自己組織化によってパターン化された 高分子のバイオメディカル応用

下村政嗣・鶴間章典・田中 賢*・角南 寛*・山本貞明*

北海道大学電子科学研究所ナノテクノロジー研究センター ☎ 001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 10 丁目

*北海道大学創成科学研究機構 ☎ 001-0021 北海道札幌市北区北 21 条西 10 丁目

(2005 年 11 月 6 日受理)

Biomedical Application of Patterned Polymer Films Prepared by Self-organization

Masatsugu SHIMOMURA, Akinori TSURUMA, Masaru TANAKA*, Hiroshi SUNAMI* and Sadaaki YAMAMOTO*

Nanotechnology Research Center, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University,
N 21 W 10, Sapporo, Hokkaido 001-0021

*Creative Research Initiative "SOUSEI", Hokkaido University, N 21 W 10, Sapporo, Hokkaido 001-0021

(Received November 6, 2005)

We have found that micro porous polymer films were prepared by simple casting of polymer solution under humid atmospheric condition when water-immiscible organic solvent was used as evaporating solvent. Mono-dispersed water droplets are formed on the surface of the casting polymer solution by water condensation due to evaporation cooling. A surface monolayer of the self-packed water droplets formed on the polymer solution surface acts as a temporary template of micro-pores. Honeycomb-like hexagonally packed regular-sized micro-pores were formed in the polymer film after evaporation of solvent and water. Biomedical application is an emerging requirement for the honeycomb-patterned polymer films, especially of biodegradable polymers. Hepatocytes cultured on the honeycomb-patterned film formed spheroid expressing liver functionality, e.g. albumin secretion. The shapes and function of the liver cells can be regulated by the pore size of the honeycomb film. Spheroid aggregates were also formed from neural stem cells on the honeycomb-patterned film.

1. は じ め に

器官や臓器の不可逆的な機能不全には、主として外科的移植や人工臓器による置換による治療が施されている。しかし、ドナー不足や倫理的な観点から組織工学(ティッシュ・エンジニアリング)に基づくバイオメディカルデバイスの開発が望まれている。高分子の温度特性を巧妙に利用した細胞培養シートなど、高分子ナノマテリアルを用いたバイオメディカルデバイスが臨床応用に導入されつつある¹⁾。組織工学においては、組織を構築・再生するために必要な液性因子やそれらを補助するフィーダー細胞だけではなく、細胞培養の足場(Scaffold)の開発が極めて重要である²⁾。人工的な足場材として、サブミクロンからミクロンサイズの構造を特徴とし細胞

の接着、分化の誘導、増殖の制御さらには組織形成などを可能とするバイオマテリアルが期待されている。組織工学に供せられるバイオマテリアルには生体適合性および生分解性高分子が用いられており、さらに材料表面の微細パターンが細胞の分化、増殖、形態などに大きく影響を及ぼしていることが知られている^{3~5)}。

現在、微細パターン形成技術の主流は、主として半導体工業で用いられているリソグラフィーを代表とする「トップダウン」方式である^{6, 7)}。リソグラフィー法はパターンの多様性、微細化、高い加工精度などを特徴とする一方、初期の設備投資や工程の複雑さに加え、加工できる材料が限定されることや大面積化に対応しにくい等の課題もある。最近、マイクロコンタクトプリンティング法やナノインプリント法などのように^{8, 9)}、微小化したスタンプや金型を用いて様々なパターンを材料に転写する手法も注目されはじめている。これら「トップダ

E-mail: shimo@poly.es.hokudai.ac.jp

ウン」方式の微細加工技術によって作製したさまざまな微細パターン化基板を培養基材として、神経細胞の接着形態や神経突起の伸長を制御し人工的な神経回路を構築しようとする研究も報告されており^{10~16)}、神経再生への応用が期待されている。しかし、マイクロスタンプの金型そのものは、リソグラフィーで作製せざるを得ないため、「トップダウン」方式の課題の本質的な解決にはなっていない。

