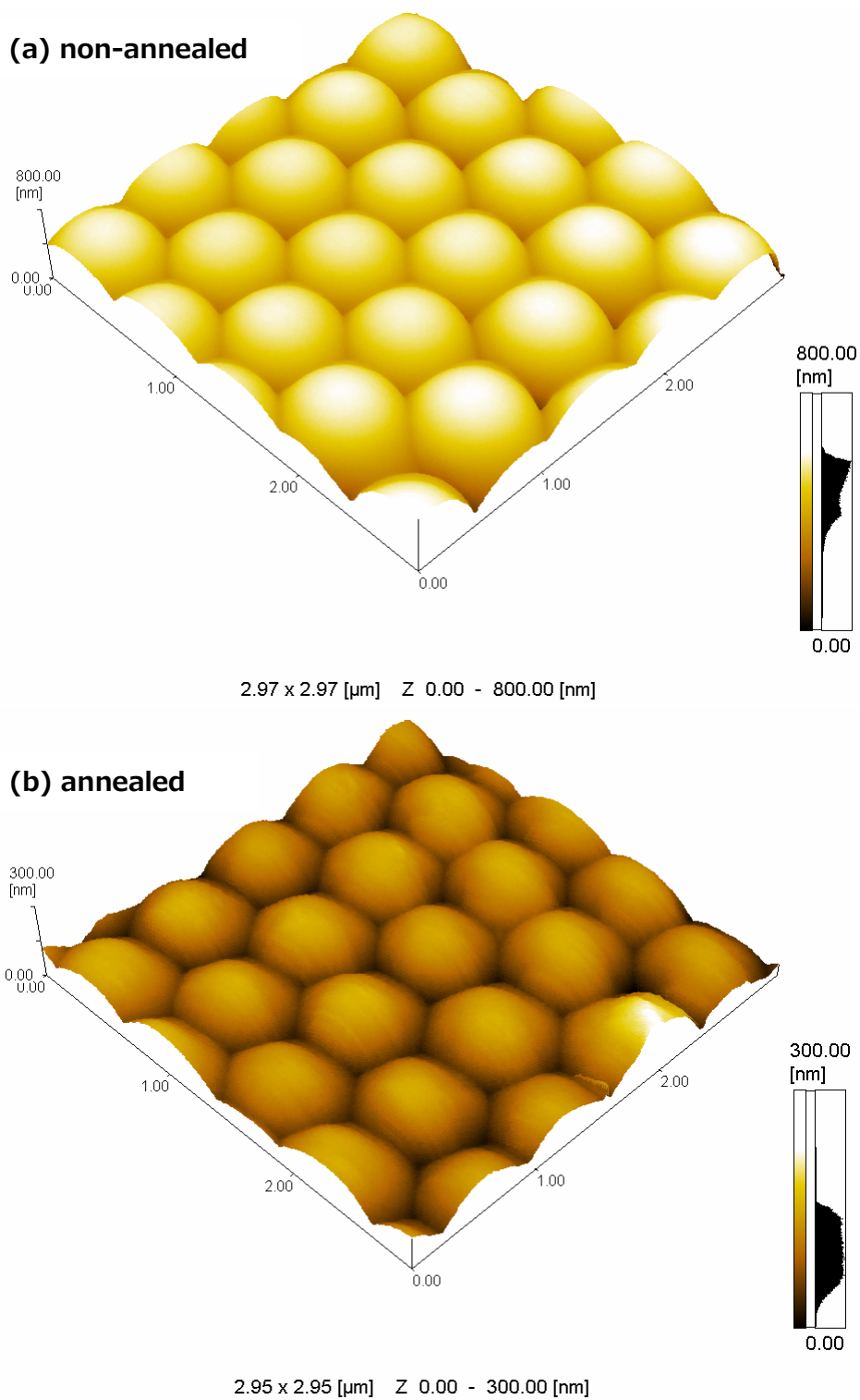


Figure 3.6 AFM images of PS-2 particle monolayers.

3.2.3 細胞剥離性の検討

ここでは細胞が基板から剥離するかどうか調べた。培養時間、タンパク質のコーティング、または播種密度による影響を調べた。またそれぞれ条件における細胞の形態を光学顕微鏡によって観察した結果を Figure 3.7~3.9 に示す。

3.2.3.1 高密度培養法による細胞シートの作製

ここでは2種類の細胞播種密度 2.0×10^5 cells/cm² および 3.0×10^5 cells/cm² の条件で細胞を24 h 培養した。それぞれの基板における細胞剥離性を、マイクロピペットを用いたピペッティングを行うことによって調べた。

<細胞播種密度 2.0×10^5 cells/cm²>

未処理の場合および FN コートした場合 (1, 10 および 50 µg/mL) についてそれぞれ細胞剥離性を調べた (Table 3.3)。

・未処理の場合 (Figure 3.7)

(a) TCPS

細胞は均一に接着してコンフルエントの状態になったが、細胞をピペッティングによって一枚のシートとして剥離させることは困難であった。剥離したとしても完全な細胞シートではなく、細胞組織の小片が得られるのみであった。これは細胞が基板に対して強固に接着しているためであると考えられる。

(b) SA527 粒子膜

TCPS と同様に細胞がコンフルエントの状態であった。ピペッティングを行ったところ、ミリメートルスケールのシート状の細胞組織が基板から剥離した。TCPS に比べてよりも細胞との接着が弱いためだと考えられる。

(c) SA1270 粒子膜

細胞は基板に接着したが、細胞単層は不均一であり、コンフルエントには達していなかった。ピペッティングすると細胞は部分的に剥離した。SA1270 粒子膜上の細胞は細胞-細胞間接着が弱く、均一な細胞単層が形成されなかったためであると考えられる。また2章で述べたように SA1270 粒子膜上の細胞は粒子膜の裏側まで仮足を伸展させ、基板に対して細胞が固定化されるために剥離しにくいと考えられる。

(d) PS-2 粒子膜

細胞は基板に伸展し、コンフルエントの状態であった。ピペッティングを行うことによって細胞は部分的に剥離したが、細胞が基板に対して強く接着していたために、ほとんどの細胞は剥離しなかった。PS 粒子は SA 粒子と比較して疎水性であり、タンパク質および細胞が付着しやすく、一度付着すると剥離しにくいとめだと考えられる。

・FN コートした場合 (Figure 3.8)

FN 濃度 1, 10 および 50 µg/mL の場合について細胞剥離性を検討した。しかし TCPS, SA527 粒子膜, SA1270 粒子膜および PS-2 粒子膜のいずれの基板においても細胞は剥離しなかった。これは基板に吸着させたフィブロネクチンが細胞-基板間接着を促進したためだと考えられる。

以上の結果をまとめると、細胞シートを作製するためには細胞に対して適度な接着性を持った未処理の基板を用いるのが最適であると考えられる。

<細胞播種密度 3.0×10^5 cells/cm² (Figure 3.9)>

次に、未処理の基板を用いて、細胞播種密度を 2.0×10^5 cells/cm² から 3.0×10^5 cells/cm² に変化させた場合にどのような変化が起こるかを調べた (3.0×10^5 cells/cm² という細胞密度は細胞播種直後に細胞形態が球状のままコンフルエントに達する密度)。結果を Table 3.3 に示す。

(a) TCPS

播種密度 2.0×10^5 cells/cm² の場合と同様に、 3.0×10^5 cells/cm² の場合も細胞はほぼ均一に接着した。しかし細胞は全く剥離しなかった。

(b) SA527 粒子膜

細胞は均一に接着し、ピペッティングによってほぼ完全な一枚膜の細胞シートが得られた。

(c) SA1270

非常に高い細胞播種密度にも関わらず、24 h 培養後において細胞単層は不均一で、細胞の疎密が観察された。これは SA1270 粒子膜上では細胞の移動や伸展が抑制されているためだと考えられる。細胞は全く剥離しなかった。

(d) PS-2 粒子膜

細胞は基板に伸展し、コンフルエントの状態であった。しかしピペッティングを行っても細胞は剥離しなかった。

細胞播種密度を 2.0×10^5 cells/cm² から 3.0×10^5 cells/cm² へ増加させることによって細胞シートが作製しやすくなるのではないかと予想していたが、逆に細胞が剥離しにくくなる傾向が観察された。したがって、高密度培養における細胞シート作製には細胞播種密度 2.0×10^5 cells/cm² が適していることがわかった。

3.0×10^5 cells/cm² という密度は、細胞が球状のままコンフルエントに達する細胞密度であるため、細胞が基板上に伸展しなくても隣接する細胞と細胞間接着を形成できることになる。ここで考えられることは、①基板に接着できない細胞（細胞の上に接着する細胞）がいる可能性があること、②基板上に細胞が多数存在するため、細胞の移動が抑制されることである。そのため細胞-細胞間接着および細胞-基板間接着のバランスが 2.0×10^5 cells/cm² と大きく異なっている可能性がある。

Table 3.3 Formation of a cell sheet 24 h after incubation. Cells were seeded with the density of 2.0×10^5 cells/cm² and 3.0×10^5 cells/cm².

| sample | 2.0×10^5 cells/cm ² | | | | 3.0×10^5 cells/cm ² |
|--------|---|--------------|---------------|---------------|---|
| | non-coated | FN-coated | | | non-coated |
| | | 1 μ g/mL | 10 μ g/mL | 50 μ g/mL | |
| TCPS | × | × | × | × | × |
| SA527 | ○ | × | × | × | × |
| SA1270 | × | × | × | × | ○ |
| PS-2 | × | × | × | × | × |

○ : detachable × : undetachable

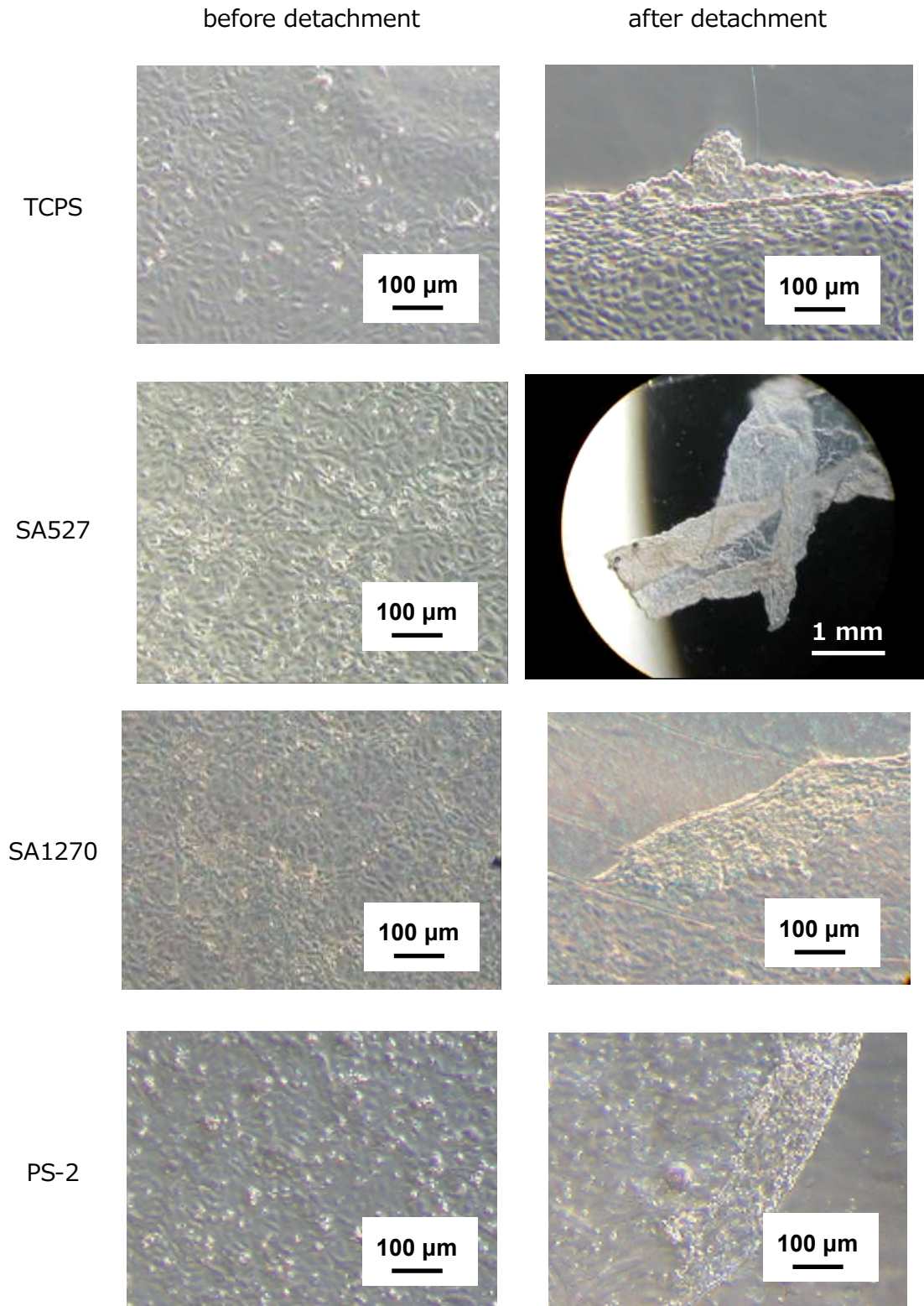


Figure 3.7 Optical microscopic images of HUVECs before and after detachment from non-coated TCPS and particle monolayers. Cells were seeded at the density of 2.0×10^5 cells/cm² and cultured for 24 h.

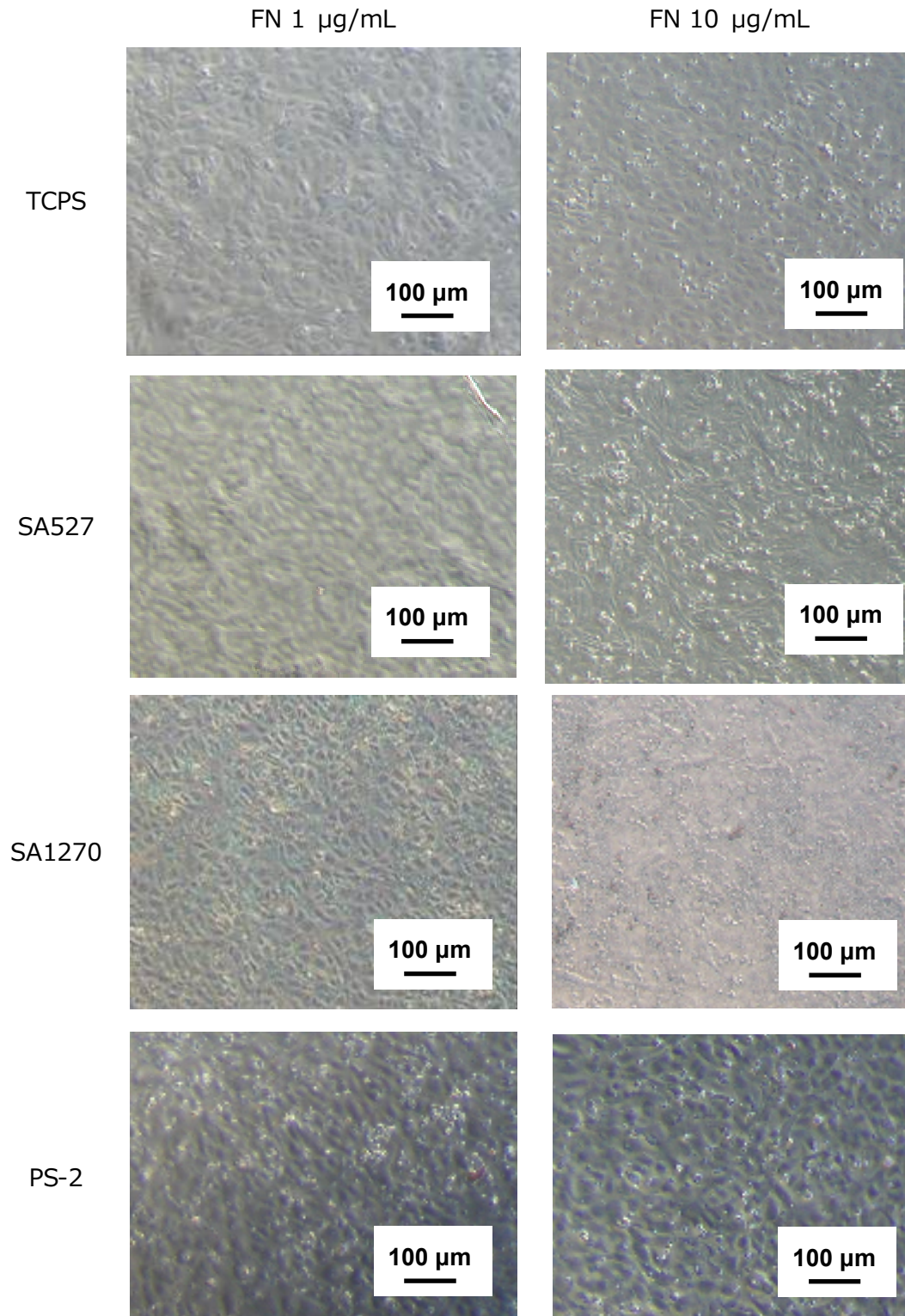


Figure 3.8 Optical microscopic images of HUVECs before and after detachment from FN-coated TCPS and particle monolayers. Cells were seeded at the density of 2.0×10^5 cells/cm² and cultured for 24 h.

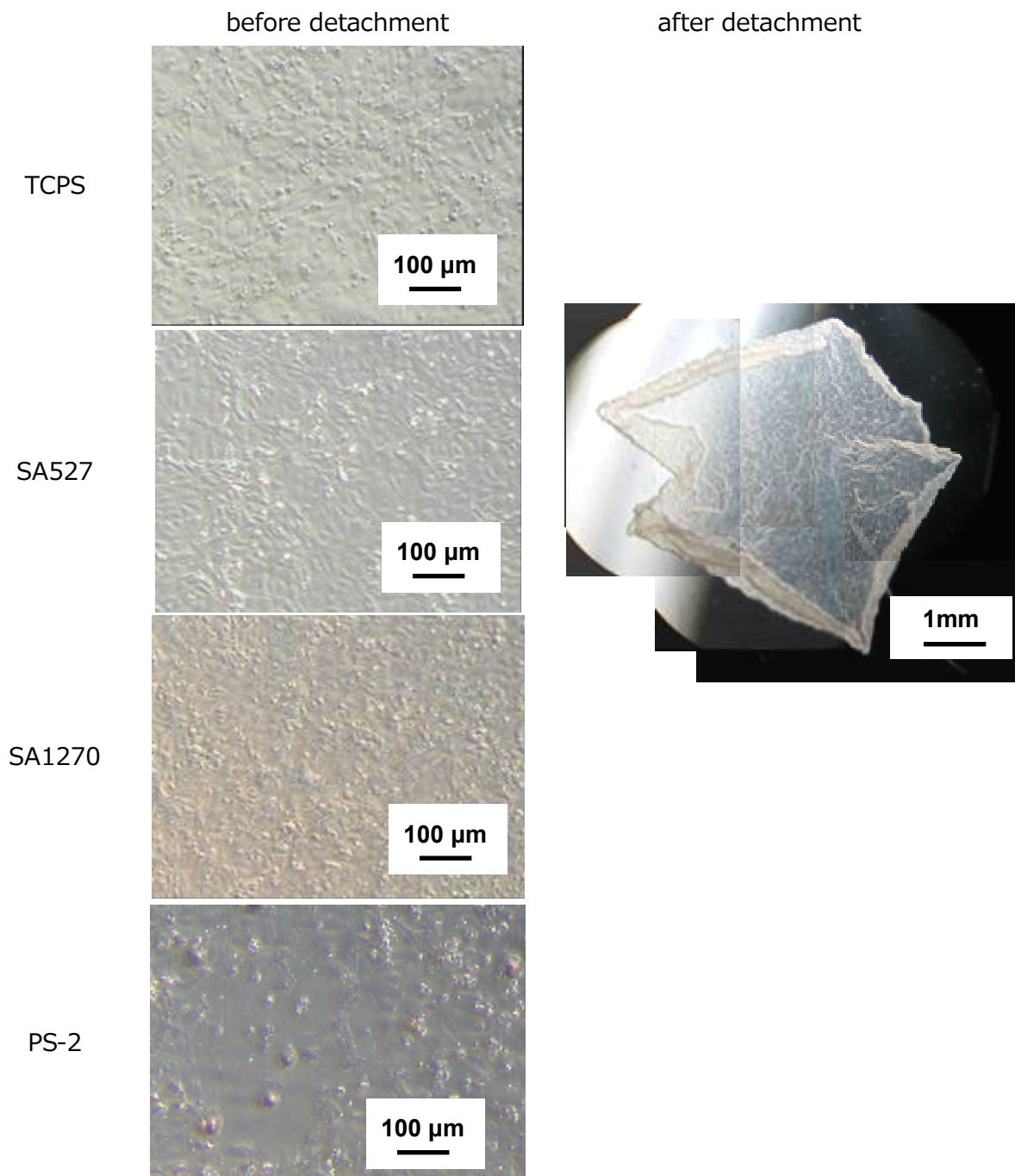


Figure 3.9 Optical microscopic images of HUVECs before and after detachment from non-coated TCPS and particle monolayers. Cells were seeded at the density of 3.0×10^5 cells/cm² and cultured for 24 h.

3.2.3.2 高密度培養法における培養時間およびFNコート濃度の検討

SA527 粒子膜は細胞の剥離性が高いことがわかったので、細胞シートの剥離性について培養時間およびFNコーティングについて詳細に検討することにした。ここでは高密度培養法を用い、播種密度 2.0×10^5 cells/cm² の場合について調べた。結果を Table 3.4 に示す。

未処理の場合において、12 h 培養後に細胞をシート状で剥離できることがわかった。培養 6 h や 9 h では細胞を剥離させようとするとき細胞シートが崩壊してしまい小片になってしまった (data not shown)。これは細胞-細胞間接着の形成が不十分だったためであると考えられる。したがって細胞-細胞間接着は細胞シートの構造を維持するために必要であるということがわかった。

次に FN コートした場合の結果について考察したい。結果からわかることは以下の2点である。すなわち今回の実験で調べた培養時間において、

- ① FN 溶液の濃度を高くすると細胞シートが剥離しにくくなること
- ② 培養時間と共に細胞が剥離しにくくなることである。

①については以下のように説明できる。まず FN コーティングによって細胞が SA527 粒子膜に対してより接着しやすくなる(細胞-基板間の相互作用が増大)。その結果、細胞の移動が活発になり、細胞-細胞間接着の形成が抑制される(細胞-細胞間接着の形成と崩壊が流動的になる)。Figure 3.10 に未処理および FN コートした場合で 12 時間培養した細胞の写真を示す。この2枚の写真と比較すると、FN コートしたときの方が個々の細胞はより広く伸展している。これは細胞-基板間接着が促進されていることを裏付ける1つの実例である。

②については現時点で説明するのは難しい。培養が進むと細胞-細胞間接着は徐々に成熟し、それに伴って細胞-基板間接着が弱くなり、かえって培養時間の経過と共に細胞が剥離しやすくなると考えられる。可能性として、細胞が基板表面だけでなく側面や裏面に接着してしまうことにより、細胞が剥離しなくなったと考えることもできる

(Scheme 3.5)。高密度培養では初期の細胞数が非常に多いため(播種直後においてほぼコンフルエントの状態)、細胞が移動するスペースはほとんどない。粒子膜と同時にガラス表面も FN コー

Table 3.4 Formation of a cell sheet on non-coated and FN-coated SA527 particle monolayers

| | | 12 h | 18 h | 24 h |
|--------------------------------------|-----|------|------|------|
| non-coated | | ○ | ○ | ○ |
| FN-coated / μg · mL ⁻¹ | 0.1 | ○ | ○ | ○ |
| | 0.2 | ○ | ○ | ○ |
| | 0.4 | × | ○ | × |
| | 0.6 | × | × | × |
| | 0.8 | × | × | × |

○ : detachable × : undetachable

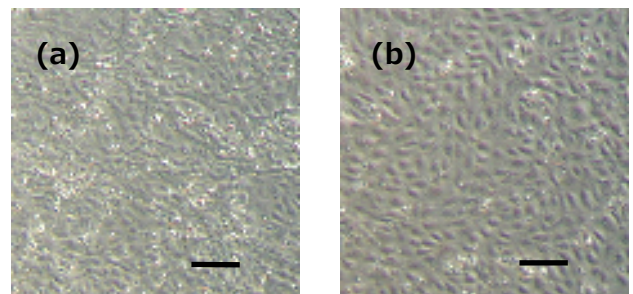
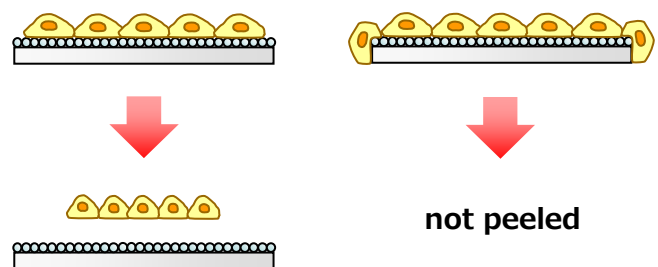


Figure 3.10 Optical microscopic images of cells adhering onto a non-coated (a) and an FN-coated (b) SA527 particle monolayers 12 h after incubation. Scale bars indicate 100 μm.



Scheme 3.5 Influence of an incubation time on formation of a cell sheet.

トされているため、細胞がより側面へ移動しやすいと考えられる。そのため高濃度の FN 溶液でコーティングした場合には細胞が剥離しなくなる。したがって培養の進行と共に基板の側面に細胞が移動すると思われる。この問題を解決するためには、粒子膜以外の場所に細胞が接着しないように処理をする必要があるだろう。細胞の付着（≒タンパク質の吸着）を抑制するためには、しばしばポリエチレングリコール（PEG）が用いられる。PEG によって細胞接着を抑制する具体的な例としては、PEG を基材表面にグラフトしたポリマーブラシ表面¹³⁾や、エチレングリコールジアクリレート（EGDA）を光開始剤によって光重合を行い、PEGDA ハイドロゲルを任意の形状でパターンニングした表面¹⁴⁾などがある。

3.2.3.3 低密度培養法による細胞シートの作製

低密度培養法は、播種密度を 5.0×10^4 cells/cm² とし、長時間培養を行うことによって細胞をコンフルエントに達するまで増殖させた後、細胞シートを剥離させることを目的として条件検討を行った。ここでは細胞シートを作製できる SA527 粒子膜のみを用い、基板の FN コート濃度および細胞の培養期間（2～7 d）を変えて培養し、ピペッティングにて細胞剥離性の検討を行った（Table 3.5）。

<未処理の場合>

未処理の SA527 粒子膜では細胞同士の相互作用が強くなり、細胞ドメインが形成された。培養期間を長くしても均一な細胞単層は得られなかった。そのため、細胞は剥離しにくく、また完全な一枚膜の細胞シートが得られなかった。

<FN コートした場合>

そこで粒子膜に対してあらかじめ FN コートを行うことにより、細胞-基板間接着を促進させ、細胞単層に疎密ができない条件を検討した。ただし 3.2.3.2 で示したように、FN コートの濃度が高すぎる場合には細胞が剥離しにくくなってしまふ。そのため、0.1～2.0 μg/mL という比較的低い濃度範囲において検討することとした。

その結果、0.2～1.0 μg/mL という濃度範囲で 7 d 培養することによって細胞シートを作製できることがわかった（Table 3.5）。作製した細胞シートの一例を Fig 3.11 に示す。FN 濃度によっては、より短い培養時間で細胞シートを作製することが可能であった。最も短い培養時間で作製できた条件は、FN 濃度 0.6 μg/mL で 4 d 培養を行った場合である。

Table 3.5 において特徴的なのは、特定の FN 濃度範囲だけにおいて細胞シートが作製できたことで

Table 3.5 Formation of a cell sheet on non-coated and FN-coated SA527 particle monolayers.

| | | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | 6 d | 7 d |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| non-coated | | × | × | × | × | × | × |
| FN-coated / μg·mL ⁻¹ | 0.1 | × | × | × | × | × | × |
| | 0.2 | × | × | × | × | × | ○ |
| | 0.4 | × | × | × | ○ | ○ | ○ |
| | 0.6 | × | × | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | 0.8 | × | × | × | × | ○ | ○ |
| | 1.0 | × | × | × | × | ○ | ○ |
| | 1.2 | × | × | × | × | × | × |
| | 1.4 | × | × | × | × | × | × |
| | 1.6 | × | × | × | × | × | × |
| | 1.8 | × | × | × | × | × | × |
| 2.0 | × | × | × | × | × | × | |

○ : detachable × : undetachable

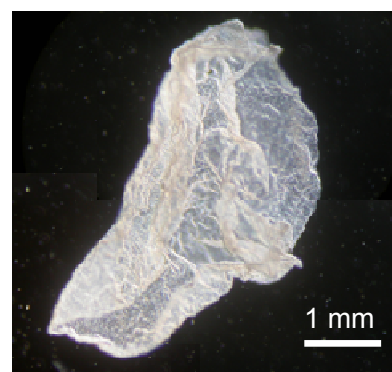


Figure 3.11 Optical microscopic image of a cell sheet.

ある。培養条件によって細胞剥離性が異なる原因として考えられることは、細胞-細胞間接着と細胞-基板間接着のバランスや、細胞数の違いである。これらの点をより深く理解するために、以降の実験を行った。

<細胞数と細胞剥離性の関係について>

細胞剥離のための必要条件を調べるために、まず細胞数と細胞剥離性の関係を調べた。ここでは TCPS と SA527 粒子膜（未処理、FN コート）について 1~7 d 培養を行い、トリプシン処理によって細胞を剥離した後、血球計算盤によって細胞数を算定した。結果を Figure 3.12 に示す。このグラフから、いずれの基板もほぼ同様の増殖性を示した。したがって同一培養日数であれば Table 3.5 におけるいずれの FN 濃度条件においても細胞数はほぼ同じであったと考えられる。7 d 培養後の細胞を光学顕微鏡で観察したところ、TCPS と FN コートした SA527 粒子膜では均一な細胞単層が得られたが、未処理の SA527 粒子膜では、細胞単層には疎密があった (Figure 3.13)。Figure 3.13b における点線部分で示したように、細胞同士が密接している部分と、細胞同士に間隔がある部分が混在していた。そのため細胞数は同じであっても、基板の状態（表面形状、FN コート濃度）によって細胞移動や細胞-細胞間接着の状態が異なると考えられる。

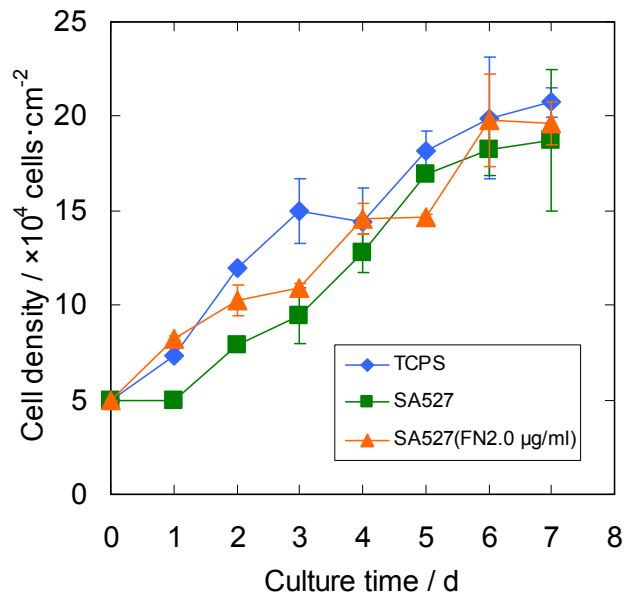


Figure 3.12 Cell proliferation on non-coated TCPS, non-coated SA527 particle monolayer, and FN-coated SA527 particle monolayer.

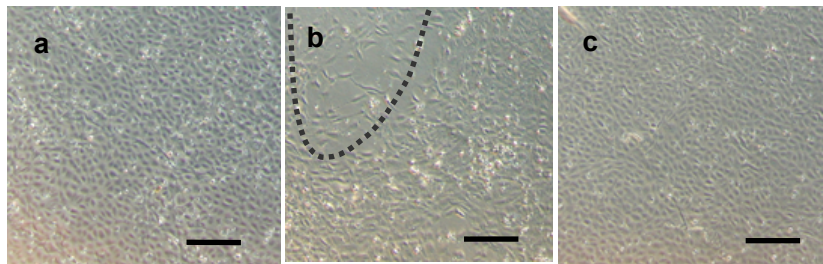


Figure 3.13 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto non-coated TCPS (a), non-treated SA527 particle monolayer (b) and FN-coated SA527 particle monolayer (c). Cells were incubated for 7 d. Scale bars indicate 100 µm.

3.2.4 免疫染色による細胞単層および細胞シートの評価

3.2.4.1 免疫染色による細胞-細胞間接着の評価

細胞-細胞間接着の評価を行うために β -カテニンの免疫染色を行った。 β -カテニンは細胞-細胞間接着を形成する膜貫通型タンパク質であるカドヘリンに対して接着する細胞内タンパク質のひとつであ

る (2.2.5.2 参照)。カドヘリンによる細胞-細胞間接着を可視化するためには β -カテニンおよびアクチンの二重染色がしばしば用いられる。

<剥離前の細胞の観察 (Figure 3.14) >

まず、各培養条件における細胞の状態を知るために、TCPS、SA527 粒子膜および FN コーティング SA527 粒子膜について細胞培養を行い、細胞-細胞間接着の観察を行った。TCPS では培養経過と共に徐々に細胞数が増加し、結果的に細胞-細胞間接着が形成されていることがわかる。一方、未処理の SA527 粒子膜では細胞数の少ない培養初期の時点で既に緊密な細胞-細胞間接着が形成されており、培養時間が長くなっても変化は見られない。これは 2 章でも確認した通りである。一方、FN コートした SA527 粒子膜では FN 溶液の濃度によって細胞は異なる挙動を示した。培養初期における細胞-細胞間接着の形成は、未処理 > FN 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ > FN 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \approx FN 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \approx TCPS となった。FN をコーティングすることによって基板の細胞親和性が増大し、細胞-基板間接着が細胞-細胞間接着に対して優勢になったことが考えられる。また FN コートした SA527 粒子膜の場合には、培養の経過 (2 d \rightarrow 6 d) に伴って細胞数が増加し、徐々に細胞-細胞間接着が発達した。第 2 章では FN コートを行うことによって、細胞接着に対する粒子膜の凹凸構造の影響が失われる (細胞-細胞間の強固な相互作用が失われる) ことを示したが、本実験で用いた FN 溶液の濃度範囲においては凹凸構造の影響が失われていないことがわかった。これは比較的低濃度の FN が粒子膜に対して吸着しているために、細胞移動が適度に促進されたためだと考えられる。

<細胞シートの観察 (Figure 3.15) >

続いて、細胞シートの観察を行った。高密度培養および低密度培養で作製した細胞シートについて細胞-細胞間接着の形成を観察した。どちらの細胞シートにおいても細胞の形状は球状であり、細胞が剥離に伴って収縮していることがわかった。また β -カテニンおよびアクチンが細胞の辺縁部に局在していることもわかった。このことから細胞シートは基板から剥離した後も細胞-細胞間接着を維持していることがわかった。

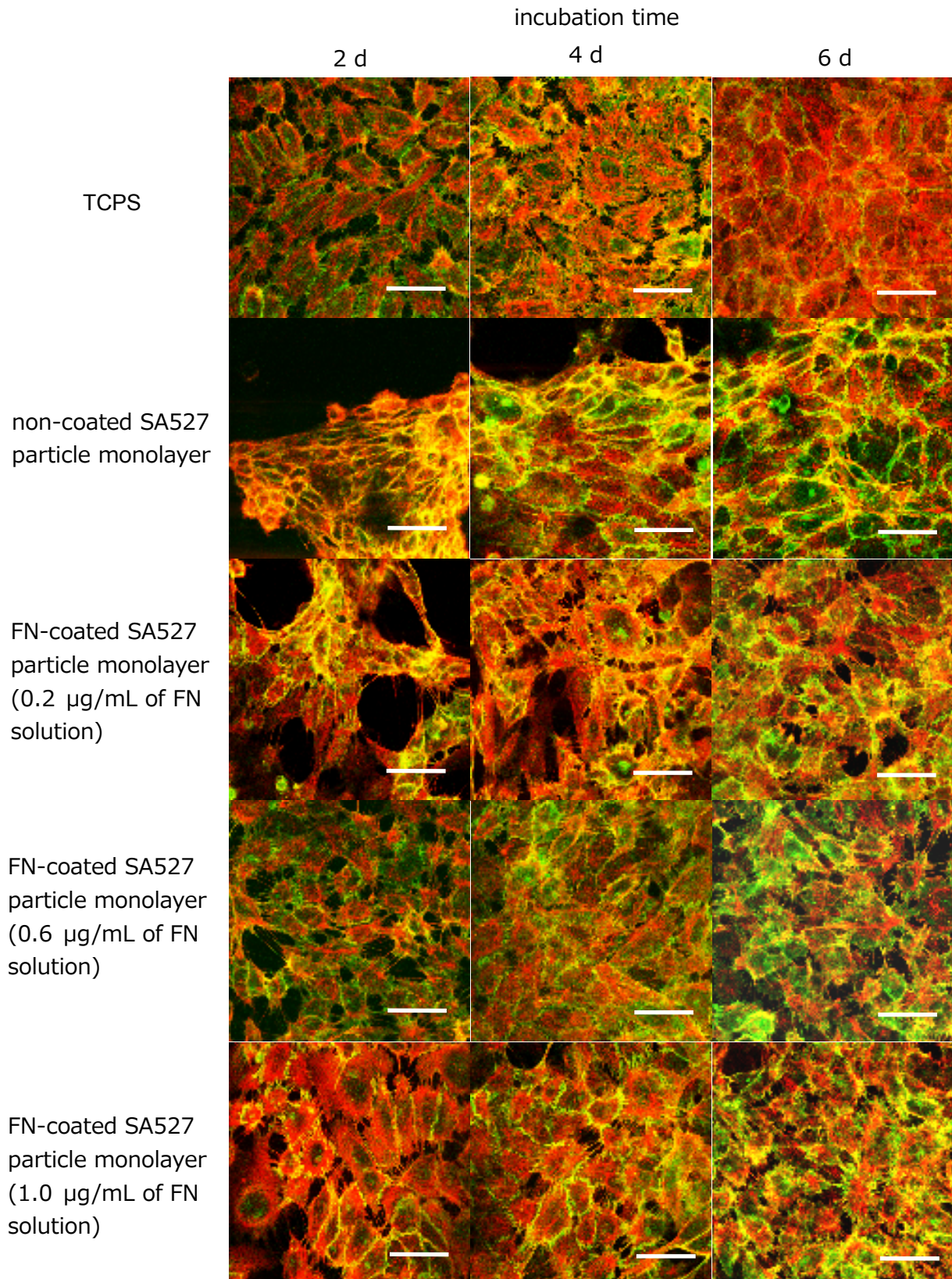


Figure 3.14 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and β -catenin (green) of HUVECs. All scale bars indicate 50 μ m.

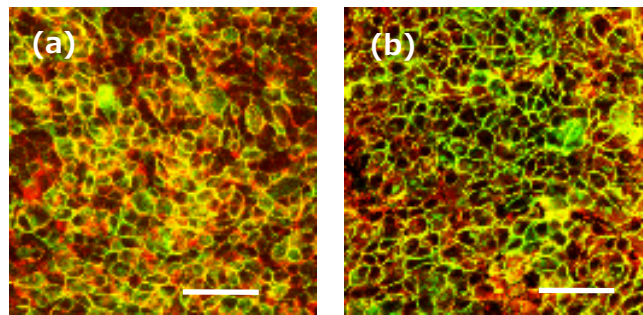


Figure 3.15 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and β -catenin (green) of cell sheets. Cell sheets were prepared by high cell density culture (2.0×10^5 cells/cm², non-coated, 1 d) (a) and low cell density culture (5.0×10^4 cells/cm², FN 0.8 μ g/mL, 6 d) (b). Scale bars indicate 50 μ m.

3.2.4.2 免疫染色による ECM 剥離性の評価

次に細胞シートの質的評価、すなわち組織移植片として実際に利用可能であるかを調べた。Okanoらは、温度応答性培養皿によって作製した細胞シートは剥離後も培養中に分泌された ECM を保持していたと報告している⁵⁾。ECM は細胞機能を発現するためだけでなく、移植に用いる際にホスト組織に対して接着するのを促進する働きを担っている。温度応答性培養皿で作製した細胞シートが5分以内に組織に対して接着することも報告されている³⁾。ここではまず単層粒子膜によって作製した細胞シートが ECM を保持しているかどうかを確認するため、細胞自身が分泌した FN および IV 型コラーゲンを観察した。

<接着細胞および剥離した細胞シートの水平断面の観察 (Figure 3.16-3.21) >

細胞剥離前後で ECM がどのように分布しているのかを調べるため、①剥離前の細胞（基板に接着した状態）、②剥離した細胞シート、および③細胞剥離後の基板についてそれぞれアクチンおよび ECM を染色して観察した。

SA527 粒子膜における高密度培養では FN および IV 型コラーゲンの分泌量が少ないが、細胞の剥離に伴って ECM も基板から剥離することがわかった (Figure 3.16,3.17)。SA527 粒子膜における低密度培養では FN および IV 型コラーゲンの分泌量は多くなった (Figure 3.18,3.19)。これは播種したときの細胞数は少ないが、培養日数が1週間と長くなるため、ECM が堆積されたと考えられる。また低密度培養においても ECM は細胞と共に剥離していることがわかった。比較として PS-2 粒子膜において低密度培養を行い、細胞の剥離前後での ECM の観察を行った。その結果、PS 粒子膜では SA 粒子膜よりも細胞に付着している ECM の量が少ないことがわかった (Figure 3.20,3.21)。この原因として考えられることは、ECM の吸着は疎水性相互作用によって生じるために、より親水性の強い SA 粒子膜において ECM が剥離したものと考えられる。静的接触角は PS 粒子膜 > SA 粒子膜となっており、疎水性は PS 粒子膜の方が強い。また細胞を剥離させる際にも PS 粒子膜の方が細胞を剥離させにくかった。

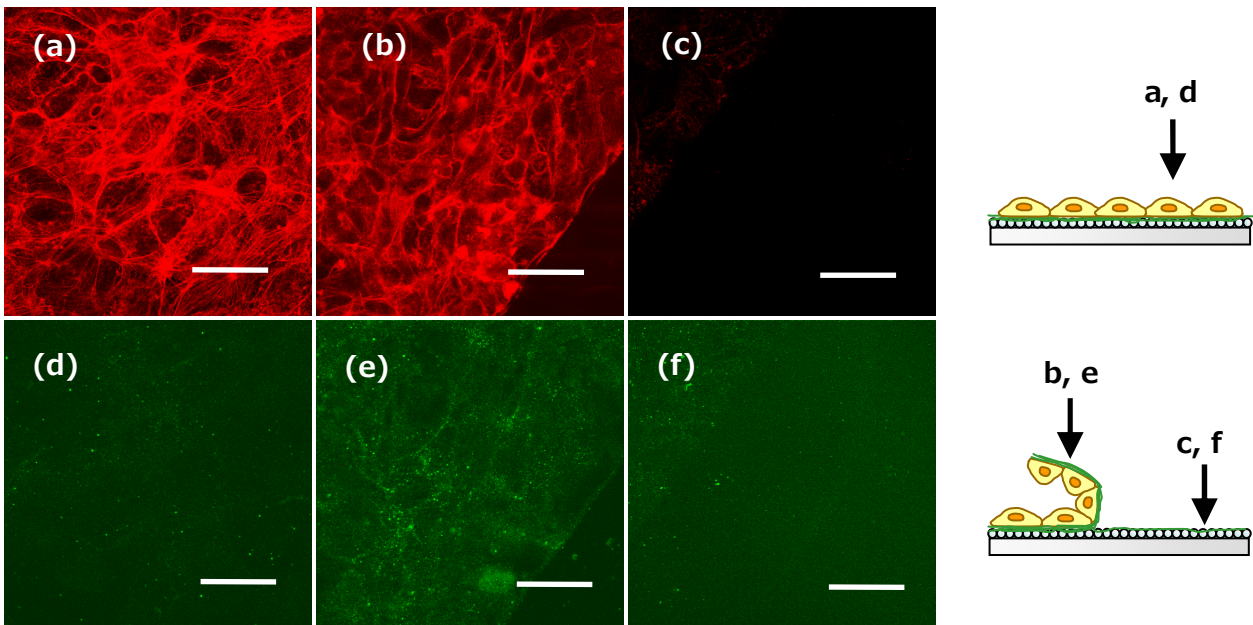


Figure 3.16 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and fibronectin (green) of adhering cells (a,d), detached cells (b, e) and substrate after cell detachment (c, f) . Cells were seeded on a non-coated SA527 particle monolayer with 2.0×10^5 cells/cm², and peeled by pipetting 1 d after incubation. Scale bars indicate 50 μ m.

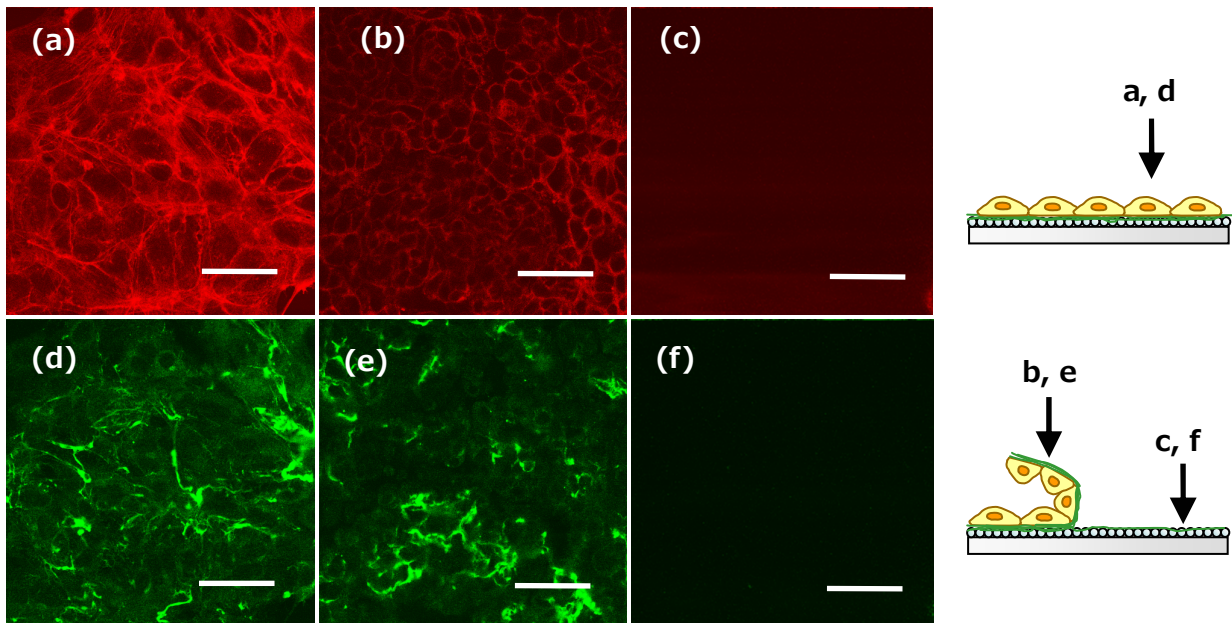


Figure 3.17 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and type IV collagen (green) of adhering cells (a,d), detached cells (b, e) and substrate after cell detachment (c, f) . Cells were seeded on a non-coated SA527 particle monolayer with 2.0×10^5 cells/cm², and peeled by pipetting 1 d after incubation. Scale bars indicate 50 μ m.

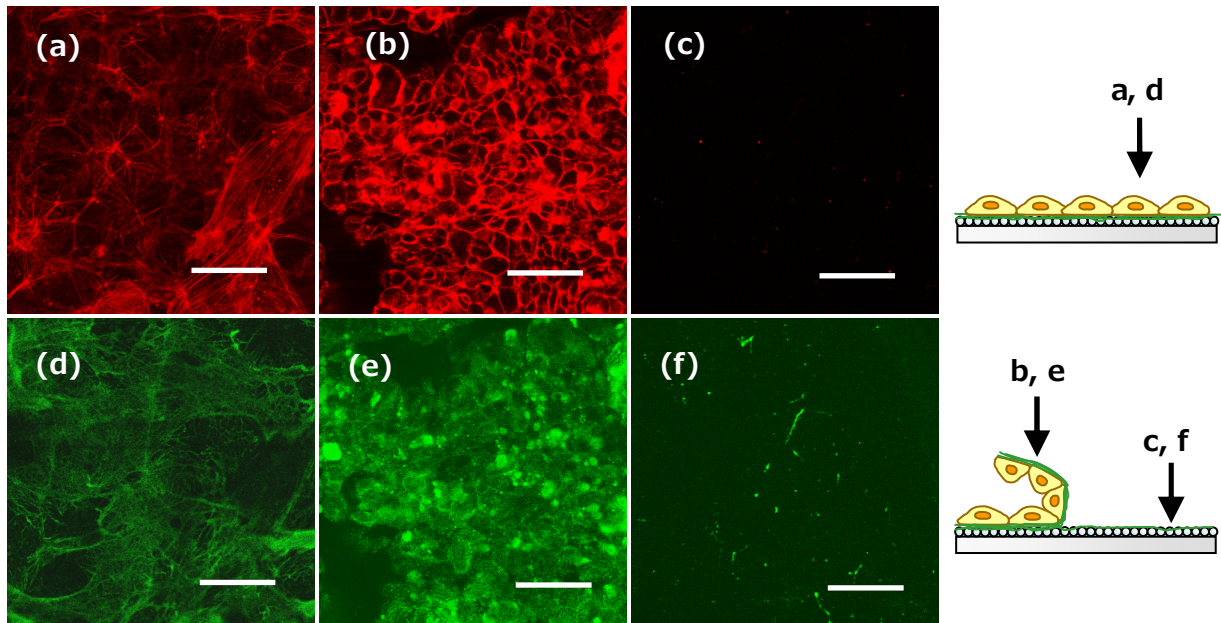


Figure 3.18 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and fibronectin (green) of adhering cells (a,d), detached cells (b, e) and substrate after cell detachment (c, f) . Cells were seeded on an FN-coated SA527 particle monolayer with 5.0×10^4 cells/cm², and peeled by pipetting 6 d after incubation. Scale bars indicate 50 μm.