一方、自己組織化による「ボトムアップ」方式の微細加工技術が注目されている。パターンの多様性や制御性の点では「トップダウン」方式に劣るものの、単純な規則パターン作製などでは優位性もある。例えば多孔質構造体の作製法では、規則的に配列したコロイド粒子^{17~19)}やエマルジョン^{20, 21)}を鋳型にする方法や、水溶性高分子²²⁾や気体²³⁾とマトリックスポリマーとの相分離によって細孔を形成させる方法が知られている。最近、高分子を溶液からキャストする溶媒蒸発の過程でおこる非平衡現象を利用することで、ミクロンからサブミクロン領域においてドット、ライン、ハニカム状構造などの規則的なパターンが形成されることが報告されている^{24~30)}。本稿では、自己組織化プロセスを用いた微細構造を有する新規組織工学材料の作製と、細胞培養基材としての特性について述べる。

2. 微少水滴を鋳型にしたハニカム構造フィルムの作製

高分子をクロロホルムなど水と混和しない溶媒に溶か

し高湿度下でガラス基板上にキャストすると、透明性はないものの干渉色を呈するフィルムが形成される (Fig. 1 (a))。レーザーポインターから光照射するとスポット状の回折パターンが観測されることから (Fig. 1 (b))、フィルム内部になんらかの規則性を有していることが示唆される。フィルム表面の走査型電子顕微鏡像 (Fig. 1 (c)) は、均一な孔径の多孔質フィルムの形成を示している。規則的な細孔構造が形成されるメカニズムを明らかにするために、光学顕微鏡を用いてキャスト溶液表面のその場観察を行ったところ、(1) 溶媒が蒸発する際の潜熱によって空気中の水分子が凝結して微小水滴となり、(2) 液面上で細密パッキングしながら溶液内に生じた対流やキャピラリーフォースによって溶液と基板の界面まで運ばれ、(3) 溶媒の後退により基板上に固定され、(4) さらに水が蒸発することで規則的な多孔質フィルムが形成されることが明らかになった (Fig. 1 (d))。これまでにポリスチレン、ポリメチルメタクリレートなどの汎用性高分子、ポリスルホンやポリカーボネートなどのエンジニアリングプラスチック、ポリイオンコンプレックスや熱可塑性エラストマー、ポリ乳酸、などの生分解性高分子、さらに、耐熱性・耐薬品性を有するポリイミド³¹⁾でも同様のハニカムが作製できることが明らかになった。

ハニカム構造フィルムの材料化には、孔径や膜厚などの構造制御が不可欠となる。細孔形成の鋳型となる微小水滴は、キャスト過程で経時的に成長することから、溶媒蒸発時間を変化させることで孔径制御が可能となる。

Fig. 1. Appearance (a), laser light diffraction (b) and SEM image of the honeycomb-patterned film. Schematic illustration of its formation mechanism (d).

溶液のキャスト量と溶媒蒸発時間にはほぼ比例関係があるので、高分子濃度一定条件でキャスト量を変化させたところ、キャスト量が多いほど孔径が大きくなることを見出した。溶媒やポリマーの種類にも依存するものの、孔径は0.1~100 マイクロメートルの範囲で制御できることが明らかになった³²⁾。また、孔の貫通性も、溶液濃度や基板の種類、水蒸気の吹き付け流量などを変えることで制御できることを見出した^{33, 34)}。