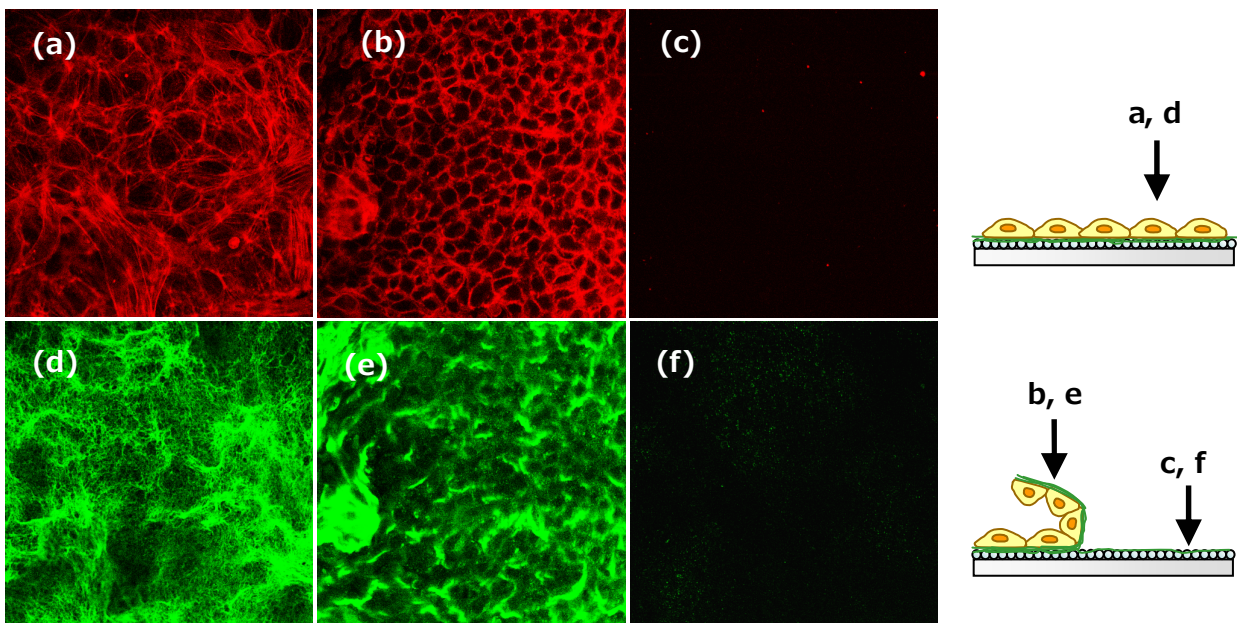


Figure 3.19 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and type IV collagen (green) of adhering cells (a,d), detached cells (b, e) and substrate after cell detachment (c, f) . Cells were seeded on an FN-coated SA527 particle monolayer with 5.0×10^4 cells/cm², and peeled by pipetting 7 d after incubation. Scale bars indicate 50 μm.

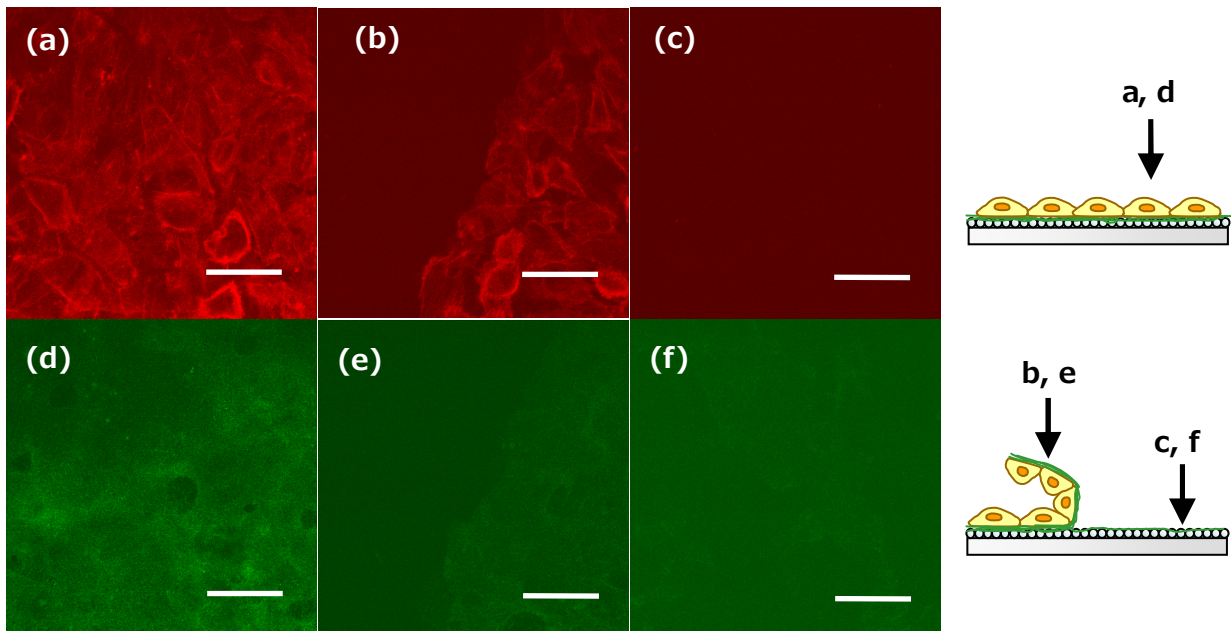


Figure 3.20 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and fibronectin (green) of adhering cells (a,d), detached cells (b, e) and substrate after cell detachment (c, f) . Cells were seeded on an FN-coated PS-2 particle monolayer with 5.0×10^4 cells/cm², and peeled by pipetting 6 d after incubation. Scale bars indicate 50 μ m.

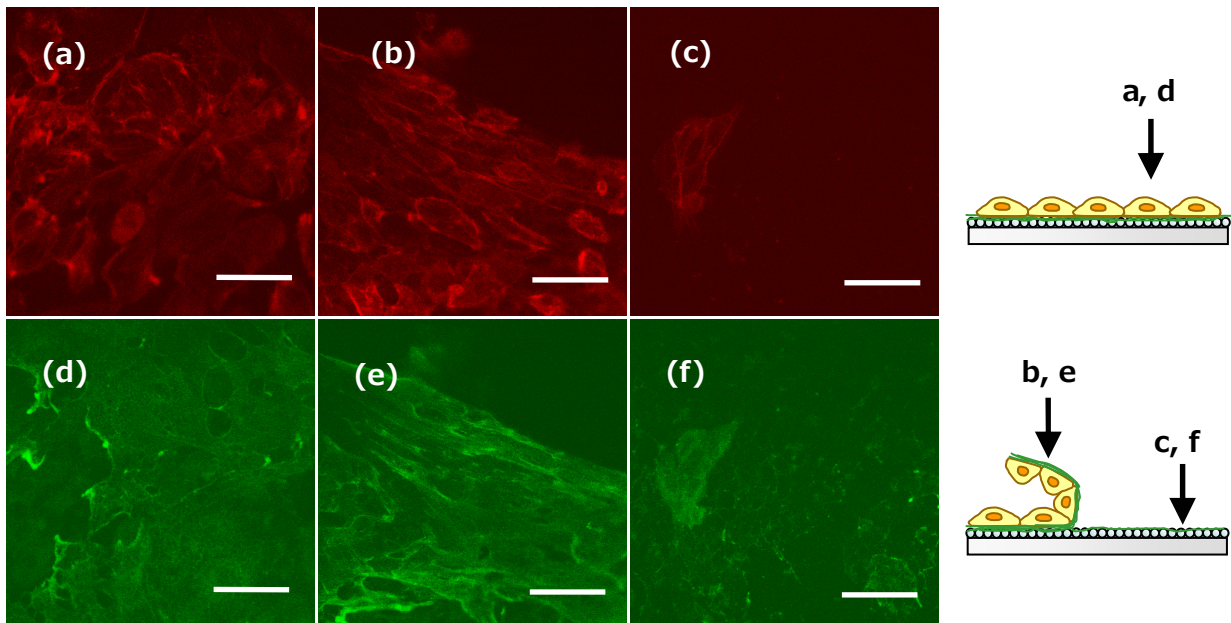


Figure 3.21 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton (red) and type IV collagen (green) of adhering cells (a,d), detached cells (b, e) and substrate after cell detachment (c, f) . Cells were seeded on an FN-coated PS-2 particle monolayer with 5.0×10^4 cells/cm², and peeled by pipetting 9 d after incubation. Scale bars indicate 50 μ m.

<細胞シートの垂直断面の観察 (Figure 3.22) >

次に、染色した細胞シートの垂直断面を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡によって観察した。高密度培養によって培養した細胞シートでは FN および IV 型コラーゲンはほとんど付着していないことがわかった (Figure 3.22a, c)。これは培養期間が短く、基板の上に堆積された ECM が少量だからである。一方、低密度培養によって作製した細胞シートでは FN および IV 型コラーゲンの分泌量が増加した (Figure 3.22b, d)。また、Figure 3.22d からわかるように、細胞の底面に IV 型コラーゲンの層が形成されていることがわかる。IV 型コラーゲンは内皮細胞の基底膜の構成成分のひとつであり、細胞の足元に堆積することが知られている。したがって低密度培養では培養中に徐々に分泌され、基板の上に堆積した ECM が細胞と共に剥離したと考えられる。また、この細胞シートは基底膜に類似した構造の ECM 層を伴って剥離したと思われる。

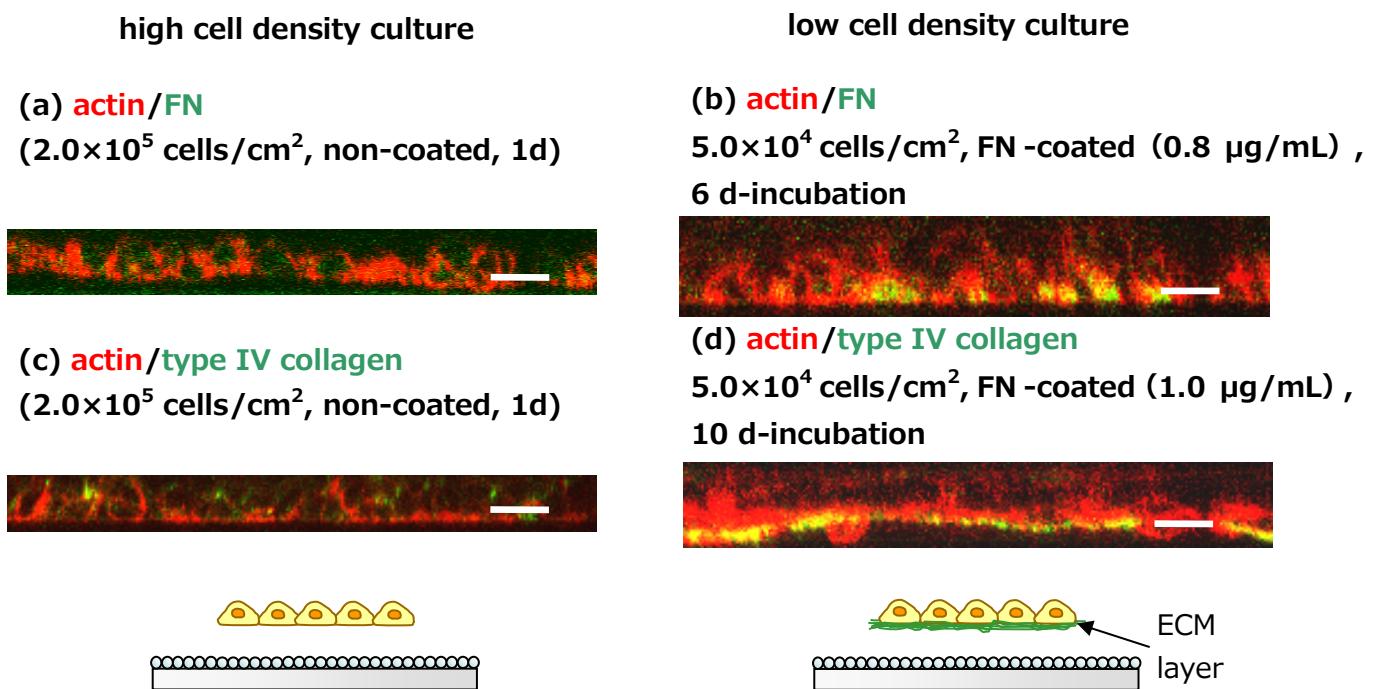


Figure 3.22 Vertical sectional views of actin cytoskeleton (red) and ECM (green). Scale bars indicate 20 µm.

<ECM の剥離率の評価>

ECM の剥離性についてより詳細に検討するために、画像解析によって ECM の相対量を算出し、剥離前と剥離後の量から剥離率を求めた (Table 3.7)。この結果 ECM の剥離性の関係において、次の 3 つを挙げることができる。

- ① SA 粒子膜における ECM 剥離性は PS 粒子膜のそれよりも高い。
- ② SA 粒子膜において高密度培養を行った場合、低密度培養のときよりも ECM 剥離性が高い。
- ③ FN の剥離性と IV 型コラーゲンの剥離性は基板の種類や培養条件によって異なる。

Table 3.6 Detachment of ECM by pipetting.

| | detachment / % | |
|--|----------------|------------------|
| | FN | type IV collagen |
| SA527 particle monolayer (2.0×10^5 cells/cm ² , 1 d) | 83.2±5.2 | 94.7±2.2 |
| SA527 particle monolayer 5.0×10^4 cells/cm ² , FN-coated(1.0 µg/mL), 9 d | 69.8±8.6 | 89.3±3.7 |
| PS-2 particle monolayer 5.0×10^4 cells/cm ² , FN-coated(2.0 µg/mL), 9 d | 43.7±8.9 | 29.1±3.1 |

・粒子の種類と細胞剥離性について

ECMの剥離性はSA527粒子膜において70~90%、PS-2粒子膜において30~40%という結果になった (Table 3.6)。これは前述の共焦点レーザー走査顕微鏡による観察からも予想された結果である。この剥離性の相違は基板の親疎水性によって説明することが可能である。そもそも疎水性相互作用によるタンパク質の吸着はタンパク質の変性を伴う非可逆的な現象であり、吸着したタンパク質は熱力学的に安定である。今回の場合、PS粒子はSA粒子よりも疎水性であり、タンパク質の吸着性が高いと考えられる。実際に、基板上のECMの構造をよく観察してみると、PS粒子膜ではECMの構造が平坦で均一なのに対し、SA粒子膜上ではECMが不均一であることがわかる。細胞は接着している間にECMの再配列を行い、網目構造を作るが、その構造は基板の柔軟性やECMとの相互作用に依存することが知られている。PS粒子膜においてはECMの吸着性が高いためにECMの剥離性が低くなったと考えられる。

・培養法と細胞剥離性について

基板上に堆積されたECM量および分布によって細胞剥離性の差が生じたと考えられる。Figure 3.22において明らかのように、ECMの分布は高密度培養と低密度培養で異なる。高密度培養では細胞シート全体にECMが分布しているのに対し、低密度培養では細胞シートの足元にECMが分布している。ECM分泌量の少ない高密度培養法の方がピペッティングによって細胞シートを剥離させやすかったため、EECM剥離性と細胞剥離性には密接な関係があると考えられる。

・FNとIV型コラーゲンの剥離性の差

SA527粒子膜（低密度培養）においてはFNの構造はIV型コラーゲンよりも不均一であり (Figure 3.18, 3.19)、剥離性はFNよりもIV型コラーゲンの方が高かった (Table 3.6)。一方、PS-2粒子膜においてはIV型コラーゲンの構造はFNよりも不均一であり (Figure 3.20, 21)、剥離性はFNの方がIV型コラーゲンよりも高かった (Table 3.6)。これにより、基板上に堆積したECMタンパク質の構造的均一性が高いほど剥離しやすくなることがわかる。

次に、ECMの構造を左右する要素について考察する。考えられうる可能性としては、FNとIV型コ

ラーゲンの基板に対する吸着性の違いが挙げられる。タンパク質の吸着量は等電点 (isoelectric point, pI) 付近の pH で最大になることが知られている。タンパク質の等電点を比較すると、FN は pI=5.5~6.0 であるのに対し、IV 型コラーゲンは pI=8.5~9.3 である。したがって培養条件 (pH7.4) では FN は負に帯電しており、IV 型コラーゲンは正に帯電している。粒子膜は負に帯電しているため、FN とは斥力が作用し、IV 型コラーゲンは引力が働くことになる。そのため IV 型コラーゲンは FN よりも優先的に吸着すると考えられる。吸着量が多いほど強固な ECM の網目構造が構築されると考えられるため、基板から均一に剥離し、剥離性が高くなる。

3.2.5 細胞シートのサイズについての定量的評価

細胞単層は基板に伸展しているが、細胞シートとして基板から剥離すると、細胞シートが収縮して元に戻り、見かけ上サイズが小さくなる。

このサイズ変化を評価するために、細胞剥離前後の細胞単層および細胞シートのサイズを光学顕微鏡写真の画像解析によって算出した (Table 3.7)。その結果、高密度培養および低密度培養のどちらの場合も剥離前約 $\phi 15$ mm (粒子膜を累積した円形カバーガラスのサイズと一致)、剥離後約 $\phi 5$ mm となった。長さで約 35%、面積で約 12% に収縮したことになる。細胞の培養条件によらず、剥離後の細胞シートのサイズがほぼ一定であった。すなわち細胞は剥離に伴って収縮し、球状に近い形態に変形したと考えられる。

Table 3.7 The size of cell sheets before and after detachment.

| culture condition | diameter of a cell sheet / mm | |
|---|-------------------------------|------------------|
| | before detachment | after detachment |
| high cell seeding density (2.0×10^5 cells/cm ² , 1d) | 14.9±0.1 | 5.2±0.3 |
| low cell seeding density (5.0×10^4 cells/cm ² , 6d) | 14.9±0.1 | 5.3±0.7 |

<細胞シートのサイズについて>

細胞シートのサイズはそれを構成している細胞数を反映していると考えられる。高密度培養 (1 d 培養) と低密度培養 (6 d 培養) とで細胞数はほぼ同じであり (Figure 3.12 参照)、実際にこれら 2 種類の条件で作製した細胞シートはほぼ同等のサイズであった。低密度培養において培養日数を短くすれば、さらに収縮した細胞シートを作製することもできるかもしれないが、おそらく細胞シートの質 (細胞単層の均一性や細胞-細胞間接着の成熟度) も変わってしまうであろう。

<細胞シートの収縮について>

細胞シートの収縮はすなわち個々の細胞の変形を総合したものである。細胞は基板上に接着・伸展する際に細胞骨格 (アクチンフィラメント、中間径フィラメント、微小管) を形成し、自らの身体を支持・固定する。しかし細胞が剥離すると細胞骨格の支持を失うために元の形状 (球形) に戻ろうとする。「収縮」という表現を用いるのは誤解を招いてしまうかもしれないが、ここでは「伸展した状態から元の形状に戻る」ことを「収縮」と表現することにする。細胞シートの収縮の程度については細胞の種類に依存するところが大きい。今回用いた内皮細胞の特徴は 3 つある。1 つは内皮細胞が単層を形成する (細胞が重層化しない) 細胞だということである。重層化した細胞は細胞同士の接着によって収縮に対してある程度抵抗できるが、細胞単層は収縮に抵抗できない。2 つ目は内皮細胞が細胞-細胞間で密着結合

(tight junction) を形成することである。密着結合は内皮細胞や上皮細胞に見られる結合様式であり、水や物質、細胞の透過を抑制するバリア機能を果たしている。Figure 3.15 からわかる通り、内皮細胞同士は緊密な細胞-細胞間接着を形成している。この強固な細胞間結合が細胞シート収縮の主な要因と考えられる。そして3つ目として、内皮細胞は細胞外マトリックス産生量が繊維芽細胞(様々なECMを分泌する細胞)などに比べて少ないということが挙げられる。ECM(特にグリコサミノグリカン類)は圧縮に対して抵抗する役割を担っているが、組織中でECMを分泌するのは主に繊維芽細胞の役割である。内皮細胞もIV型コラーゲンやラミニンといったECMを分泌し、足元に基底膜を構築するが、基底膜は非常に薄く(厚さ40~120 nm)、かつ柔軟である。そのため粒子膜を利用して作製した内皮細胞の細胞シートはECMを保持しているにもかかわらず、収縮力に対して抵抗できないと考えられる。

3.2.6 細胞シートの再接着実験

高密度培養(1 d)および低密度培養(7 d)によって作製した細胞シートを基板(TCPS)に再接着させ、その形態を光学顕微鏡で観察した。

<高密度培養で作製した細胞シートについて (Figure 3.23) >

細胞を剥離した直後では、細胞の表面は凹凸構造を有していた。細胞が剥離する際には細胞の急激な変形、そしてそれに伴う細胞骨格の再編成を伴うが、剥離のタイムスケールは数秒~数十秒であるのに対し、基板に接着していたときに形成された細胞骨格が崩壊するタイムスケールは数分程度であるため、ギャップが生じる。したがって剥離直後においては接着していたときの骨格系がそのまま残っていると考えられる。細胞シートを播種して1 h後には細胞表面の凹凸が減少し、細胞骨格が崩壊していることが観察された。またこの時点で細胞シートはTCPSに対して接着していた。細胞シート剥離24 h後になると細胞は基板に伸展し、増殖していた。しかし大部分の細胞は基板と接着せず細胞凝集塊を形成していた。これは基板から剥離した細胞シートが完全に平坦ではなく、少し歪んだ形状を有しているためである。

<低密度培養で作製した細胞シートについて (Figure 3.24) >

一方、低密度培養によって作製した細胞シートは、剥離後最低でも20分以内にTCPSに対して接着することが明らかになった。また24 h後も細胞が移動・増殖している様子が観察された。高密度培養によって作製した細胞シートよりも再接着までに要する時間が短いのは、ECMの免疫染色(Figure 3.23)において明らかのように、低密度培養で作製した細胞シートの方がECMの付着量が多いためである。剥離した細胞シートにECMタンパクが接着しているかどうかということは、実用上重要な問題である。岡野らが作製した細胞シートもECMを保持しており、5分以内に細胞シートが宿主組織に接着することを報告している。短時間で組織と接着すれば、組織との一体化が早いいため移植の成功率が高まる(移植後に細胞シートがずれたり剥がれたりすることがない)。また5分という時間は、縫合糸を利用して宿主組織に対して固定されている場合であるため、本実験と同条件の場合には、より長いインキュベーション時間が必要になるかもしれない。また本実験においては細胞シートをメディウム中でインキュベーションしたが、メディウムに含まれる血清中のタンパク質がTCPSに対して吸着し、細胞シートに付着したECMのTCPSに対する吸着を阻害していた可能性もある。

細胞シートの実用のために解決すべき点は、細胞を回収した後も細胞が生存していること、細胞シートがECMを保持し、宿主組織に対して接着しやすい状態であること、そして細胞シートが癌化しな

いことなどが挙げられる。したがって単層粒子膜を利用して ECM を保持した細胞シートを作製できたことは、実用に向けて課題を 1 つ解決したことになる。また本実験は ECM の付着量によって細胞シートの再接着時間が異なることを初めて明らかにしたという点で意味がある。ホスト組織に対する再接着や機能発現に最適な ECM 組成が明らかになれば、より質の高い細胞シートを作製することができるだろう。

ECM の剥離性の次に評価すべきことは、細胞シートにおける細胞生存率である。剥離の際には急激に応力が加わるため、剥離に伴って物理的な細胞死もしくは細胞膜の損傷が起こっている可能性がある。細胞が基板上で再び接着・伸展・増殖していたことから、剥離後も大部分の細胞が生存していることが示唆されたが、やはり細胞シートの細胞生存率を定量的に評価する必要がある (3.2.6, 3.2.7 参照)。

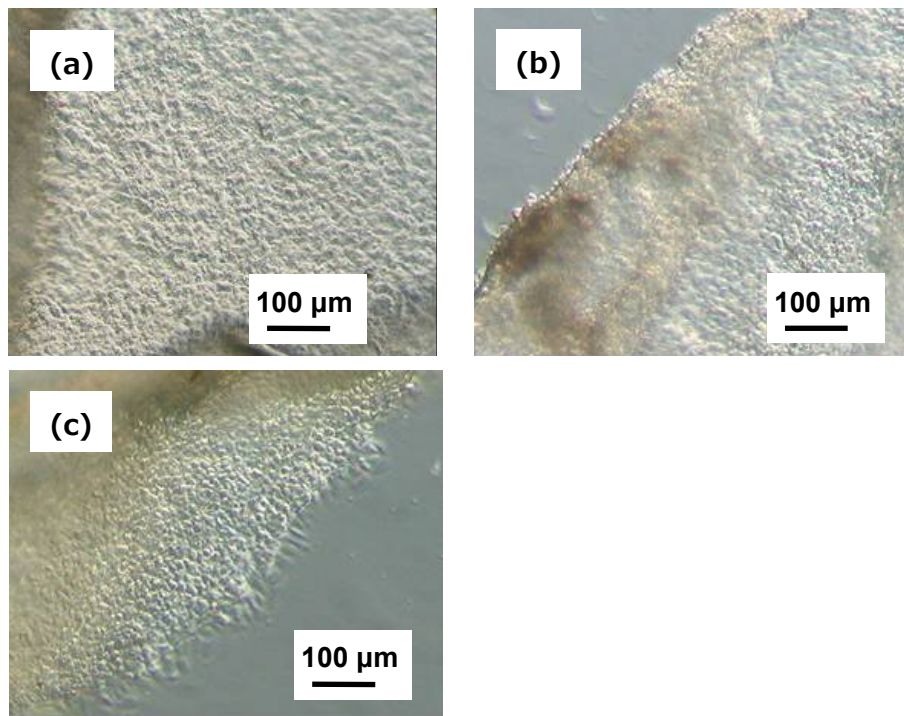


Figure 3.23 Optical microscopic images of a cell sheet adhering onto a TCPS dish 0 h (a), 1 h (b) and 24 h (c) after incubation.

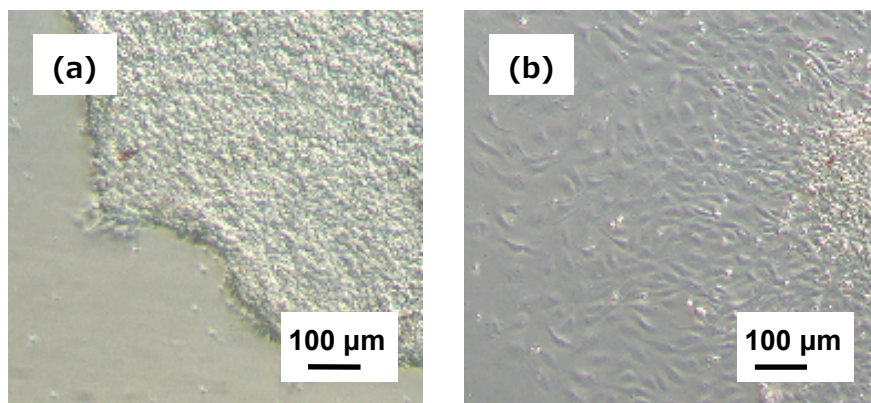


Figure 3.24 Optical microscopic images of a cell sheet adhered onto a TCPS dish 20 min (a) and 24 h (b) after incubation.

3.2.7 細胞剥離後の基板の観察

ここでは細胞シートを剥離させた後の SA527 粒子膜を観察した (Figure 3.25)。まず光学顕微鏡で観察した結果、SA527 粒子膜に残っている細胞はほとんど観察されなかった。これは細胞がピペッティングによって剥離したことを示している。しかし、SA527 粒子が基板から剥離した可能性も考えられる。そこで FE-SEM によって細胞を剥離した後の粒子膜を観察したところ、SA527 粒子は基板に残っていることが確認された。このことから SA527 粒子膜における細胞剥離性は基板の凹凸構造に由来することが裏付けられた。

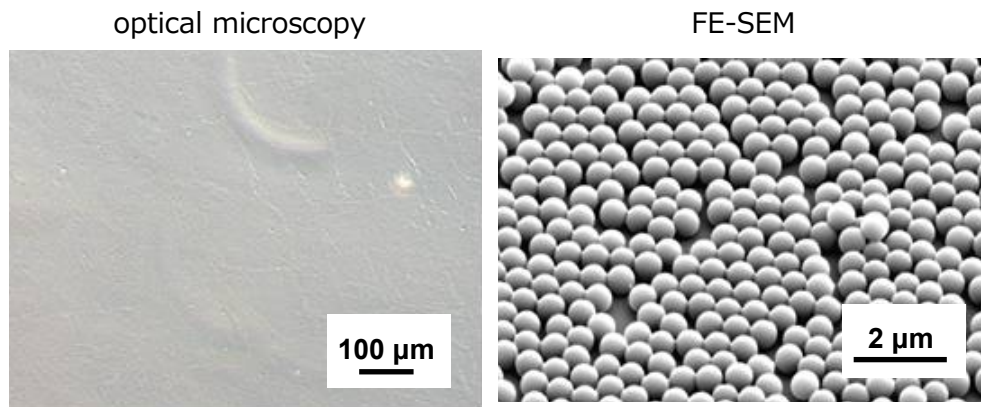


Figure 3.25 Optical microscopic and FE-SEM images of a SA527 particle monolayer after the detachment of a cell sheet.

3.2.8 トリパンプルーによる細胞生存率の評価

高密度培養と低密度培養によって作製した細胞シートの細胞生存率を評価した。これは細胞の脱着操作に伴う細胞死を定量することを目的としている。

<高密度培養>

播種密度 2.0×10^5 cells/cm²、1 d 培養後の細胞生存率をトリパンプルー排除法によって評価した。サンプルは以下の 3 種類である。

- ①細胞を TCPS 上で培養し、トリプシン処理によって細胞を剥離・再分散させた場合
- ②細胞を未処理の SA527 粒子膜上で培養し、トリプシン処理によって細胞を剥離・再分散させた場合
- ③細胞を未処理の SA527 粒子膜上で培養し、ピペッティングによって細胞シートを剥離させた後、トリプシン処理によって細胞を再分散させた場合

血球計算盤による計測の結果を Table 3.8a に示す。①、②および③のいずれも 98~99% と高い生存率を示した。したがって、ピペッティングによる細胞の剥離・回収はトリプシン処理とほぼ同等であり、ピペッティング操作による細胞死はほぼ無視できることがわかった。

<低密度培養>

播種密度 5.0×10^4 cells/cm²、10 d 培養後の細胞生存率をトリパンプルー排除法によって評価した。サンプルは以下の 4 種類である。

- ①細胞を TCPS 上で培養し、トリプシン処理によって細胞を剥離・再分散させた場合

- ②細胞を未処理の SA527 粒子膜上で培養し、トリプシン処理によって細胞を剥離・再分散させた場合
- ③細胞を FN コートした SA527 粒子膜上で培養し、トリプシン処理によって細胞を剥離・再分散させた場合
- ④細胞を FN コートした SA527 粒子膜上で培養し、ピペッティングによって細胞シートを剥離させた後、トリプシン処理によって細胞を再分散させた場合

血球計算盤による計測の結果を Table 3.8b に示す。①,②および③ではトリプシン処理によって細胞の再分散が可能であった。一方、ピペッティング後にトリプシン処理を行った④では細胞シートがトリプシン処理によって完全に分解されなかった。トリプシン処理中の細胞を光学顕微鏡で観察したところ、細胞-細胞間の接着は切断されて細胞の形態は球状になっているにもかかわらず、細胞が ECM のシート上に接着したまま剥離しないことがわかった (Figure 3.26)。通常の培養法では、トリプシンを数分間作用させることに細胞膜表面のタンパク質や ECM はほぼ完全に分解される。本実験においても、①, ②および③では 3~5 分のトリプシン処理で十分に細胞を再分散することができた。しかし④では反応時間 10 分においても細胞同士が再分散しなかった。この原因として考えられる理由は、長期間の培養によってより多くの ECM が細胞から産生されたことにより、分解のために必要な時間が長くなったということである。したがって、長期間培養で作製した細胞シートを再分散するためには、より長時間のトリプシン処理が必要となると考えられる。しかしながら長時間のトリプシン処理は細胞に必要以上のダメージを与え、細胞生存率に影響を及ぼすことが知られており、今回の実験ではトリプシン処理をこれ以上長くすることは不適當であると判断した。

3.2.9 LDH アッセイによる細胞生存率の評価

高密度培養および低密度培養によって作製した細胞シートについて LDH アッセイによって細胞生存率を評価した。ここでは培養中に細胞から外液へ自然に漏出した LDH 量をネガティブコントロールとして用い、界面活性剤によって全ての細胞を溶解したときの LDH 量をポジティブコントロールとして用いた。細胞シートサンプルでは、細胞シート作製における操作 (ピンセットを用いてサンプルを TCPS dish に移動後、ピペッティングによって細胞を剥離) を行った後に漏出した LDH 量を測定した。それらの結果から算出した細胞生存率を Table 3.9 に示す。高密度培養および低密度培養のどちらの場合も、ネガティブコントロールの細胞生存率は約 99%、細胞シートの細胞生存率は約 98%となった。すなわちピペッティングによる細胞死は全体の約 1%であった。この結果を他の研究例と比較してみると、例えば、セルスクレイパーによって細胞を剥離させた場合には約 90%の細胞が死んでしまう。またコラゲナーゼによってコラーゲンを分解して細胞を回収した場合には 8~25%の細胞が死ぬという報告がある¹⁵⁾。トリパンプルーアッセイおよび LDH アッセイの結果を総合すると、細胞剥離に伴う細胞死はトリプシン処理とほぼ同程度で、実用上問題のない水準であると結論付けられる。

Table 3.8 Cell viability of peeled cell sheets measured by trypan blue exclusion method.

(a) 2.0×10^5 cells/cm², 1-d incubation

| sample | cell viability / % |
|---|--------------------|
| TCPS (trypsin) | 99.6±0.3 |
| SA527 particle monolayer (trypsin) | 98.1±1.8 |
| SA527 particle monolayer (pipetting + trypsin) | 98.1±1.9 |

(b) 5.0×10^4 cells/cm², 7-d incubation

| sample | cell viability / % |
|---|--------------------|
| TCPS (trypsin) | 96.9±1.7 |
| SA527 particle monolayer (trypsin) | 97.2±2.2 |
| FN-coated SA527 particle monolayer (trypsin) | 96.5±1.9 |
| FN-coated SA527 particle monolayer (pipetting + trypsin) | 94.2±3.7 |

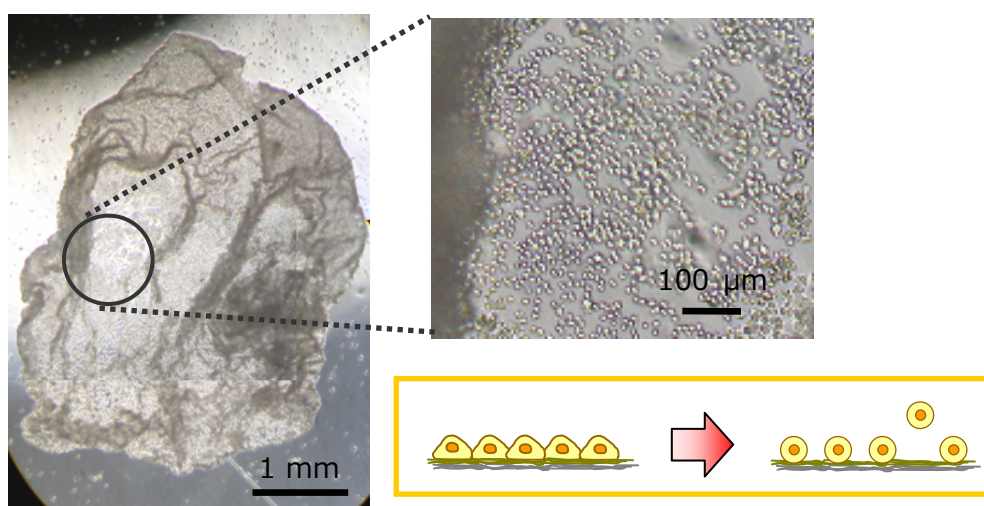


Figure 3.26 Optical microscopic images of a cell sheet treated by trypsin solution. Cells were seeded with 5.0×10^4 cells/cm² on an SA527 particle monolayer coated with 1.0 μg/mL of FN solution. A cell sheet was peeled by pipetting after 10-d incubation.

Table 3.9 Cell viability of HUVECs detached from an SA527 particle monolayer measured by LDH assay.

| culture conditions | | sample | cell viability / % |
|--|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| cell seeding density / cells·cm ⁻² | culture period / day | | |
| 2.0 × 10 ⁵ | 1 | negative control | 98.9±0.4 |
| | | detached cell sheet | 97.8±0.8 |
| 5.0 × 10 ⁴ | 9 | negative control | 99.1±0.7 |
| | | detached cell sheet | 97.7±0.9 |

3.3 結論

本章では粒子膜の性質を利用して細胞シートの作製を試みた。まず基板の凹凸構造と細胞の剥離性を検討したところ、適度な細胞-基板間の接着力を持つ SA527 粒子膜が細胞シートの作製に適していることがわかった。次に細胞播種密度、FN コート濃度、培養期間などを検討した結果、細胞シートを作製するためには細胞単層がコンフルエントの状態、強固な細胞-細胞間接着が形成されている必要があることがわかった。

続いて、粒子膜を利用して作製した細胞シートの評価を行った。LDH アッセイによって細胞シートの細胞生存率を調べたところ、剥離した細胞の生存率は約 98%であり、物理的要因による細胞死はほぼ無視できる水準であることが明らかになった。作製した細胞シートは培養中に分泌された ECM (フィブロネクチンや IV 型コラーゲン) を保持しており、20 分以内に再び基板に接着することがわかった。これはホスト組織に対して移植する際にも十分に実用可能な水準であると考えられる。

従来の細胞シート作製法は、低温処理や酵素処理などが必要であったが、本法はピペッティングのみで細胞シートを剥離できるため、より簡便な作製法であると考えられる。ただし、粒子膜には改良すべき点もある。現時点では粒子膜に対して FN コートしなければならない。そのため FN コートが不要になれば、単層粒子膜はさらに優れた培養基材になると考えられる。

3.4 参考文献

- 1) Nagai N, Yunoki S, Satoh Y, Tajima K, Munekata M, "A Method of Cell-Sheet Preparation Using Collagenase Digestion of Salmon Atelocollagen Fibrillar Gel", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 493-496, 2004.
- 2) Itabashi Y, Miyoshi S, Kawaguchi H, Yuasa S, Tanimoto K, Furuta A, Shimizu T, Okano T, Fukuda K, Ogawa S, "A New Method for Manufacturing Cardiac Cell Sheets Using A New Method for Manufacturing Cardiac Cell Sheets Using Optical Mapping", *Journal of Artificial Organs* 29, 95-103, 2005.
- 3) Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Okano T "Rapid cell sheet detachment from poly(*N*-isopropylacrylamide) -grafted porous cell culture membranes", *Journal of Biomedical Materials Research* 50, 82-89, 2000.
- 4) Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y, "Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilichydrophobic polymer surfaces", *Biomaterials* 16, 297-303, 1995.
- 5) Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, Kikuchi A, Okano T, Tano Y, "Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes", *Biomaterials* 27, 607-614, 2006.
- 6) Okajima S, Yamaguchi T, Sakai Y, Nakao S, "Regulation of Cell Adhesion Using a Signal-Responsive Membrane Substrate", *Biotechnology and Bioengineering* 91, 237-243, 2005.
- 7) Haraguchi K, Takehisa T, Ebato M, "Control of Cell Cultivation and Cell Sheet Detachment on the Surface of Polymer/Clay Nanocomposite Hydrogels", *Biomacromolecules* 7, 3267-3275,

2006.

- 8) Zhang H, Iwama M, Akaike T, Urry DW, Pattanaik A, Parker TM, Konishi I, Nikaido T, "Human Amniotic Cell Sheet Harvest Using a Novel Temperature-Responsive Culture Surface Coated with Protein-Based Polymer", *Tissue Engineering* 12, 391-401, 2006.
- 9) Chen CH, Tsai CC, Chen WS, Mo FL, Liang HF, Chen SC, Sung HW, "Novel Living Cell Sheet Harvest System Composed of Thermoreversible Methylcellulose Hydrogels", *Biomacromolecules* 7, 736-743, 2006.
- 10) Higuchi A, Yamamoto T, Sugiyama K, Hayashi S, Tak TM, Nakagawa T, "Temperature-Dependent Cell Detachment on Pluronic Gels", *Biomacromolecules* 6, 691-696, 2005.
- 11) Ito A, Ino K, Kobayashi T, Honda H, "The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting", *Biomaterials* 26, 6185-6193, 2005.
- 12) Ito A, Ino K, Hayashida M, Kobayashi T, Matsunuma H, Kagami H, Ueda M, Honda H, "Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force", *Tissue Engineering* 11, 1553-1561, 2005.
- 13) Satomi T, Nagasaki Y, Kobayashi H, Otsuka H, Kataoka K, "Density Control of Poly(ethylene glycol) Layer To Regulate Cellular Attachment", *Langmuir* 23, 6698-6703, 2007.
- 14) Takahashi H, Emoto K, Dubey M, Castner DG, Grainger DW, "Imaging Surface Immobilization Chemistry: Correlation with Cell Patterning on Non-Adhesive Hydrogel Thin Films", *Advanced Functional Materials* 18, 2079-2088, 2008.
- 15) Jung K, Hampel G, Scholz M, Henke W, "Culture of Human Kidney Proximal Tubular Cells - The Effect of Various Detachment Procedures on Viability and Degree of Cell Detachment", *Cellular Physiology and Biochemistry* 5, 353-360, 1995.

第4章

接着性パターンニングによる細胞構造体の作製

第2章では粒子膜の凹凸構造によって個々の細胞の細胞接着を制御できることを示した。しかし、培養して得られた細胞組織としての形態を制御することはできなかった。そこで第4章では基板に細胞接着領域のパターンニングを行うことにより、細胞の接着可能な領域を制限することによって細胞の接着形態を制御することを試みた。細胞の接着形態と機能の関係を示した研究は、基板に化学的または物理的なパターンを形成させている。基板にパターンニングを行う方法としてはソフトリソグラフィ¹⁾、自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer, SAM)²⁾、電気化学的堆積³⁾などがある。

ストライプ状にコラーゲンをパターンニングした基板上に内皮細胞を播種することによって管腔形成が起こったという報告や、ストライプ状の凹凸基板上に骨芽細胞を播種するとストライプの軸に沿って細胞が配向し、骨芽細胞の分化が促進されたという報告⁴⁾がある。また同様にストライプ状の基板で内皮細胞を培養すると管腔形成が促進されるという報告もある^{5,6)}。これらは細胞の形態と発現する細胞機能の間に関係があることを示唆している。また本研究と同様に粒子配列のパターンを形成させ、細胞の接着を制御した研究もある^{7,8)}。

本研究では光反応性架橋剤である *N*-5-azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide (ANB-NOS) を BSA に修飾し、光反応性 BSA を作製した。そしてフォトマスクを利用して粒子膜上に BSA のパターンニングを行い、細胞組織全体の接着形態を制御することを試みた。さらに、フォトレジストによってパターンを作製し、パターン化粒子膜を作製した。そして第3章で得られた知見を活かし、細胞を培養した後に剥離させ、パターン化細胞シートの作製を試みた。

4.1 実験方法

4.1.1 試薬

| | |
|---|---------------|
| ・塩化ナトリウム (sodium chloride, NaCl) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・塩化カリウム (potassium chloride, KCl) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate, KH_2PO_4) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・塩化マグネシウム六水和物 (magnesium chloride hexahydrate, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・塩化カルシウム二水和物 (calcium chloride dihydrate, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・グルコース (glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) | 和光純薬工業 (株) 特級 |
| ・0.5%コラーゲン酸性溶液 I -AC | 高研 (株) |
| ・トリプシン (Trypsin, Crist.) | 和光純薬工業 (株) |
| ・フェノールレッド (phenol red) | 和光純薬工業 (株) |
| ・エチレンジアミン四酢酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) | 和光純薬工業 (株) |
| ・パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) | 和光純薬工業 (株) |
| ・エタノール (ethanol) | 純正化学 (株) 特級 |
| ・TritonX-100 | 東京化成工業 (株) |
| ・Tween20 | 東京化成工業 (株) |
| ・rhodamine-conjugated phalloidin | フナコシ (株) |
| ・N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide (ANB-NOS) | Pierce (株) |
| ・TSMR-8900 | 東京応化工業 (株) |
| ・フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) | Sigma-Aldrich |
| ・ウシ血漿フィブロネクチン (bovine plasma fibronectin) | Sigma-Aldrich |
| ・ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) | Sigma-Aldrich |

4.1.2 HUVEC の培養

4.1.2.1 溶液の調製

PBS(-)およびPBS(+))の作製、細胞培養メディウム、コラーゲン溶液の調製、トリプシン溶液の調製については2.1.5.2を参照。

4.1.2.2 HUVEC の培養方法

2.1.5.3を参照。

4.1.3 光反応性 BSA のフォトパターンニングによる細胞接着の制御

4.1.3.1 光反応性 BSA の作製

BSA を粒子膜にパターンニングするために光反応性 BSA を作製した。まず BSA に FITC を反応させて FITC ラベル化 BSA を作製した。具体的には、BSA を PBS(-) に溶解し、そこに BSA に対して 10 倍モル当量の FITC を加えて 4°C で 24 時間反応させ、FITC ラベル化 BSA を得た。さらに未反応物を除去するためにゲル濾過クロマトグラフィー (gel filtration chromatography) にて分離精製を行った。ゲル濾過の担体としては Sephadex G-25 (GE Healthcare Bioscience) を選択した。

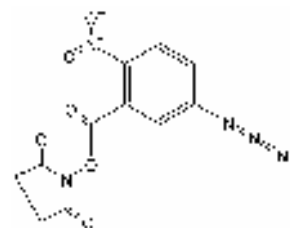
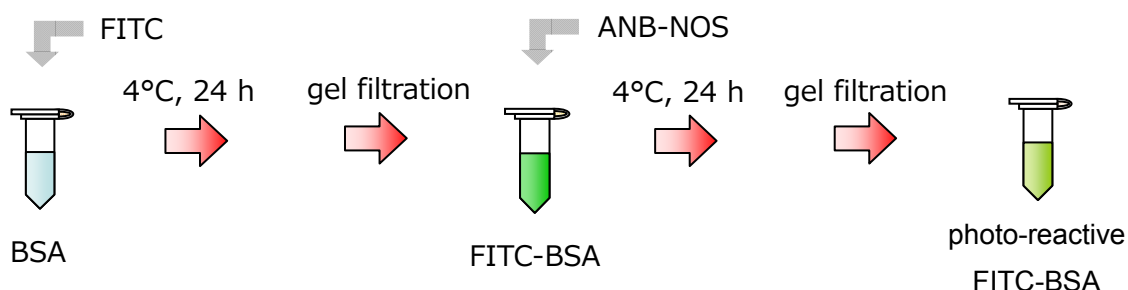


Figure 4.1 Structure of ANB-NOS.

次に光反応性架橋剤である ANB-NOS を FITC ラベル化 BSA に対して反応させ、光反応性 FITC ラベル化 BSA を作製した。具体的には、FITC ラベル化 BSA に対して ANB-NOS を 50 倍モル当量加えて 4°C で 24 時間反応させ、反応後はゲル濾過クロマトグラフィーによって分離精製を行い、光反応性 FITC ラベル化 BSA を得た。BSA の濃度は BCA 法によって定量した。



Scheme 4.1 Preparation of photo-reactive FITC-BSA.