3. ハニカム構造フィルム上での肝実質細胞の培養

両親媒性アクリルアミド共重合体 (Fig. 1 の CAP) のハニカム構造フィルムならびに通常のキャストフィルム (平膜) 上にラットの肝実質細胞を播種し接着の経時変化を観察した。Fig. 2 に培養3日目の接着細胞のSEM像およびアクチン染色像を示す。微細構造のない平膜上では、培養時間の経過と共に細胞はアメーバー状に伸展し基板に単層接着するとともに (Fig. 2 (a), (c)), 発達したアクチン繊維が細胞内部に認められた。それに対し、ハニカム膜上では、細胞は20 ミクロン程度の凝集塊を形成し細胞の周縁は突起状に伸展しており (Fig. 2 (b)), 微小突起部分にはアクチン繊維の局在化が認められた (Fig. 2 (d))。培養基材のトポロジーが細胞骨格の構成要素であるアクチン繊維の細胞内分布に大きく影響している。さらに肝機能の代表例である尿素合成能とアルブミン産生能を調べたところ、ハニカム膜上で凝集体 (スフェロイド) を形成することで細胞1個あたりの機能が2倍以上高くなることがわかった³⁵⁾。

肝細胞の接着におよぼすハニカム膜の孔径効果を調べた。細孔径が細胞サイズよりも小さな場合 (およそ15 ミクロンまで)、孔径が大きくなるにつれ細胞の伸展が抑制されスフェロイドを形成するようになる。一方、孔径20 ミクロンのハニカム膜では、細孔内にトラップされて細胞間接着や運動性が抑制された細胞では生存率の低下が観測された³⁶⁾。以上の結果は、培養基材の表面微細構造が、細胞の接着形態、骨格タンパク質の構造、機能発現さらには細胞間相互作用やバイオビリティに影響を与えていることを明確にしめすものである (Fig. 3)。

4. ハニカム構造フィルム上での神経幹細胞の培養

マウス胎児の神経幹細胞をポリカプロラクトン (PCL) 平膜上に播種すると、紡錘形の神経細胞に分化するとともに多数の神経突起がランダムに伸展しているのが観察された (Fig. 4 (a))。一方、ハニカム膜上でも接着、分化して神経線維が形成される。細孔径を大きくするに伴

Fig. 2. SEM images and fluorescence micrographs of hepatocytes cultured on flat (a) (c) and honeycomb-patterned (b) (d) polymer films.

いハニカム構造の幹幅が広くなり、細胞の接着性が安定するとともに、神経線維がハニカム構造の幹に沿って伸展しネットワーク構造を形成しているのが観察された (Fig. 4 (c))。ハニカム構造が神経突起の足場や繊維伸展のガイドとして働いているようである。孔径10 ミクロンのフィルム上では、平膜上に比べ神経突起数が少なくなり、神経線維は単純なネットワーク様構造を形成しているようである。

Fig. 3. Pore size effect of honeycomb-patterned film on hepatocyte culture. Average pore size, (a) 3 μm , (b) 12 μm and (c) 20 μm .

Fig. 4. Pore size effect of honeycomb-patterned film on neural stem cell culture. Average pore size, (a) flat film, (b) 3 μm and (c) 10 μm .

肝細胞と同様に、神経細胞においても細孔径の効果が見られた。孔径3ミクロンのハニカム膜上では、神経に分化して神経突起を形成する細胞の他に、直径約30～50ミクロンのスフェロイド様凝集体が観察された。凝集体からは互いに集合して太くなった5～7本の神経突起が放射状に伸展している様子が観察された³⁷⁾ (Fig. 4(b))。核酸の細胞内取り込みや神経前駆体細胞の選択的な蛍光染色などの実験より、凝集体中では幹細胞が神経に分化せず、増殖している可能性が強く示唆された。

5. おわりに

細胞機能制御機構の解明のためには、培養基材表面と細胞表面との相互作用を分子論的な解析が不可欠である。蛍光染色法を用いて、血管内皮細胞がハニカム膜に焦点接着したときに現れるタンパク質であるビンキュリ