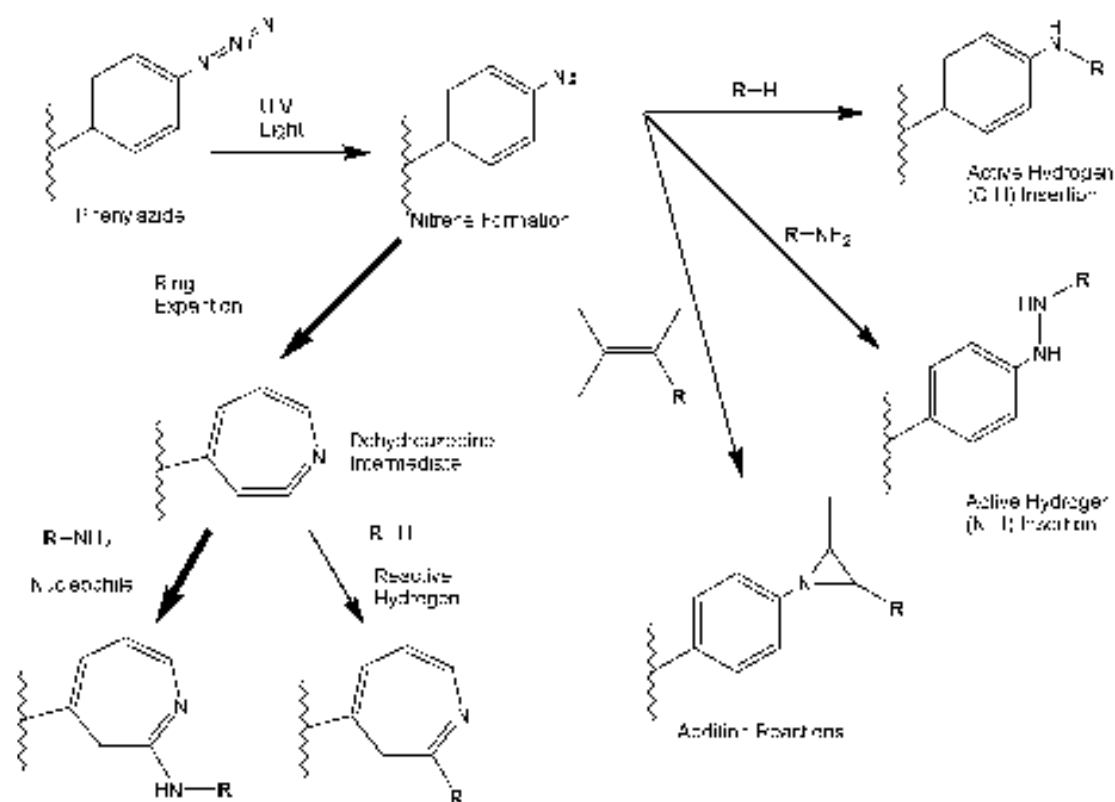


Figure 4.2 Photo-reaction of phenylazide on ANB-NOS⁶³).

ANB-NOS は活性エステル部位とフェニルアジド部位を有する架橋剤である。活性エステルは-NH₂ 基や-OH 基と反応性を有している。フェニルアジド部位は Figure 4.2 に示したように紫外光 ($\lambda = 250$ nm) を照射することによって活性化され、ナイトレンに変化する。このナイトレン部位は-NH₂ や-H、C=C 二重結合と反応して結合する。本研究で用いた ANB-NOS は、フェニルアジド部位にニトロ基を有しているため、活性化に必要な光の波長が長波長側にシフトしている (320~350 nm)。そのため UV 照射によるタンパク質の損傷を低減することができる (一般的なタンパク質は芳香族アミノ酸であるトリプトファンやチロシン由来の 280 nm の吸収ピークを持つ)。活性エステル部位をタンパク質の -NH₂ 基と反応させ、フェニルアジド部位を基板およびタンパク質と反応させることによって、基板上に BSA を光でパターンニングすることを試みた。

4.1.3.2 基板上への光反応性 BSA の光固定化とフォトパターンニング

<パターンの作製 (Scheme 4.2) >

基板 (TCPS plate, SA527 粒子膜および SA1270 粒子膜) の上に 20 mg/ml の光反応性 FITC ラベル化 BSA を 20 μ L 滴下し、カバーガラスおよびフォトマスクを被せて UV を一定時間照射することによって BSA を粒子膜上に化学的に固定した。このとき粒子膜全体に BSA が吸着しているため、固定化した部分以外に吸着している BSA を取り除く必要がある。そこで 3wt% SDS + 0.4M NaCl 水溶液 (pH7.40) を用いて基板をよく洗浄し、余分な BSA を除去した後、再度 PBS(-) で界面活性剤が残らないように何度も洗浄した。

<細胞の播種・培養>

前項で作製した BSA をパターンニングした基板に細胞を播種した。このとき細胞播種密度を 1.0×10^4 、 2.5×10^4 、 5.0×10^4 cells/cm² と変化させて実験を行い、細胞の接着形態の比較を行った。

<細胞骨格の観察>

アクチン細胞骨格を rhodamine-conjugated phalloidin によって染色した後、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡によって観察を行った。

4.1.4 BSA ハイドロゲルのパターンニングによる細胞接着の制御

<パターンの作製>

10 mg/mL の光反応性 BSA を粒子膜上に 10 μ L 滴下し、室温遮光下で自然乾燥させた。その後フォトマスクを被せて UV を一定時間照射してパターンを作製した。サンプルを蒸留水中に浸漬させると、UV 照射されていない部分は蒸留水に溶解 (BSA は水溶性タンパク質) するため、パターンが現像される。

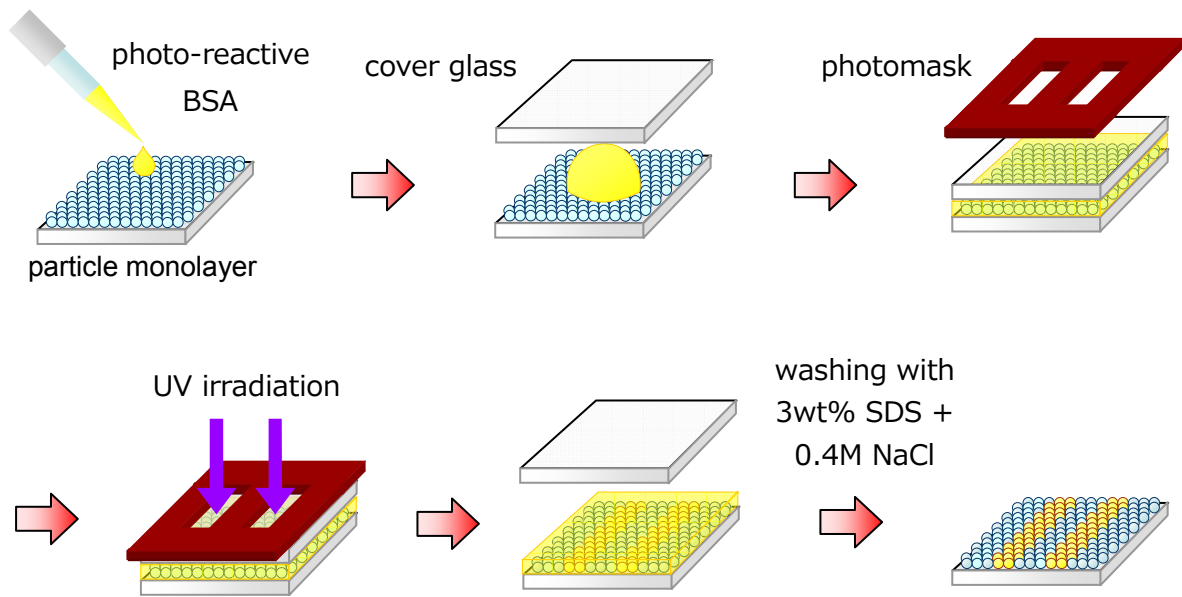
<細胞の播種・培養>

前項で作製した BSA をパターンニングした基板に対して播種密度 5.0×10^4 cells/cm² となるように細胞を播種した。

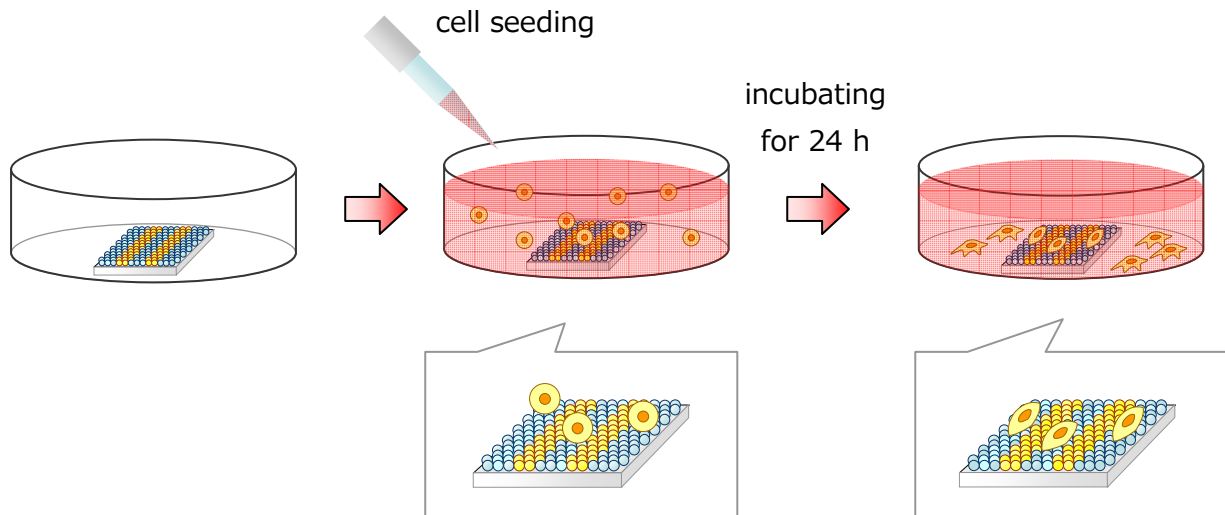
<細胞骨格の観察>

アクチン細胞骨格を rhodamine-conjugated phalloidin によって染色した後、共焦点レーザー走査蛍

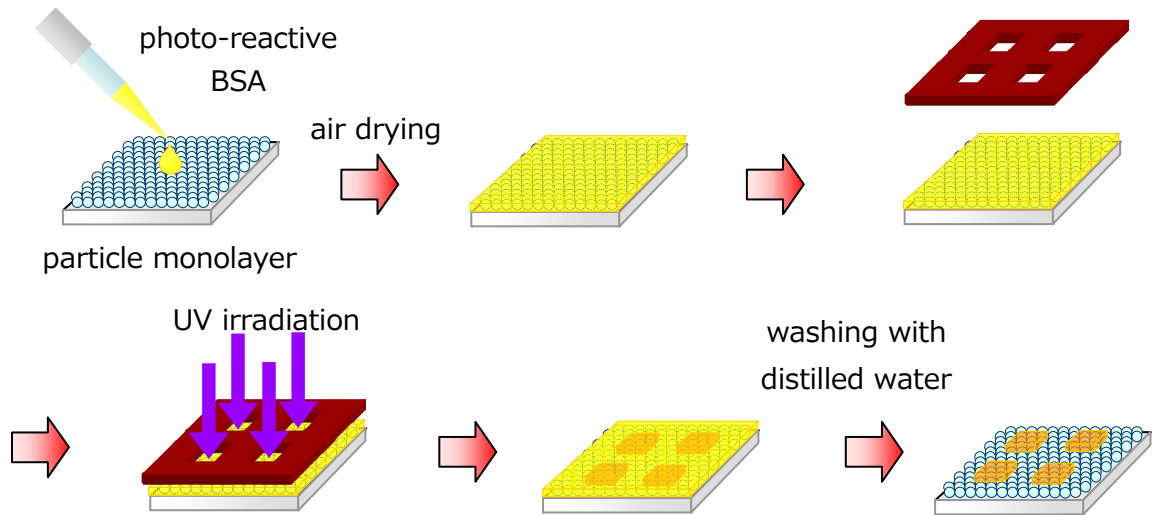
顕微鏡によって観察を行った。



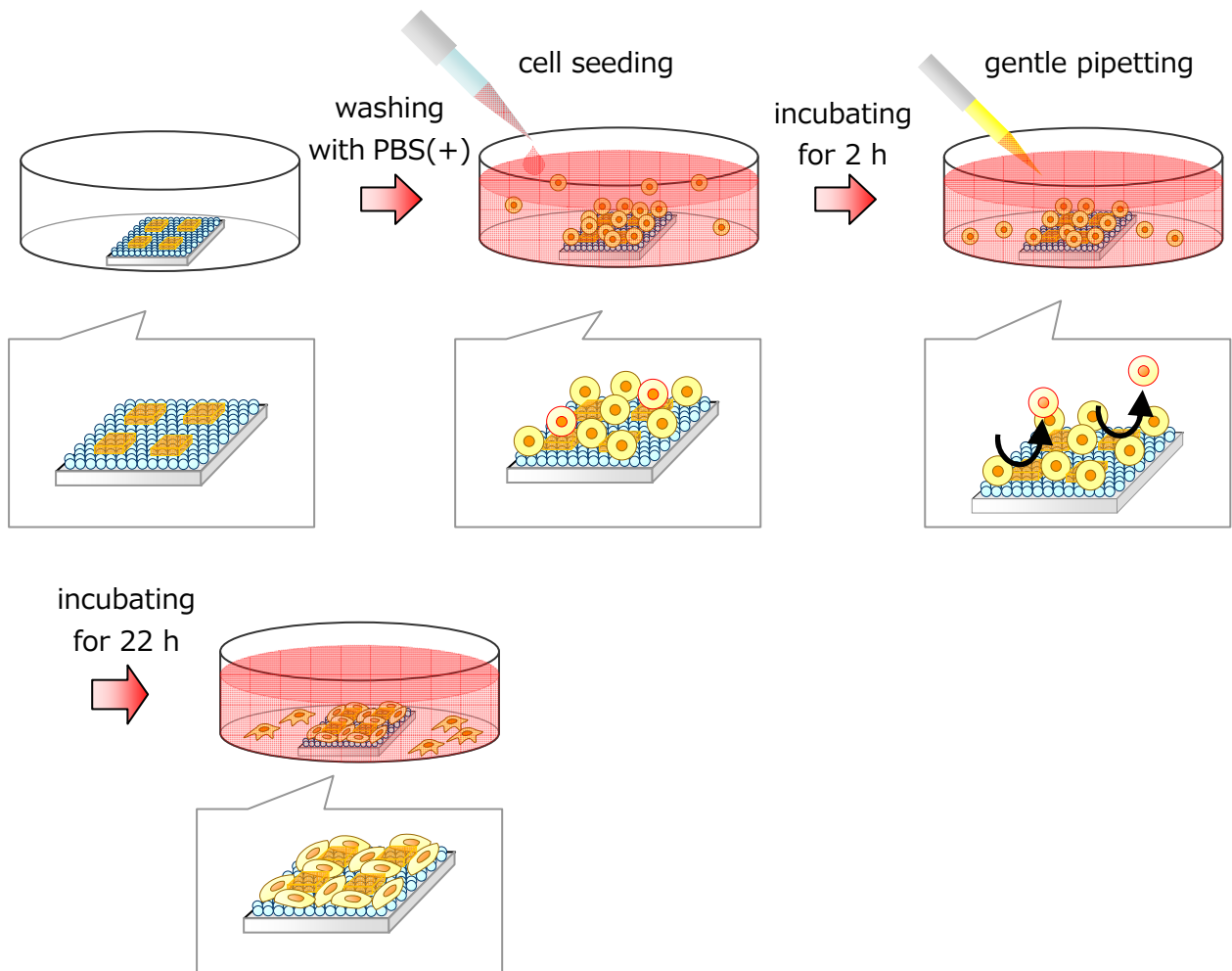
Scheme 4.2 Fabrication of a BSA-patterned particle monolayer by UV photopatterning.



Scheme 4.3 Cell culture on a BSA-patterned particle monolayer.



Scheme 4.4 Patterning of a BSA hydrogel layer on a particle monolayer.



Scheme 4.5 Cell culture on a BSA hydrogel-patterned particle monolayer.

4.1.5 フォトレジストを用いたパターン化細胞シートの作製

4.1.5.1 パターン化粒子膜の作製

<フォトレジストおよびフォトリソグラフィーについて>

本実験においては、フォトレジストを用いてパターンを作製した。フォトレジスト (photoresist) とはレジスト材料 (工業的に用いられる、薬品処理から保護するための材料) の一種であり、フォトリソグラフィーの工程に用いられるものを指す。フォトリソグラフィーとは、感光性の物質を塗布した基板の表面を、パターン状に露光することで、露光された部分と露光されていない部分からなるパターンを生成する技術のことである。現在フォトリソグラフィーは半導体素子、プリント回路、印刷版、液晶ディスプレイパネル、プラズマディスプレイパネルなどの製造に用いられている。

通常、フォトレジストは光と反応してその物性 (溶媒に対する溶解性など) が変化する。フォトレジストの種類はポジ型とネガ型に分類される。ネガ型は、露光された部分における現像液に対する溶解性が低下し、現像後に露光部分が残る。一方、ポジ型は露光部分において現像液に対する溶解性が増大し、露光部が除去される。ネガ型はパターンの現像時に溶媒がレジストを膨潤させるため、パターンの微細化には不利である。そのため現在ではポジ型が主流となっている。

<TSMR-8900 について>

本実験で使用した TSMR-8900 (東京応化工業) はポジ型フォトレジストであり、ノボラック樹脂 (Figure 4.3a) と *o*-ナフトキノンジアジド化合物 (Figure 4.3b) の混合物である。露光部では *o*-ナフトキノンジアジドがケテンを経てインデンカルボン酸に変化し、アルカリ溶液に対する溶解性が増大する (Scheme 4.6)。一方、非露光部では、*o*-ナフトキノンジアジドとノボラック樹脂が NaOH によって反応し、アゾ色素が生じてアルカリ難溶性となる (Scheme 4.7)。

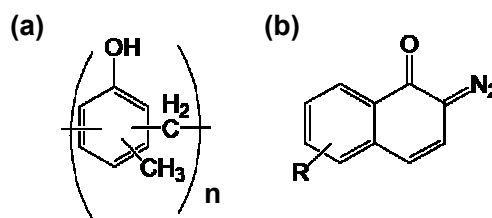
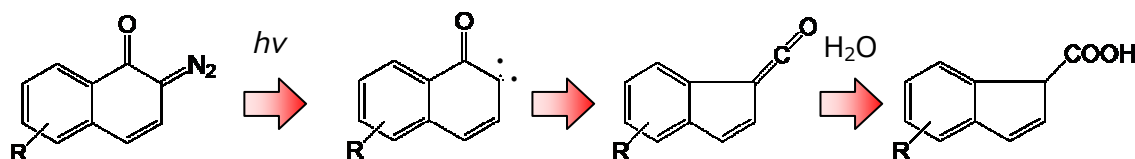
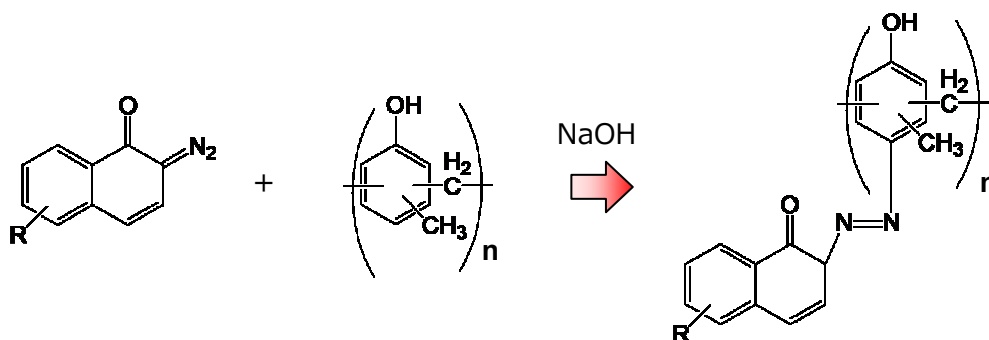


Figure 4.3 The chemical structure of a novolak resin (a) and a *o*-naphthoquinone diazide compound (b).



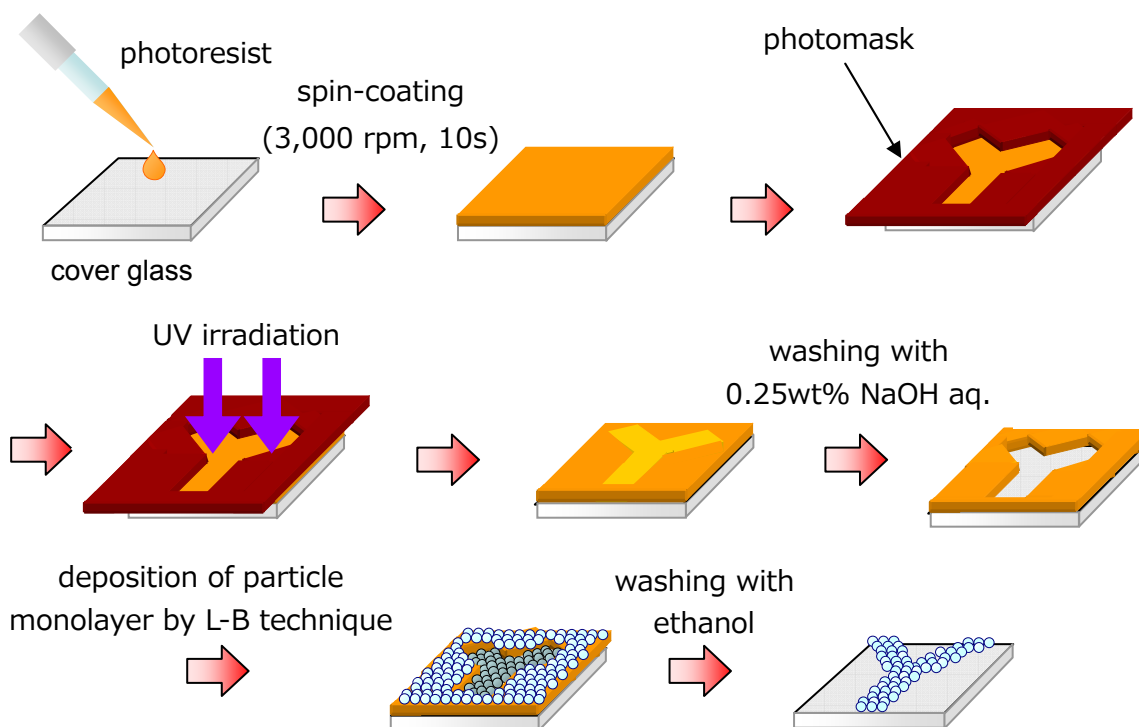
Scheme 4.6 Change in chemical structure of *o*-naphthoquinone diazide by UV irradiation.



Scheme 4.7 Crosslinking of a photoresist by NaOH at the non-irradiated area.

<実験操作>

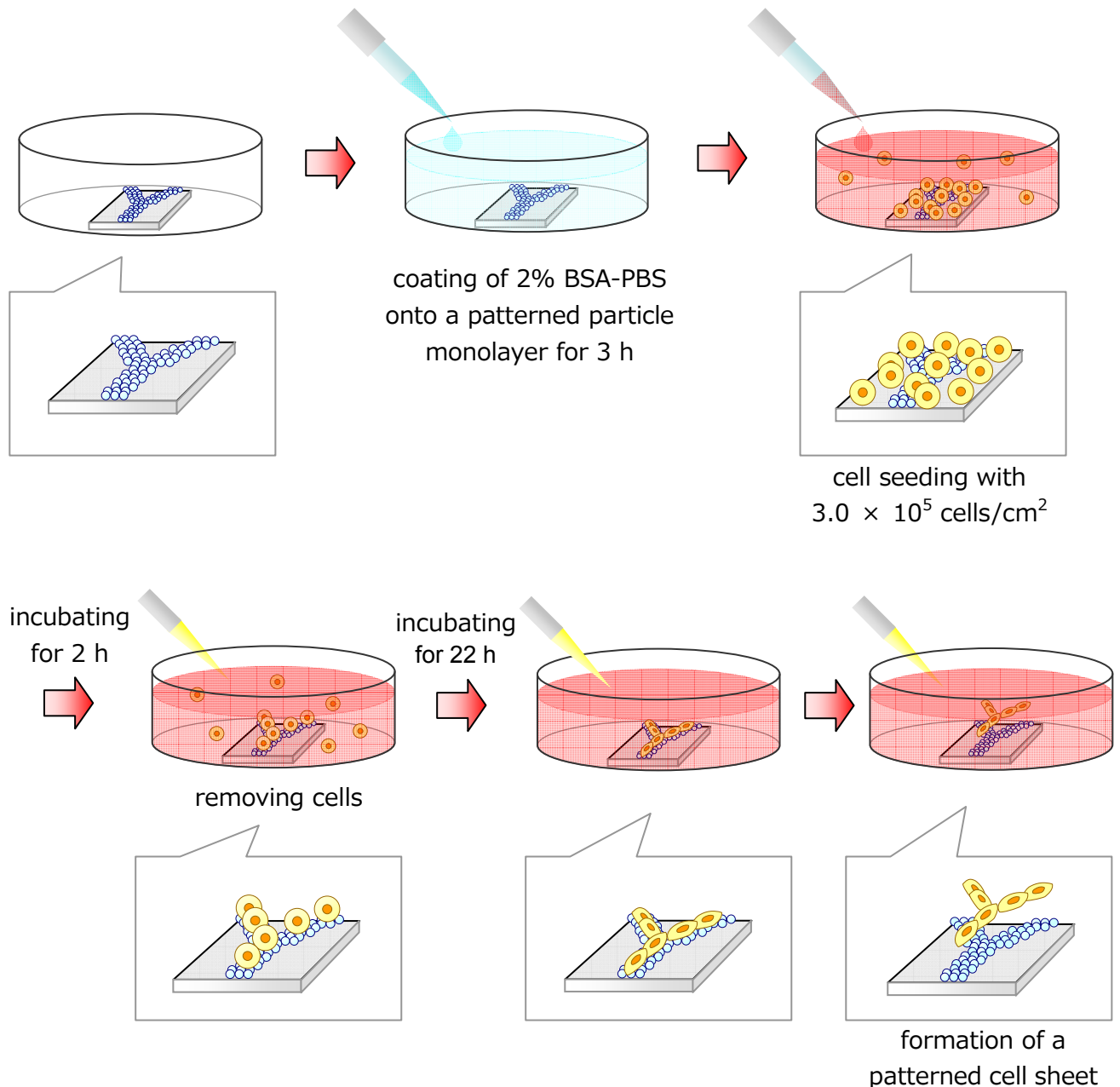
具体的なパターン化粒子膜の作製法を Scheme 4.8 に示す。まず円形カバーガラス（直径 15 mm）にフォトレジスト(TSMR-8900、東京応化工業)200 μl を滴下し、すぐにスピコート機 (SPINCOATER 1H-D3, MIKASA 社) でスピコートを行い (3000 rpm, 10s)、カバーガラス上にレジストをコーティングした。ここで 80 $^{\circ}\text{C}$, 15 min の条件でレジストのプリベークを行った。次に、フォトマスクを用いて UV (365 nm) を照射し、レジストにパターンを転写した。パターンを現像するために、0.25wt% NaOH 水溶液中に 1 min 浸漬させ、UV 照射部位を溶解し、さらに蒸留水に 1 min 浸漬して洗浄した。その後 80 $^{\circ}\text{C}$, 15 min の条件でレジストのポストベークを行った。次に、L-B 法によってレジストパターン上に粒子膜を累積した (今回は SA527 粒子のみを用いた)。そして室温で一晩乾燥させた後、エタノール中に粒子膜を浸漬させ、レジストおよびレジストの上に堆積している粒子を除去した。さらにエタノールで 3 回洗浄し、自然乾燥させて目的のパターン化粒子膜を得た。



Scheme 4.8 Fabrication of a patterned particle monolayer.

4.1.5.2 パターン化細胞シートの作製

作製したパターン化粒子膜を 70%エタノール中に浸漬して滅菌処理した後、クリーンベンチにて PBS(+)で洗浄して使用した。ここで、カバーガラスに対する細胞接着を抑制するためのブロッキング処理として、2%BSA 溶液中にパターン化粒子膜を浸漬し、一晩インキュベートした。インキュベート後、PBS (+) で洗浄した。その後、PBS (+) に分散させた HUVEC を 3.0×10^5 cells/cm² の密度で播種した (全量 1 mL)。そして 37℃、5%CO₂ 環境下で 2 h 培養後、カバーガラス上に接着した余分な細胞を軽くピペッティングすることによって除去した。さらに溶液を PBS (+) から細胞培養メディウム 1 mL に交換し、培養を継続した。細胞を播種してから 24 h 後に、マイクロピペットによってピペッティングを行い、細胞シートを剥離させた。



Scheme 4.9 Formation of a patterned cell sheet by cell culture on a patterned particle monolayer.

4.2 実験結果

4.2.1 光反応性 BSA のフォトパターンニングによる細胞接着の制御

4.2.1.1 パターンニング条件の検討

UV の照射時間を変化させることにより、照射時間と得られるパターンの関係を調べた。結果を Figure 4.4 に示す。その結果、TCPS では UV 照射時間が 3 分の場合に最も明瞭なパターンを得ることができた。UV 照射時間 2 分の場合にはパターンがほとんど確認できなかった。これは基板と作用させた時間が短いために BSA の吸着量が少ないということと、UV 照射時間が短いために ANB-NOS の反応率が低いということが原因として考えられる。また UV 照射時間 4 分の場合には基板上に全体的に BSA が固定化されており、パターンが不明瞭になった。これはフォトマスクの溝から入射した UV 光が漏れることによってパターンの周囲においても ANB-NOS が活性化し基板に固定化されたことによると考えられる。

一方、SA527 および SA1270 粒子膜においては UV 照射時間 2 分の場合に明瞭なパターンを得ることができた。これは、粒子膜が照射された UV 光を散乱したために ANB-NOS の光反応効率が上がったためではないかと考えられる。BSA の吸着性による影響も考えられる。

これらの結果より、以降の実験において TCPS においては UV 照射時間を 3 分、SA527 と SA1270 においては UV 照射時間を 2 分とすることにした。

4.2.1.2 細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm²

TCPS、SA527、SA1270 において細胞の接着形態を観察した (Figure 4.5)。いずれの基板上の細胞も BSA が固定化された部分を避けるように接着している様子が観察された。またそれぞれの基板を比較すると、細胞の伸展は粒子膜上では PS よりも抑制されているように見えた。また細胞骨格 (ストレスファイバー) の形成の度合を比較すると、TCPS > SA527 > SA1270 の順にストレスファイバーの形成が顕著に見られた。これらの結果はパターンニングを行っていない場合と同様の結果である。したがって BSA をパターンニングした後もパターンニングしない場合と同様に粒子膜の凹凸は細胞接着に対して影響を与えていることが考えられる。

一方、細胞播種密度 1.0×10^4 cells/cm² の場合には細胞同士の相互作用があまり見られなかった。これは細胞が BSA を避けて接着するために自由に移動することができず、細胞同士の遭遇する確率が低いためであると考えられる。そこでさらに細胞播種密度を高めることによって、細胞同士の相互作用を増加させることを試みた。

4.2.1.3 細胞播種密度 2.5×10^4 cells/cm² および 5.0×10^4 cells/cm²

ここでは細胞同士の相互作用の促進を目的として細胞播種密度をさらに高め、細胞組織体の構築およびその形状の制御を試みた。結果を Figure 4.6 に示す。細胞播種密度を 2.5×10^4 cells/cm² にすると、細胞同士の相互作用は増加するものの、同時に細胞は BSA を固定化した部分にも自由に接着・伸展するようになった。これは BSA 上であっても細胞播種密度を上げたことによって細胞同士の接着によって安定化したためであると考えられる。

さらに播種密度を 5.0×10^4 cells/cm² とした場合には、細胞がパターンニングした基板に対して一様に接着し、単層のドメインを形成した。これは一面を BSA でコートした基板や未処理の基板と同様の接着挙動である。しかしパターンニングした基板上に接着した細胞は BSA のパターンを完全に無視してい

るわけではなく、ストライプの方向に沿って変形している細胞が多く見られた。すなわち BSA をストライプ上にパターンニングした基板を利用して、細胞組織体の全体的な形態ではなく、組織体を構成する個々の細胞の形態を制御することができた。細胞組織体内部の細胞の形態を制御することは、これまでも細胞に伸縮刺激を与えることや、ストライプ上の凹凸を持つ基板を用いることによって実現されてきた。本研究においてはタンパクをパターンニングすることによって厳密な細胞接着の制御は行うことはできなかったが、細胞組織全体の形態を制御することが可能となった。

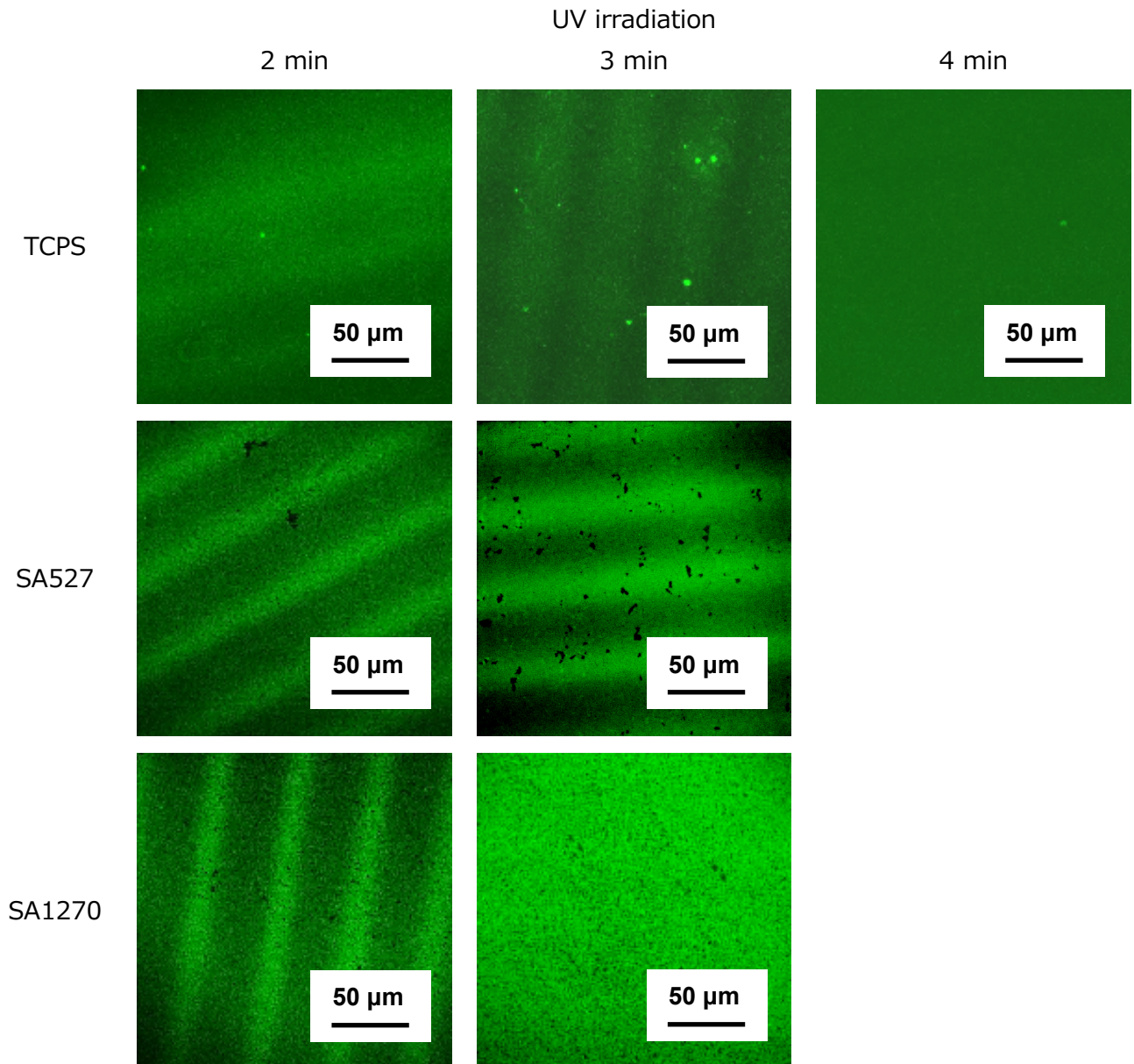


Figure 4.4 Fluorescent microscopic images of patterns of FITC-BSA (green) on particle monolayers.

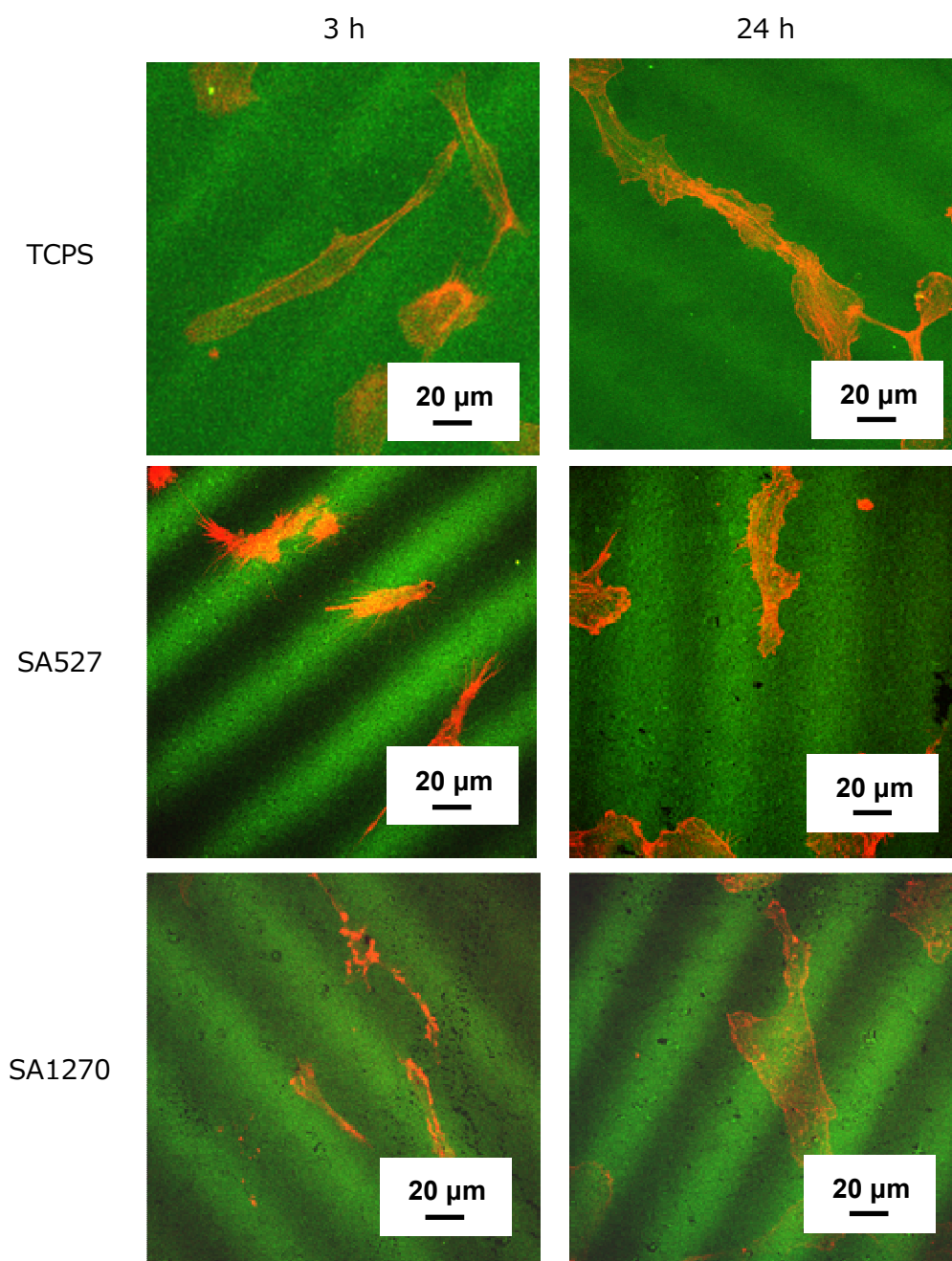


Figure 4.5 Confocal microscopic images of HUVECs adhering onto patterns of FITC-BSA (green). Cells were cultured for 24 h, and stained with rhodamine-conjugated phalloidin (red).

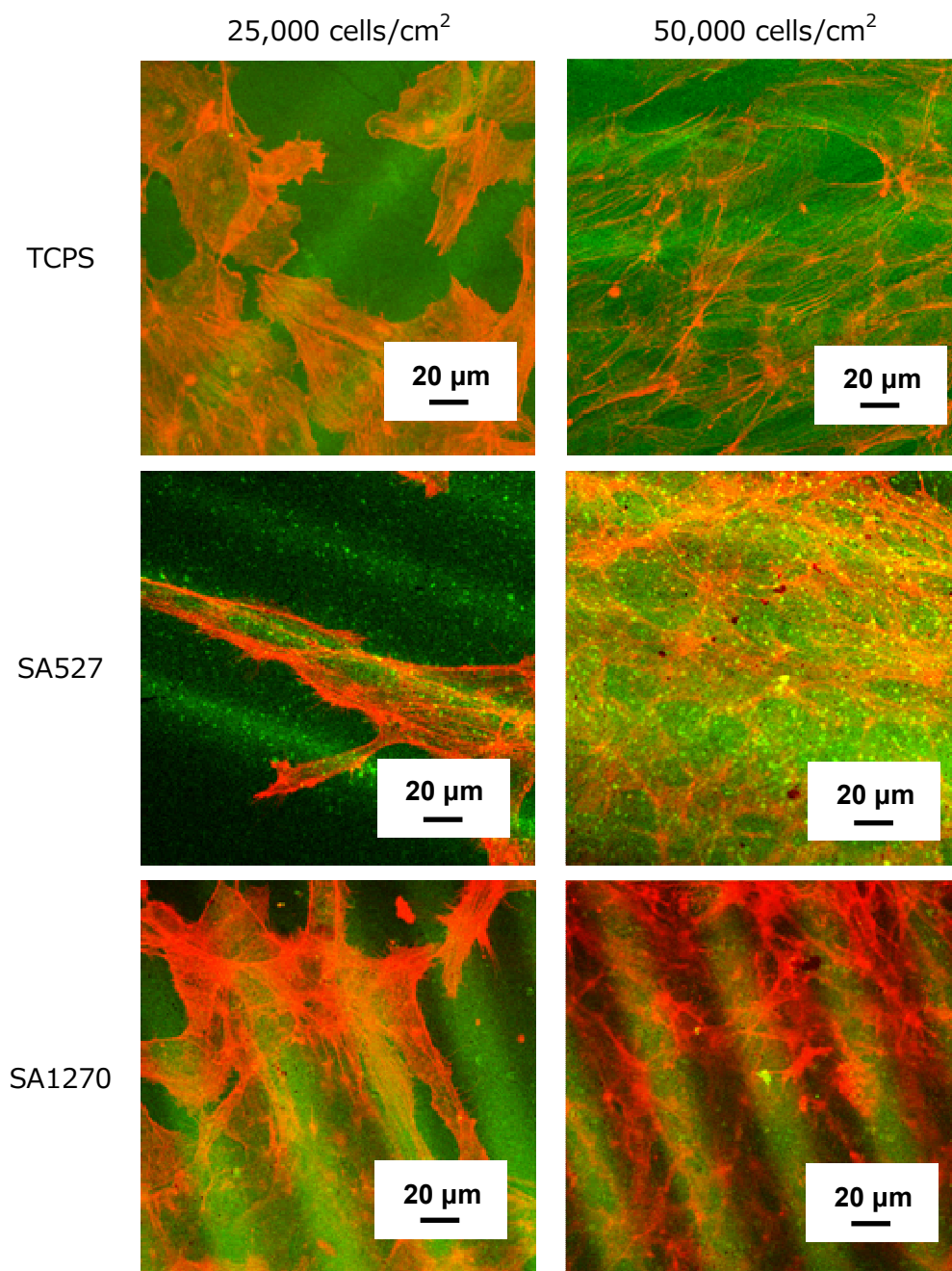


Figure 4.6 Confocal microscopic images of HUVECs adhering onto patterns of FITC-BSA (green). Cells were cultured for 24 h, and stained with rhodamine-conjugated phalloidin (red).

4.2.2 BSA ハイドロゲルのパターンニングによる細胞接着の制御

<パターンの作製法>

まず、UV 照射時間の検討を行った。照射時間を 10, 15, 20, 25 および 30 秒と変えてパターンの作製を行い、PBS(+)で洗浄した後の BSA ハイドロゲルパターンを光学顕微鏡にて観察した (Figure 4.7)。その結果、UV 照射 10 秒ではパターンが不明瞭であり、光反応が不十分であった。また 30 秒ではマスクした領域にもゲルが形成され、パターンの形状が崩れてしまった。したがって、UV 照射時間は 15~25 秒が適当であることがわかった。

<光学顕微鏡による細胞パターンの観察>

作製したパターン (UV 照射時間 15, 20 および 25 秒) に対して細胞を 5.0×10^4 cells/cm² となるように播種し、培養 3 h および 24 h 後に光学顕微鏡で観察を行った (Figure 4.8, 4.9)。UV 照射時間を変化させると光反応による BSA 同士の架橋反応の進行が変化するため、ゲルのサイズや硬さが変化すると考えられる。しかし BSA ゲルの細胞接着抑制効果について UV 照射時間による差は見られず、最終的に得られる細胞組織に大きな差は無いように思われた。

また、培養時間による細胞接着性の変化が見られた。培養 3 h 後において細胞は BSA ゲル部分を避け、基板が露出した部分に接着・伸展していた。しかし培養 24 h 後においては、細胞は BSA ゲルの上に対しても接着・伸展してしまい、パターン化細胞組織の形状が崩壊してしまった。おそらく、培養初期において BSA ゲルは細胞接着を抑制する効果を持っているが、培養時間が長くなるにつれて細胞培養メEDIUM中の血清タンパク質が吸着するため、細胞接着の抑制効果が失われてしまったと考えられる。固定化した BSA には他のタンパク質は吸着しにくいはずである。FITC ラベル化や ANB-NOS との反応によって BSA が疎水的になり、変性を起こしてしまった可能性が考えられる。

<共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による細胞パターンの観察>

続いて、細胞のアクチン細胞骨格を染色した後、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡によって細胞および BSA ゲルパターンの観察を行った (Figure 4.10, 4.11)。培養 3 h 後では、それぞれの基板の影響が明確に現れた。TCPS では細胞はストレスファイバーを形成して基板に伸展した。一方、SA527 粒子膜上の細胞は細胞同士で集合している様子が観察された (Figure 4.10 破線部分)。また SA1270 粒子膜においては、細胞同士で接触できる部分では細胞同士が接着していたが、細胞が単独で存在している場合には細胞が球状のまま接着している様子が観察された (Figure 4.10) これらの結果から、UV 非照射部位においては基板表面の形状が維持されていることと考えられた。

培養時間が 24 h の場合は、光学顕微鏡の観察結果と同様に、細胞のパターンが崩れている様子が観察され、それぞれの基板の特徴は見られなくなってしまった (Figure 4.11)。これは細胞が BSA ゲル上にも接着するようになったためだと考えられる。

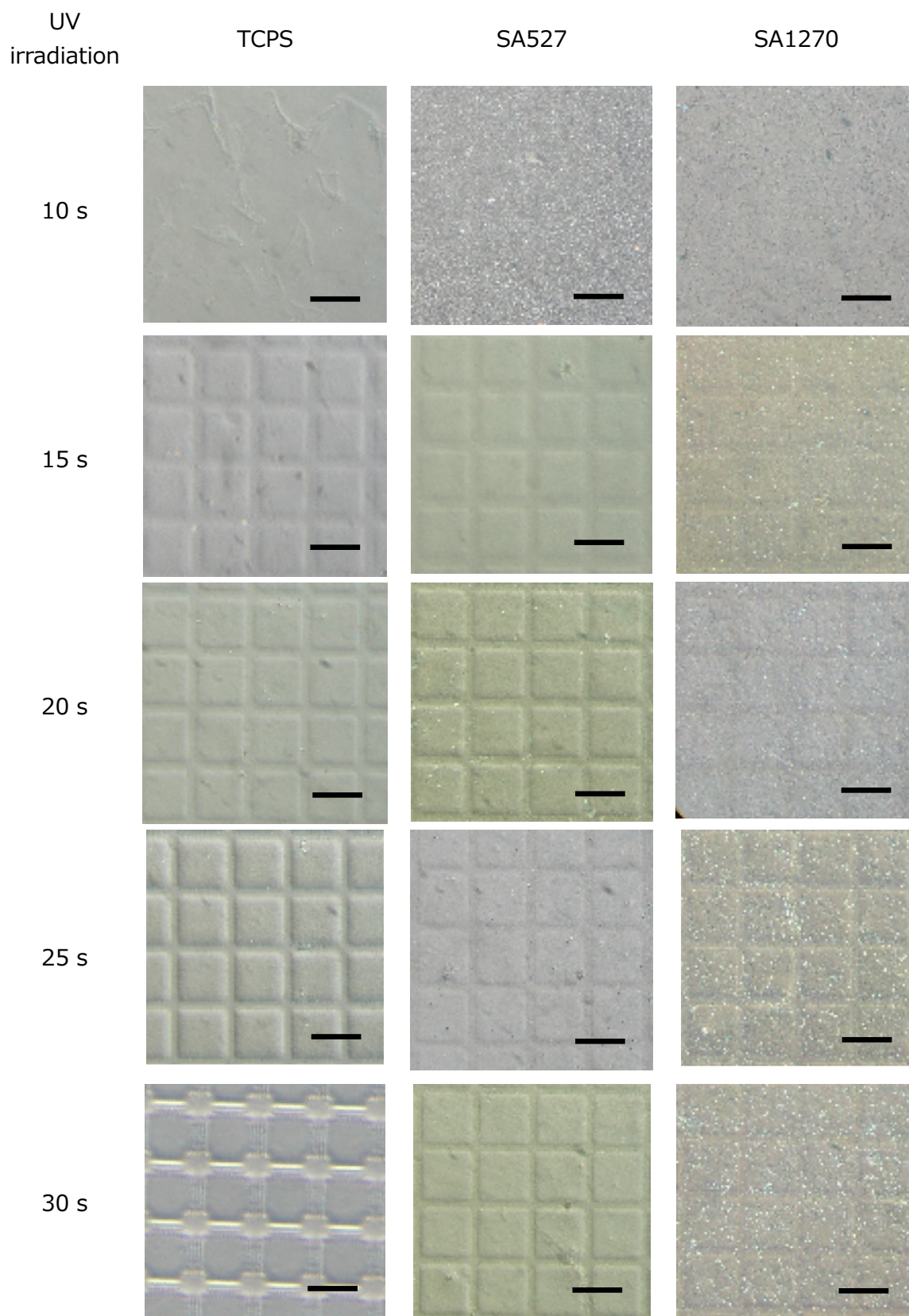


Figure 4.7 Optical microscopic images of BSA hydrogel patterns on a TCPS, an SA527 particle monolayer and an SA1270 particle monolayer. Scale bars indicate 100 μm .