ンのクラスターの蛍光顕微鏡像を観察した。血管内皮細胞の場合も、平膜上とハニカム膜上では接着形態に大きな違いが見られ、ハニカム膜上では細胞が広がって接着した (Fig. 5 (a), (c))。さらにビンキュリンクラスターがハニカム細孔周辺に局在して形成されることが明らかになった。しかも細孔の規則配列を反映して接着点は細胞全体に均一に分布していることがわかった (Fig. 5 (d))。

細胞接着の分子論的アプローチをより詳細に行うために、基材と細胞の界面に存在する吸着タンパク質（フィブロネクチン）の構造について調べはじめたところである³⁸⁾。共焦点レーザー顕微鏡と原子力顕微鏡で細胞培養基材表面を観察すると、平膜上では不規則に絡み合ったフィブリル様凝集構造をとって吸着していることがわかった。一方、ハニカム膜表面への吸着には経時変化が

Fig. 5. SEM images of endothelial cultured on flat (a) and honeycomb-patterned (c) polymer films. Fluorescence imaging of focal contact by visualization of Vinculin clusters on flat (b) and honeycomb-patterned (d) films.

みられ、始めはハニカム構造の幹に粒子状に吸着していたフィブロネクチンが、細孔を取り囲むようにリング状に凝集して吸着していることが明らかになった。

本解説では、種々の細胞がハニカム膜に特異的な接着形態を示すことを紹介してきた。現在、心筋、骨、軟骨、皮膚、消化器など多様な細胞系について、ハニカム膜上での培養、とりわけ細孔径の効果を中心に系統的な検討を行い、膜構造と細胞応答の相関性を検討しているところである。ハニカム膜を用いた無血清培養も重要な目標である。一方、ハニカム膜上でのタンパク質の吸着構造

に関する研究は緒についたばかりである。仮に、フィブロネクチンなどの接着タンパク質の吸着構造が細胞の接着形態を決める要因であるならば、ハニカム膜上での細胞の特異的な挙動を明らかにすることで、接着によって細胞内に誘起されたシグナル伝達と、それに引き続く分化、増殖などの細胞挙動との関係を明らかにすることができるのではないだろうか。ハニカム構造フィルムは、組織工学を支える材料としてのみならず、細胞生物学においても重要な貢献をするものと確信している。

文 献

- 1) 例えば、株式会社セルシードのHP (<http://www.cellseed.com/index.html>)
- 2) R. Langer and J.P. Vacanti: *Science* **260**, 920 (1993).
- 3) A.M. Green, J.A. Jansen, Van der Waerden and A.F. von Recum: *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 647 (1994).
- 4) A. Mata, C. Boehm, A.J. Fleischman, G. Muschla and S. Roy: *J. Biomed. Mater. Res.* **62**, 499 (2002).
- 5) K. Sato, K. Hasebe, M. Tanaka, M. Takebayashi, K. Nishikawa, M. Shimomura, T. Kawai, M. Matsushita, and S. Todo: *Inter. J. Nanosci.* **1**, 689 (2002).
- 6) "Microsystem Technology in Chemistry and Life Science", ed. by A. Manz and H. Becker (Springer-Verlag, Berlin, 1998).
- 7) 高分子学会編: "微細加工技術" (エス・ティー・エス, 2002).
- 8) E. Kim, Y. Xia and G.M. Whitesides: *Nature* **376**, 581 (1995).
- 9) Y. Xia, J.A. Rogers, K.E. Paul and G.M. Whitesides: *Chem. Rev.* **99**, 1823 (1999).
- 10) D. Kleinfeld, K.H. Kahler and P.E. Hockberger: *J. Neurosci.* **8**, 4098 (1998).
- 11) P. Clark, S. Britland and P. Connolly: *J. Cell Sci.* **105**, 203 (1993).
- 12) W. Ma, Q. Liu, D. Jung, P. Manos, J.J. Pancrazio, A.E. Schaffner, J.L. Barker and D.A. Stenger: *Develop. Brain. Res.* **111**, 231 (1998).
- 13) H. Tsuji, H. Sato, T. Baba, S. Ikemura, Y. Gotoh and J. Ishikawa: *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.* **166**, 815 (2000).
- 14) L. Kam, W. Shain, J.N. Turner and R. Bizios: *Biomaterials* **22**, 1049 (2001).
- 15) M.E. Manwaring, J.F. Walsh and P.A. Tresco: *Biomaterials* **25**, 3631 (2004).
- 16) H. Kawasaki, K. Hiraka, S. Nagaoka and Y. Suzuki: *J. Artif. Organs.* **7**, 83 (2004).
- 17) K. Fujimoto, T. Takahashi, M. Miyaki and H. Kawaguchi: *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **8**, 879 (1997).
- 18) O.D. Velev, T.A. Jede, R. Lobo and A.M. Lenhoff: *Nature* **389**, 447 (1997).
- 19) B.T. Holland, C.F. Blanford and A. Stein: *Science* **281**, 538 (1998).
- 20) A. Imhof and D.J. Pine: *Nature* **389**, 948 (1997).
- 21) K. Whang, D.C. Tsai, E.K. Nam, M. Aitken, S.M. Sprad-