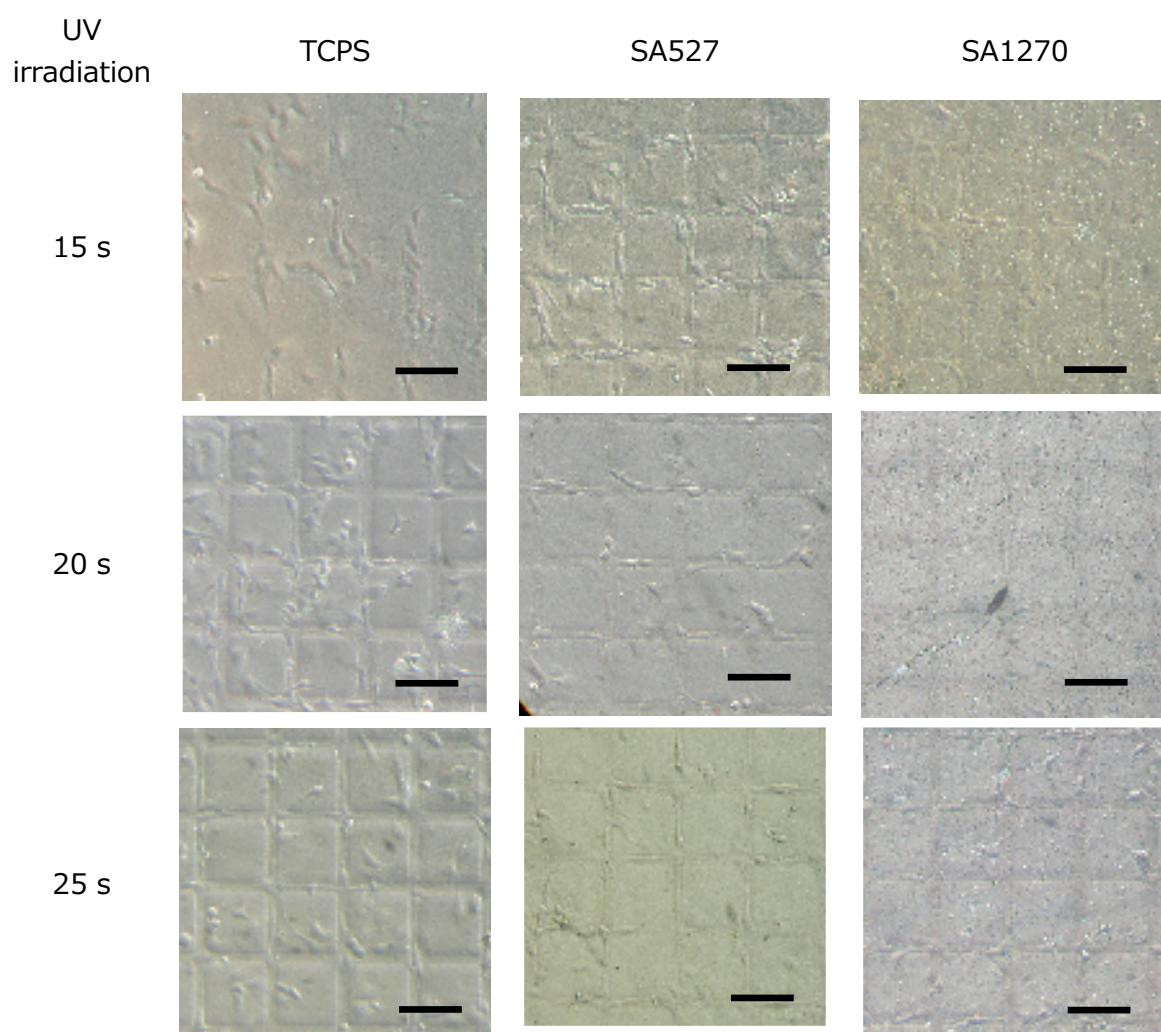


Figure 4.8 Optical microscopic images of HUVECs on BSA hydrogel patterns of a TCPS, an SA527 particle monolayer and an SA1270 particle monolayer 3 h after incubation. Scale bars indicate 100 μm .

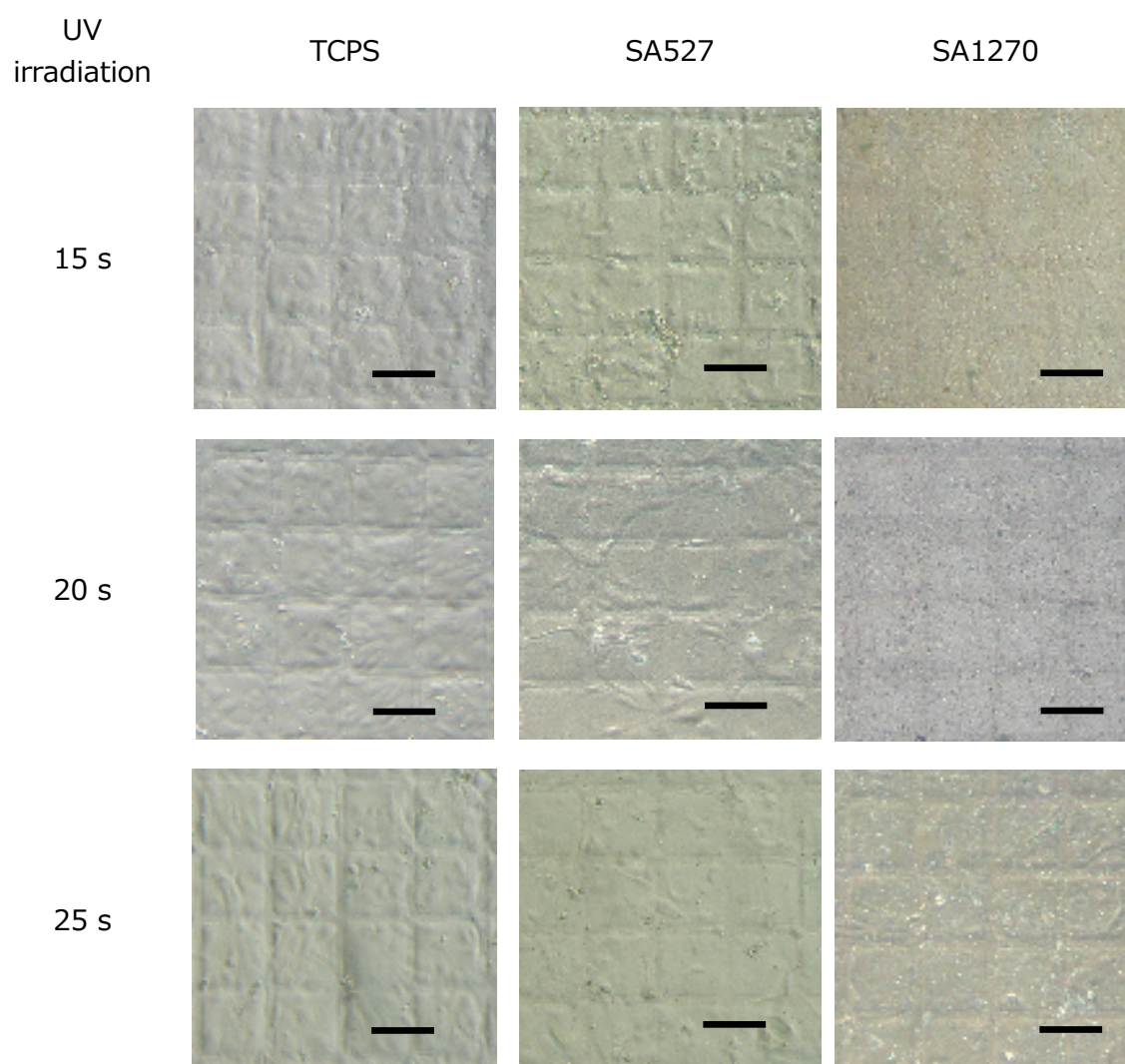


Figure 4.9 Optical microscopic images of HUVECs on BSA hydrogel patterns of a TCPS plate, an SA527 particle monolayer and an SA1270 particle monolayer 24 h after incubation. Scale bars indicate 100 μm .

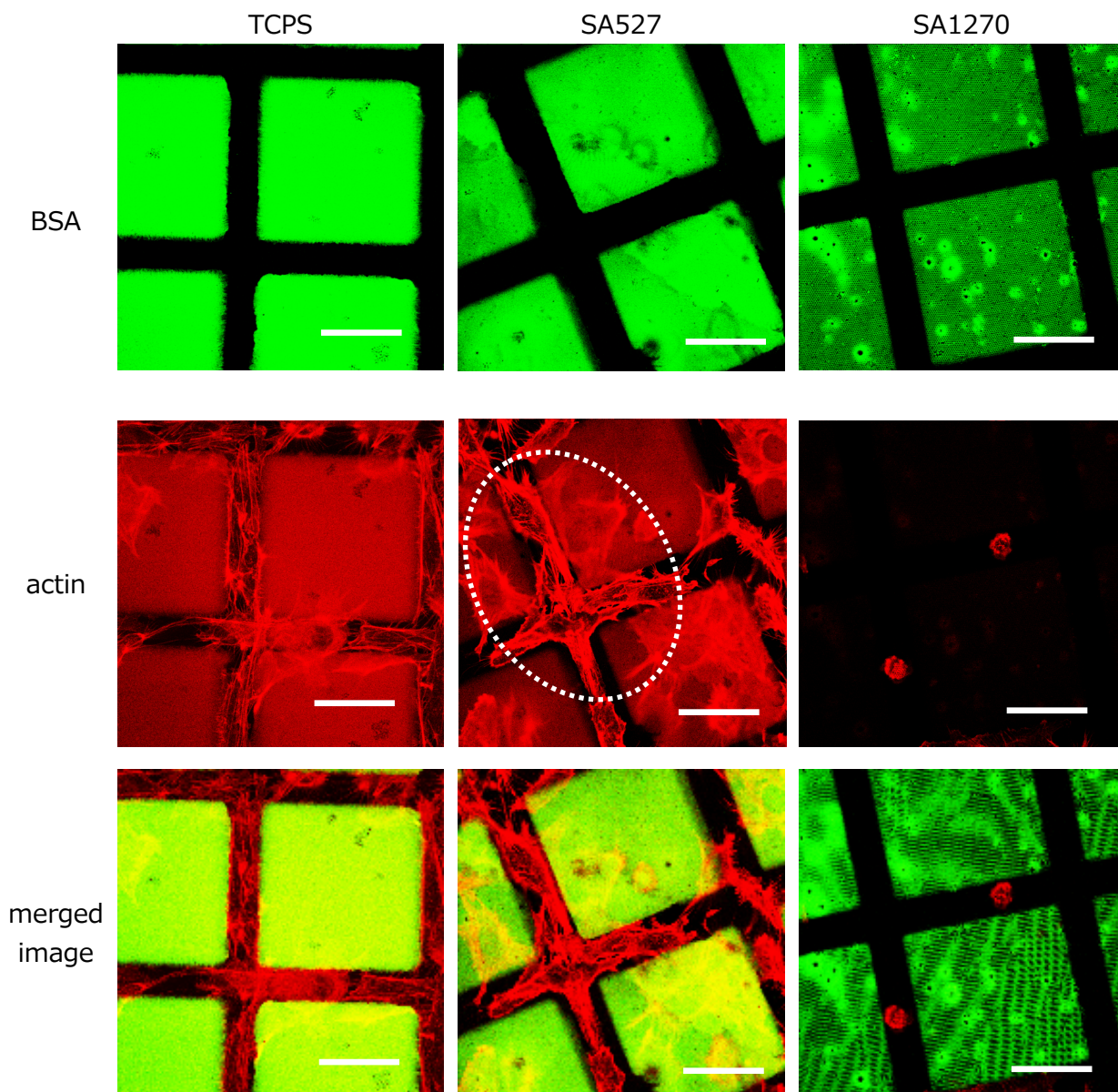


Figure 4.10 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton of HUVECs and BSA hydrogel patterns of a TCPS, an SA527 particle monolayer and an SA1270 particle monolayer. Cells were incubated for 3 h. Scale bars indicate 50 μm .

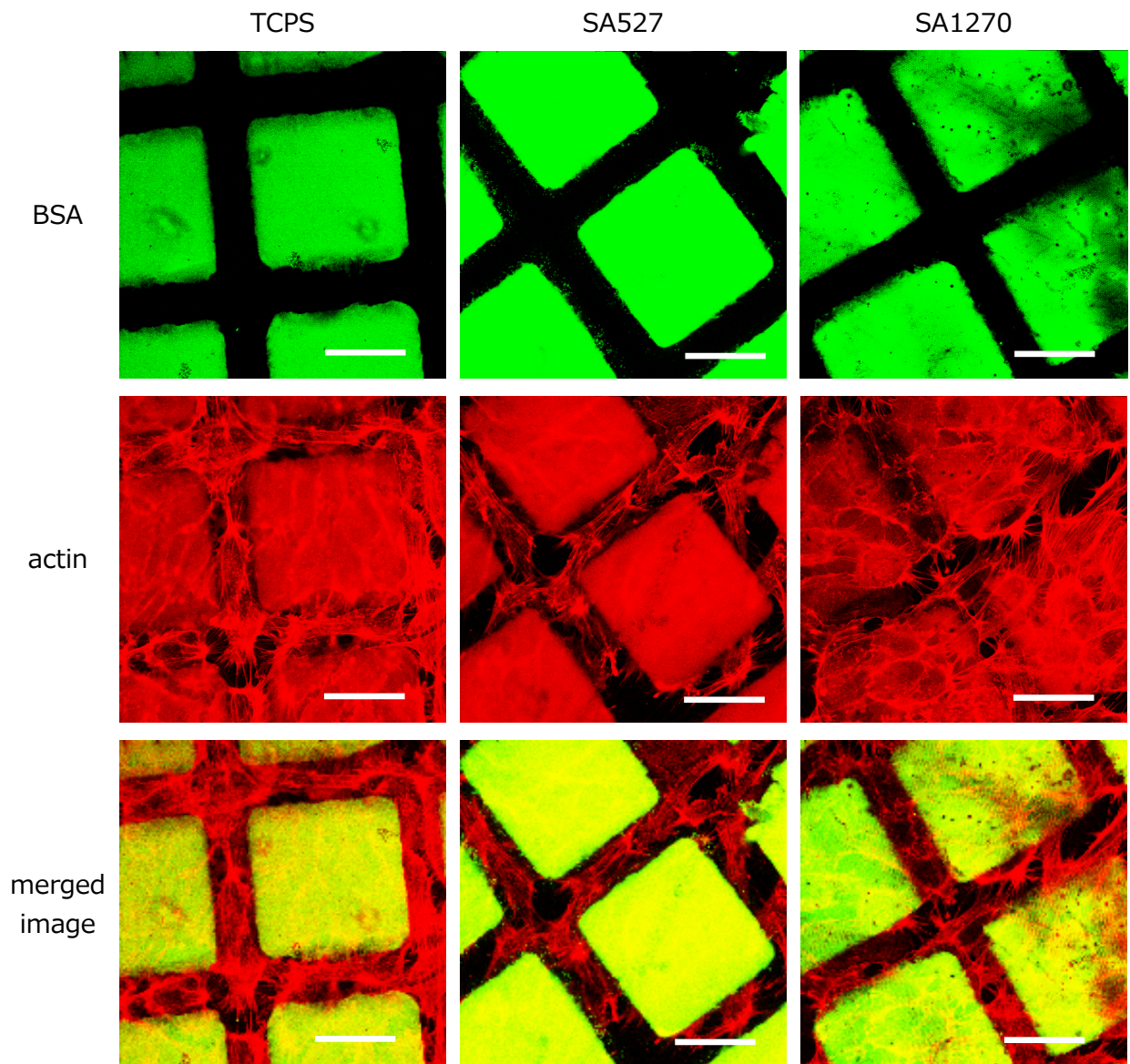


Figure 4.11 Confocal microscopic images of actin cytoskeleton of HUVECs and BSA hydrogel patterns of a TCPS, an SA527 particle monolayer and an SA1270 particle monolayer. Cells were incubated for 24 h. Scale bars indicate 50 μm .

4.2.3 フォトレジストを用いたパターン化細胞シートの作製

まずフォトレジストのパターンを作製し、さらにL-B法によってパターン化粒子膜を作製した。内皮細胞が網目状の血管ネットワークを構築することを考慮し、Y字型パターンや星型パターンを選択した。作製したレジストパターンを Figure 4.12 に示す。フォトリソグラフィーによってカバーガラス上にレジストのY字パターンが形成されたことがわかる。このパターンに対してL-B法によってSA527粒子膜を累積し、エタノール中に浸漬してレジストおよびその上に累積した粒子を除去した。その結果得られたパターン化粒子膜を Figure 4.13 に示す。写真から理解できるように、パターン化粒子膜の形状は作製したレジストパターンを反映したものとなった。

作製したパターン化粒子膜に対してBSAコートした後、細胞を播種して2 h 培養すると、細胞は全体的に接着した（細胞の形状は浮遊しているときと同様に球形だが、基板に対して付着している状態, Figure 4.14a）。ここでマイクロピペットを用いて、カバーガラスが露出している部分の細胞を剥離・除去した。このとき粒子膜上の細胞は接着したままであった（Figure 4.14b）。この状態でさらに培養を続けると、24 h 培養後（余分な細胞を除去してから22 h 後）には細胞が粒子膜上で伸展していた（Figure 4.14c, d）。ただし、カバーガラス上にも細胞が伸展・移動していたため、BSAによる細胞接着の抑制は完全に抑制できなかったことがわかった。

この後、細胞をマイクロピペットによるピペッティングで剥離させた。細胞は基板の端から徐々に剥離し（Figure 4.15a, b）、最終的に、パターン化粒子膜の形状を反映したY字型細胞シート（Figure 4.15c）や星型細胞シート（Figure 4.15d）を作製することができた。ここで剥離させた後の基板を光学顕微鏡で観察したところ、粒子膜上に接着していた細胞は剥離したのに対し、カバーガラス上の細胞は剥離することなく基板に接着したままであった（Figure 4.15e）。BSAによる細胞接着領域の制御は完全ではなかったが、粒子膜上の細胞のみが選択的に剥離することによってパターン化細胞シートを作製できることがわかった。

<先行研究との比較>

・パターン化粒子膜について

本実験で作製したパターン化粒子膜は、Zheng らや Yap らが作製した粒子配列パターンと外観が類似している^{7,8)}が、粒子の使用目的という点で全く異なっている。Zheng らは細胞接着性トリペプチド Arg-Gly-Asp (RGD) を表面に固定化した微粒子を静電相互作用によって基板にパターンニングすることで、基板における“細胞の接着領域”を制御している⁷⁾。また Yap らはフォトレジストパターンをテンプレートとして移流集積法で粒子をパターンの溝に配列させ、その上に細胞を播種しており、粒子の疎水性を利用して“細胞の接着領域”を制御している⁸⁾。それに対して本実験では“細胞の剥離性”を制御する目的のためにパターン化粒子膜を用いている。

・パターン化細胞シートについて

パターン化細胞シートの先行研究としては Hatakeyama らの例が挙げられる。Hatakeyama らは、マスクを用いて電子線重合を行うことによってパターン化温度応答性培養皿を作製している。そしてメッシュ型パターンの細胞シートを作製できることを示した⁹⁾。Hatakeyama らは、温度応答性培養皿に対して細胞接着性ペプチド RGD や成長因子であるインスリンをパターンニングし、細胞の接着領域を制御している。しかしこのパターン化基板においては、培養時間が長くなるにつれてパターン化細胞組織の形状が崩壊し、均一な細胞単層になってしまう。また培養時間が長すぎると、細胞シートの剥離挙動

が変化してしまう。そのため、パターンの形状を維持した細胞シートを剥離させるためには培養条件の最適化が必要となる。本研究におけるパターン化細胞シートの作製法は、細胞の接着領域の制御については必ずしも十分ではなく、培養条件の最適化も必要であると考えられる。しかし、低温処理によって細胞に悪影響を与える可能性がないこと、細胞シートの剥離操作が短時間で済むことは利点であろう。

・パターン化共培養細胞シートについて

また、パターン化をさらに推し進めた例として、Tsuda らの研究が挙げられる¹⁰⁾。Tsuda らは温度応答性培養皿において肝細胞と内皮細胞からなるパターン化共培養細胞シートを作製した。異なる2種類の温度応答性ポリマーをそれぞれ基板上に固定化し、パターンを作製している。Tsuda らの用いた手法では、細胞培養の段階で通常の培養温度(37℃)よりも低い温度(27℃)で2日間以上培養するステップが必要となる。この低温培養は細胞増殖性や細胞機能の発現において効率的とは言えず、また培養中に細胞に何らかの悪影響を与える可能性も否定できない。もし粒子膜を用いてパターン化共培養細胞シートを作製することができれば、低温培養や低温処理は必要ないため、より効率的に細胞を培養できる可能性がある。

本研究にて作製したパターン化粒子膜においては、カバーガラス上と粒子膜上に別々の細胞を接着させることによって、パターン化共培養が可能であると考えられる。しかし、剥離可能なのは粒子膜上の細胞だけであり、カバーガラス上に接着した細胞がピペッティングによって剥離するとは限らない。したがってパターン化粒子膜を用いてパターン化共培養細胞シートを作製するためには、更なる工夫が必要となるだろう。例えば、マイクロコンタクトプリンティングを用いて細胞接着性タンパク質を粒子膜上にスタンプしたパターン化粒子膜を作製すれば、粒子膜上で2種類の細胞組織パターンを作製でき、パターン化共培養細胞シートを作製できるかもしれない。

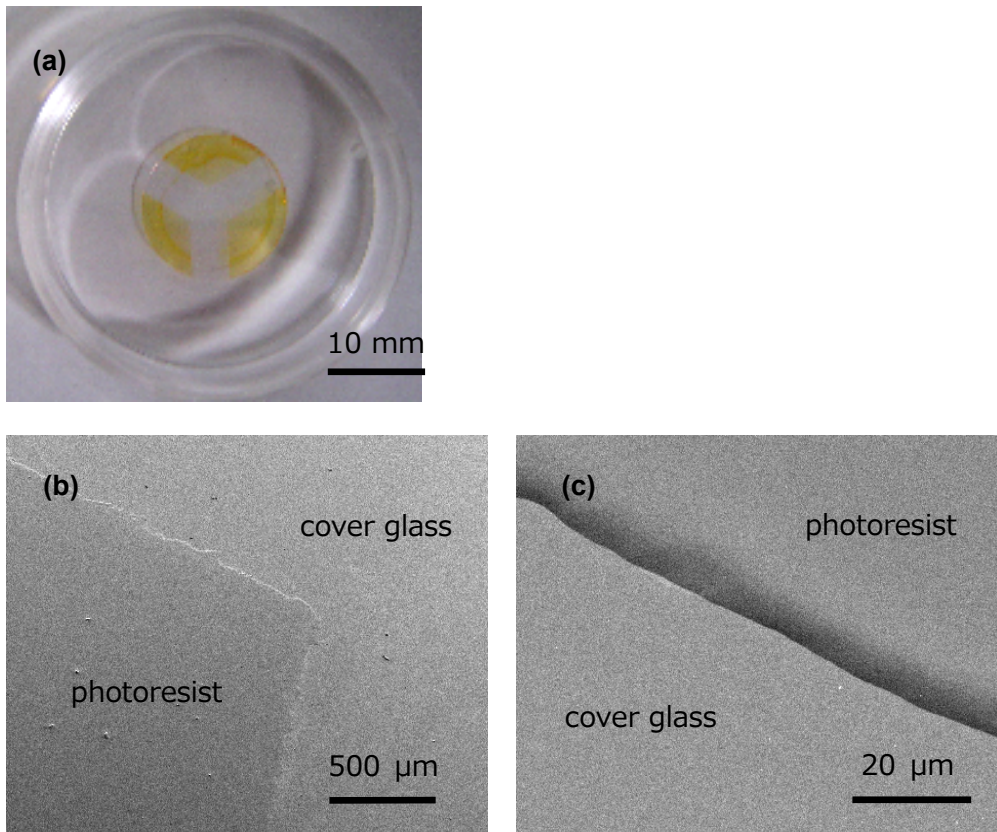


Figure 4.12 An optical microscopic image (a) and FE-SEM images (b and c) of a photoresist pattern on a cover glass.