- gue, P.K. Patal and K.E. Healy: J. Biomed. Mater. Res. **42**, 491 (1998).
- 22) A.G.A. Coombes and J.D. Heckman: Biomaterials **13**, 217 (1992).
- 23) L.D. Harris, B.S. Kim and D.J. Mooney: J. Biomed. Mater. Res. **42**, 396 (1998).
- 24) G. Widawski, B. Rawiso and B. Francois: Nature **369**, 387 (1994).
- 25) O. Karthaus, K. Ijiro and M. Shimomura: Chem. Lett. **82** (1996).
- 26) N. Maruyama, T. Koito, J. Nishida, S. Nishimura, X. Cieren, O. Karthaus and M. Shimomura: Thin Solid Films **327-329**, 854 (1998).
- 27) O. Karthaus, N. Maruyama, X. Cieren, M. Shimomura, H. Hasegawa and T. Hashimoto: Langmuir **16**, 6071 (2000).
- 28) M. Shimomura and T. Sawadaishi: Current Opinion in Colloid & Interface Science **6**, 11 (2001).
- 29) 下村政嗣: “ナノテクノロジーと高分子” 高分子学会編 (エスティーエヌ, 2002) p. 141.
- 30) 下村政嗣: マテリアルステージ **2**, 77 (2002).
- 31) H. Yabu, M. Tanaka, K. Ijiro and M. Shimomura: Langmuir **19**, 6297 (2003).
- 32) H. Yabu and M. Shimomura: Chem. Mater. **17**, 5231 (2005).
- 33) 田中 賢, 竹林允史, 深山真史, 西川和孝, 西田仁, 佐藤雄久, 長谷部清, 大久保尚, 蒲池浩文, 河合朋明, 松下通明, 藤堂 省, 西川雄大, 下村政嗣: 化学工業 **53**, 901 (2002).
- 34) M. Tanaka, M. Takebayashi, M. Miyama, J. Nishida and M. Shimomura: Bio-Med. Mater. Eng. **14**, 439 (2004).
- 35) 松下通明, 蒲池浩文, 大久保尚, 松本秀一郎, 森田恒彦, 小林 智, 佐藤雄久, 田中 賢, 下村政嗣, 藤堂 省: Surgery Frontier **10**, 245 (2003).
- 36) K. Sato, M. Tanaka, K. Hasebe, M. Takebayashi, M. Nishikawa, T. Kawai, M. Matsushita, S. Todo and M. Shimomura: Int. J. Nanosci. **1**, 689 (2002).
- 37) 鶴間章典, 田中 賢, 福嶋伸之, 下村政嗣: 高分子論文集 **61**, 628 (2004).
- 38) H. Sunami, E. Ito, M. Tanaka, S. Yamamoto and M. Shimomura: Colloid and Surf. in press.