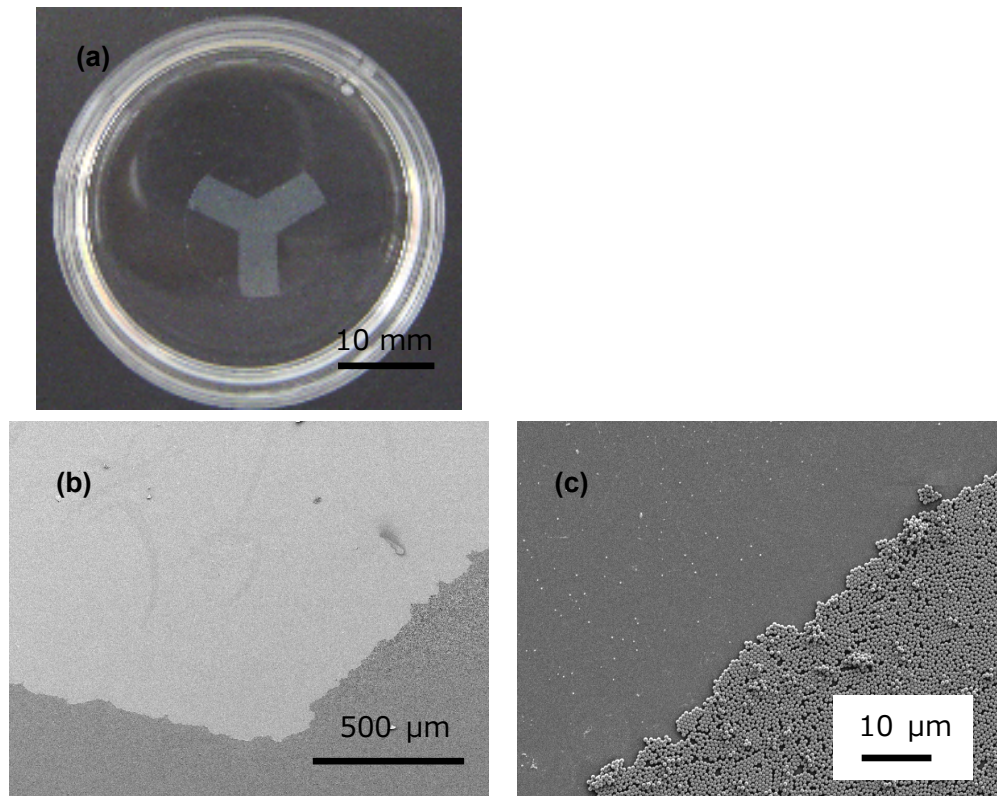


Figure 4.13 An optical microscopic image (a) and FE-SEM images (b and c) of a patterned particle monolayer.

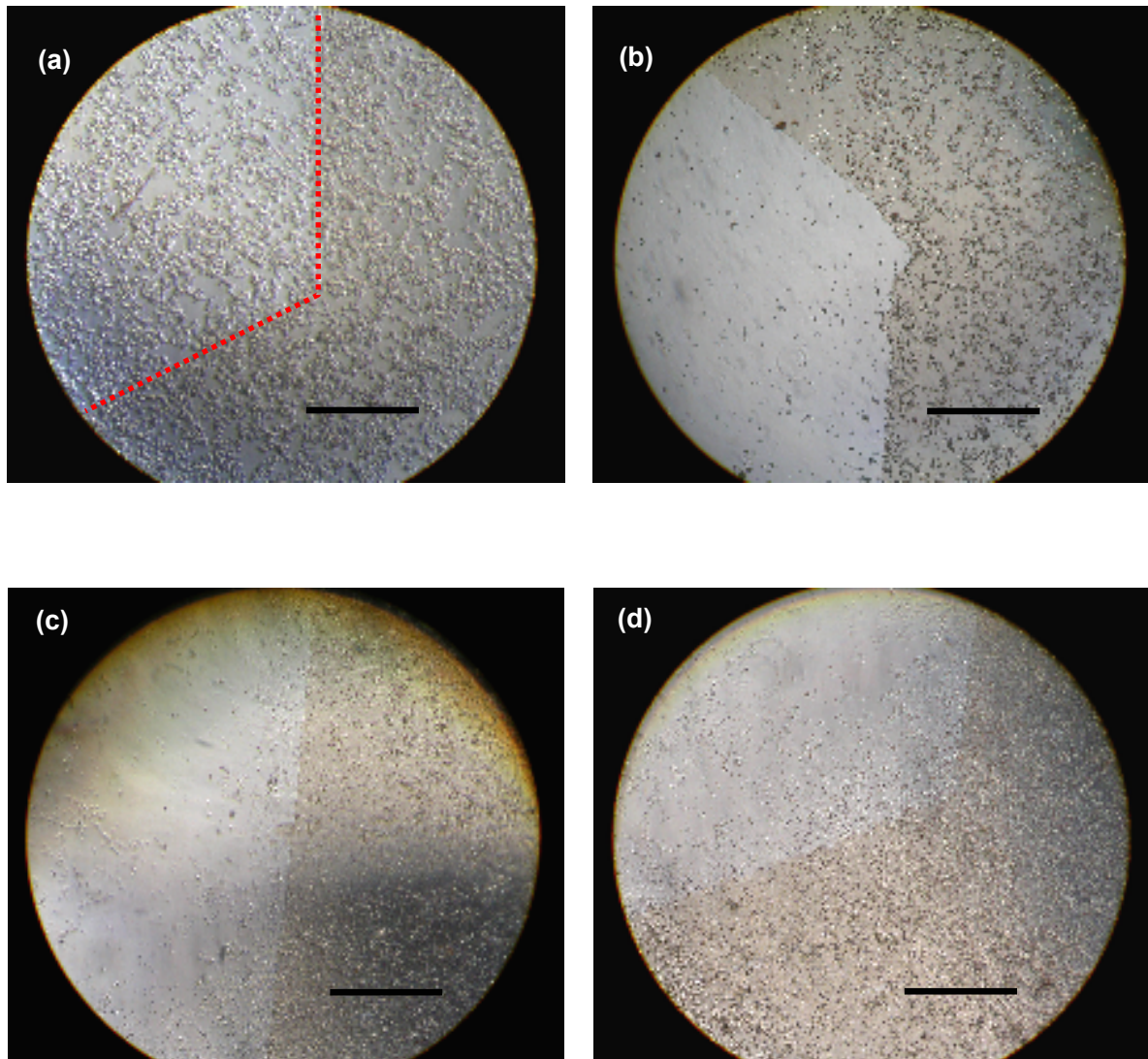


Figure 4.14 Optical microscopic images of HUVECs adhering onto a patterned SA527 particle monolayer 2 h (a and b) and 24 h (c and d) after incubation. Scale bars indicate 1 mm.

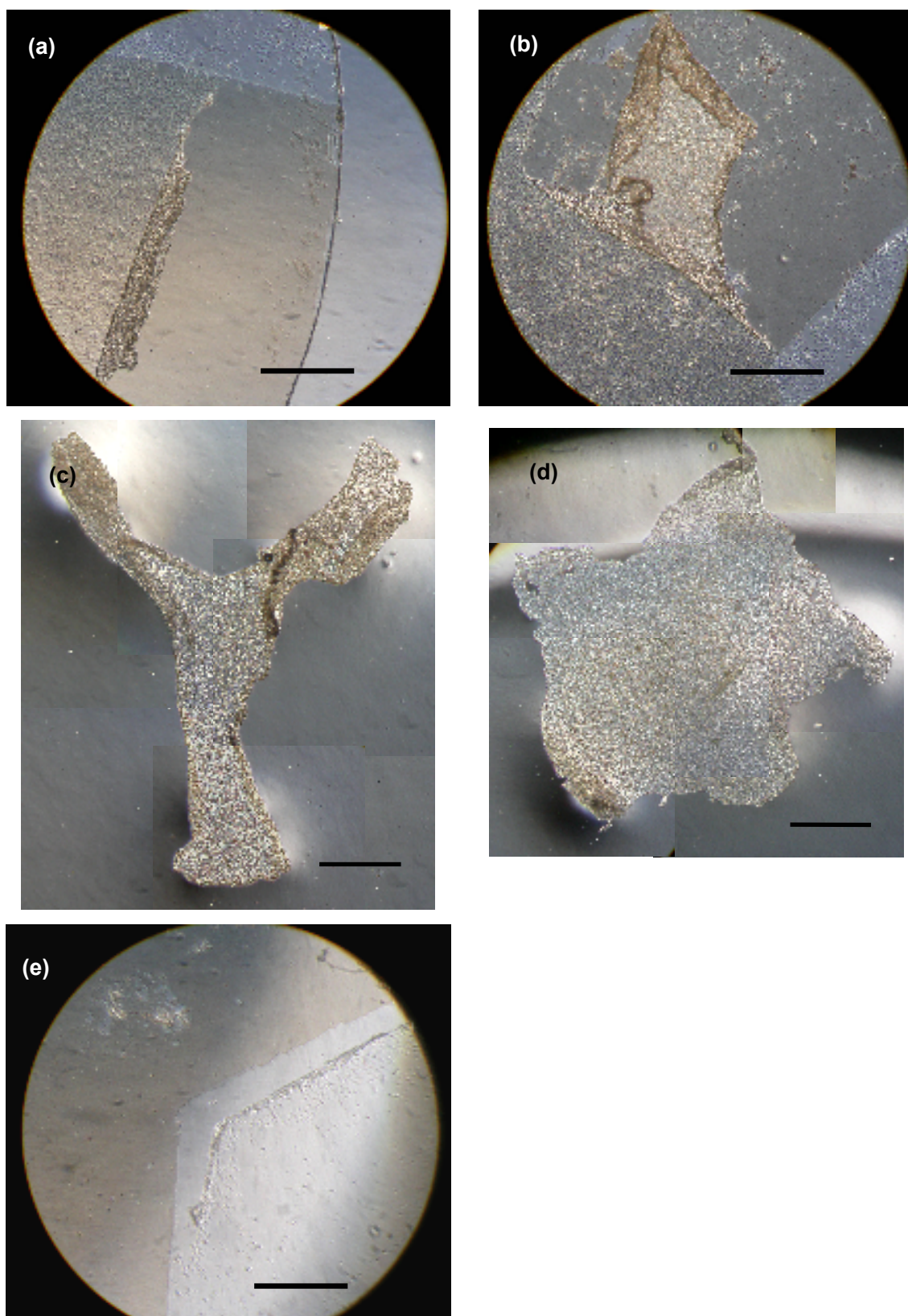


Figure 4.15 Optical microscopic images of cell detachment from a patterned SA527 particle monolayer (a and b), peeled cell sheets (c and d) and a patterned SA527 particle monolayer after cell detachment (e). Scale bars indicate 1 mm.

4.3 結論

BSA をフォトパターンニングした粒子膜では、パターンニングしていない基板の場合と同様に、細胞骨格の形成は凹凸のピッチが大きくなるほど抑制された。これは粒子膜の凹凸は BSA をパターンニングした後も細胞に対して影響を与えていることを示している。播種密度が低い場合には、細胞は BSA をパターンニングした部分を避けるように接着した。しかし播種密度を上げることによって細胞—細胞間の相互作用は増加し、BSA のパターンニングされている領域に対しても細胞が接着するようになった。これは細胞接着の抑制が完全ではないことを示している。しかしながら、接着した細胞の細胞骨格を観察すると、細胞は BSA のストライプ状のパターンに沿って配向しながら接着していた。つまり本実験において BSA をパターンニングした基板を利用して一方向に配列した単層の細胞組織体の作製が可能であった。

また今後の展望としてはストライプ状の細胞組織体を作製することである。内皮細胞をストライプ状に配列させると毛細血管が形成されることが知られている。細胞—細胞間相互作用が促進されるという粒子膜の特性が細胞組織体の構築に対してどのような影響を与えるのかは非常に興味深い。

またフォトリソグラフィーを利用してパターン化粒子膜を作製し、細胞を播種して培養した後にピペッティングによって剥離させ、パターン化細胞シートを作製することができた。

4.4 参考文献

- 1) Xia YN, Whitesides GM, "Soft lithography", *Annual Review of Materials Science* 28, 153–84, 1998.
- 2) Kumar A, Whitesides GM, "Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol "ink" followed by chemical etching", *Applied Physics Letters* 63, 2002–2004, 1993.
- 3) Solomentsev Y, Bohmer M, Anderson JL, "Particle Clustering and Pattern Formation during Electrophoretic Deposition: A Hydrodynamic Model", *Langmuir* 13, 6058–6068, 1997.
- 4) Charest JL, Eliason MT, Garcia AJ, King WP, Talin AA, Simmons BA, "Polymer cell culture substrates with combined nanotopographical patterns and micropatterned chemical domains", *Journal of Vacuum Science and Technology B* 23, 3011–3014, 2005.
- 5) Tsuda Y, Yamato M, Kikuchi A, Watanabe M, Chen GP, Takahashi Y, Okano T, "Thermoresponsive Microtextured Culture Surfaces Facilitate Fabrication of Capillary Networks", *Advanced Materials* 19, 3633–3636, 2007.
- 6) Kobayashi A, Miyake H, Hattori H, Kuwana R, Hiruma Y, Nakahama KI, Ichinose S, Ota M, Nakamura M, Takeda S, Morita I, "In vitro formation of capillary networks using optical lithographic techniques", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 692–697, 2007.
- 6) Bettinger CJ, Zhang ZT, Gerecht S, Borenstein JT, Langer R, "Enhancement of In Vitro Capillary Tube Formation by Substrate Nanotopography", *Advanced Materials* 20, 99–103, 2008.
- 7) Zheng H, Berg MC, Rubner MF, Hammond PT, "Controlling Cell Attachment Selectively onto Biological Polymer-Colloid Templates Using Polymer-on-Polymer Stamping", *Langmuir* 20,

7215-7222, 2004.

- 8) Yap FL, Zhang Y, "Assembly of polystyrene microspheres and its application in cell micropatterning", *Biomaterials* 28, 2328–2338, 2007.
- 9) Hatakeyama H, Kikuchi A, Yamato M, Okano T, "Patterned biofunctional designs of thermoresponsive surfaces for spatiotemporally controlled cell adhesion, growth, and thermally induced detachment", *Biomaterials* 28, 3632–3643, 2007.
- 10) Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Chen GP, Okano T, "Heterotypic cell interactions on a dually patterned surface", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348, 937–944, 2006.

第5章

総括

本研究では、単層粒子膜を細胞の培養基材としての評価を行い、その性質を利用して細胞の接着形態および細胞機能の制御を行うことを試みた。

第2章では、モノマーにスチレンとアクリルアミドを用い、ソープフリー乳化共重合によって SA 粒子を作製した。重合条件を変えることによって平均粒子径が約 400 nm から約 1500 nm までの SA 粒子を作製することができた。Langmuir-Blodgett 法によって単層粒子膜の作製を行った。

また SA 粒子膜に対して細胞を播種し、その接着形態を観察した。その結果、SA 粒子が大きくなるほど細胞の伸展や移動は抑制されることがわかった。SA527 粒子膜では細胞の移動、増殖は起こっており、細胞同士が集合してドメインを形成している様子が観察された。一方 SA1270 粒子膜では単独で接着している細胞が多かった。これは粒子のサイズが大きく、細胞の伸展や増殖は抑制されたためであると考えられる。また、細胞接着についてより詳細に理解するために、細胞の糸状仮足（フィロポディア）を FE-SEM によって観察した。その結果、SA527 粒子膜上ではフィロポディアが粒子の頂点部分に対して接着していた。したがって粒子膜では細胞の接着面が制限されていると考えられる。また SA1270 粒子膜では粒子膜の裏側まで仮足が伸展している様子が観察された。これはフィロポディアの水平方向への伸展が抑制された結果であると考えられる。これらのことから単層粒子膜は細胞-基板間接着および細胞-細胞間接着を制御可能な培養基材であると考えられる。

第3章では SA527 粒子膜の特性を利用して細胞シートの作製を試みた。SA527 粒子膜は細胞が粒子の頂点部分に対して接着しており、細胞の接着面が点在しているため、ピペッティングによって細胞を簡単に剥離できた。細胞シートの作製法は2種類あり、細胞播種密度 2.0×10^5 cells/cm² で1日培養した後に剥離させる方法と、低濃度の FN をコーティングした SA527 粒子膜に対して細胞播種密度 5.0×10^4 cells/cm² で1週間培養した後に剥離させる方法がある。従来法（低温処理や酵素処理が必要）と比較して短時間で簡便に細胞シートを作製することができた。しかし SA527 粒子膜に対する FN コートが必要になるため、その点が解決されればより優れた培養基材になるだろう。また得られた細胞シートの細胞生存率は約 98%であり、ピペッティングによる細胞死はほぼ無視できることが示された。作製した細胞シートは15分以内に TCPS に再接着したことから、粒子膜を利用して作製した細胞シートは組織移植片として利用可能であることが示唆された。

第4章では細胞接着性のパターニングによって細胞の接着形態の制御を試みた。ここでは3種類の方法で細胞の接着領域の制御を試みた。まず光反応性を付与した BSA を作製し、フォトマスクを利用して粒子膜上に BSA を UV パターニングした。この BSA 固定化粒子膜に細胞を播種したところ、細胞の伸展方向はストライプ状パターンの方向とほぼ一致しており、細胞組織体としての配列化が可能であった。次に、光反応性 BSA を用いて BSA ゲルをフォトパターニングした基板も作製した。この BSA ゲルパターン化粒子膜に細胞を播種すると、培養3時間後には細胞が BSA ゲルを避けて基板の露出した部分に接着した。パターニング後も基板の凹凸構造が保たれていることがわかった。しかし培養24時間後には BSA ゲル上にも細胞が接着するようになってしまった。このパターニング法の改良として、BSA の代わりにポリエチレングリコールをパターニングすることによって、細胞の接着をより強く抑制

できる可能性がある。

またフォトリソグラフィーを利用してパターン化細胞シートを作製することができた。これを応用すれば任意の形状を持った細胞シートを作ることができるため、生体外で組織を再構築するために有用な方法であると考えられる。複数の細胞を共培養した細胞シートを作製することができれば、より生体に近い培養細胞を得ることも可能になると考えられる。

単層粒子膜のように、ナノスケールの構造を利用して細胞の接着および機能を制御できる材料は、組織工学用の培養基材としてだけでなく、癒着防止用フィルムや防汚（バイオフィルムの形成の抑制）などへの応用が期待される。

組織工学において現在求められていることは「いかにして目的とする細胞を得るか」、言い換えれば「いかにして細胞に目的の機能を発現させるか」である。細胞の機能は水溶性成長因子だけでなく、あらゆる細胞外環境の要素によって制御されていることは、既に述べた通りである。例えば、幹細胞の分化を制御できる培養基材があれば、目的の細胞だけを作り出すことが可能になり、再生医療は飛躍的に進歩するだろう。したがって内皮細胞だけでなく、その他の細胞を用いて単層粒子膜の評価を行うことは組織工学にとって重要であると考えられる。また、細胞によって凹凸構造による影響が異なる可能性もあり、粒子膜の新たな特性が発見されるかもしれない。

一方、臓器や組織の癒着は外科手術において術後に発生する合併症のひとつである。特に開腹手術では発生率が高く、腹痛や腸閉塞の原因となることが問題となっている。手術の際には組織や臓器が空気に露出するが、このとき組織が乾燥や酸化などの損傷を受け、組織の癒着が起こると考えられている。そこで、細胞同士が癒着しないように細胞の接着を抑制する癒着防止フィルムが用いられることがある。単層粒子膜のように細胞が接着しにくい材料を組織表面に貼付すれば、癒着防止にも効果があるだろう。

微生物が形成する構造体であるバイオフィルムは細胞外多糖によって構成されており、その内部に存在する微生物は抗生物質や免疫に対する抵抗性が高くなる。生態系では川の石や植物の表面などにバイオフィルムが形成され、自然界における浄化作用にも関わっていることが知られている。医療においてはカテーテル表面に黄色ブドウ球菌等がバイオフィルムを形成し、感染症の原因となっている。そこで単層粒子膜のように材料表面に凹凸構造を形成させれば、微生物の吸着を抑制できる可能性が考えられる。またバイオフィルムが形成しても自然に剥離するような材料を作製できるかもしれない。

最後になるが、本研究の成果が科学技術の発展の一助となることを期待する。

本論文に関連する著作等

<定期刊行誌掲載論文> 2件

- ・ Miura M, Fujimoto K, "Subcellular topological effect of particle monolayers on cell shapes and functions", *Colloids and Surfaces B* 53, 245-253, 2006.
- ・ Miura M, Fujimoto K, "Formation and recovery of a cell sheet by a particle monolayer with the surface roughness", *Colloids and Surfaces B* 66, 125-133, 2008.

<国際学会発表> 3件

- ・ Miura M, Fujimoto K, "Preparation of a cell sheet by nano-designed surfaces of a particle monolayer", NanoBio-Tokyo 2006, 4-7 Dec. 2006, Tokyo, Japan,
- ・ Miura M, Fujimoto K, "Effect of nano-scale roughness on detachment of a cell sheet from a particle monolayer", The 10th Pacific Polymer Conference 10, 4-7 Dec. 2007, Kobe, Japan.
- ・ Miura M, Fujimoto K, "Effect of Nano-scale Roughness on Detachment of a Cell Sheet from a Particle Monolayer", The 8th World Biomaterials Congress, 28 May-1 June 2008, Amsterdam, The Netherlands.

<国内学会発表> 15件

2004年

- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「2次元粒子膜による細胞形態の制御」, 第53回高分子学会年次大会
- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「2次元粒子膜を用いた細胞接着性パターンニングと細胞形態制御」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム

2005年

- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「粒子膜を用いた細胞接着性パターンニングと細胞形態制御」, 第54回高分子学会年次大会
- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「粒子膜による細胞形態制御と細胞接着性パターンニング」, 第34回医用高分子シンポジウム
- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「単層粒子膜による細胞形態の制御と細胞パターンニングの試み」, 第54回高分子討論会
- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「LB法による単層粒子膜の作製と細胞培養基材への応用」, 第2回高分子マイクロスフェア若手研究会
- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「高分子微粒子からなる表面を用いた細胞形態の制御」, 第27回日本バイオマテリアル学会大会

2006年

- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「2次元粒子膜を用いた細胞シートの作製とパターンニングによる配向制御」, 第55回高分子学会年次大会
- ・ 美浦学, 藤本啓二, 「単層粒子膜を用いた細胞シートの作製と接着性パターンニング」, 第14回マイクロスフェア討論会

- ・○美浦学, 藤本啓二, 「単層粒子膜を用いた細胞シートの作製」, 第 28 回日本バイオマテリアル学会

2007 年

- ・○美浦学, 藤本啓二, 「ナノスケール表面構造が創り出す細胞のかたち -細胞を単層で剥離する-」, 第 56 回高分子学会年次大会
- ・○美浦学, 藤本啓二, 「高分子粒子からなる単層粒子膜を用いた細胞シートの作製」, 平成 19 年度繊維学会年次大会
- ・○美浦学, 藤本啓二, 「細胞の組織化を目指した微粒子構造体の創製」, 第 36 回医用高分子シンポジウム
- ・○美浦学, 藤本啓二, 「ナノスケール表面構造による細胞接着の制御と細胞シートの作製」, 第 56 回高分子討論会
- ・○美浦学, 藤本啓二, 「ナノスケール表面構造を利用した細胞組織体の構築」, 第 29 回日本バイオマテリアル学会

<書籍> 1 件

- ・藤本啓二, 美浦学, 「次世代医療のための高分子材料工学」, 第 2 章 細胞機能制御界面創製技術, シーエムシー出版, 2008.

謝辞

本研究を行うに際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部 藤本啓二教授に深く感謝いたします。

数々の貴重な御助言を賜り、そして研究生生活を温かく見守って下さった慶應義塾理工学部 川口春馬教授に深く感謝いたします。

本論文の執筆に際し、数々の有益なる御意見、御指導を賜りました慶應義塾大学理工学部 梅澤一夫教授、松村秀一教授、今井宏明教授に謹んで感謝の意を表します。

共に学び、研究生生活を実り多きものにしてくれた川口研究室ならびに藤本研究室の先輩、同輩、後輩の皆様にご心より感謝いたします。私ひとりではここまで辿り着くことはできなかったでしょう。

最後に、博士課程への進学を後押ししてくれた両親に深く感謝いたします。

平成 21 年 2 月