細胞のパターン培養

人工基材上で細胞が接着・増殖する場と非接着・非増殖の場をつくれば、二次元組織体のパターン培養ができることになる。接着・非接着の場を任意に表面設計できれば、任意のパターンを有する人工組織体が形成できることになる。本稿では、表面光化学反応を用いる微細加工技術と細胞のパターン培養への応用について概説する。

松田 武久

Takehisa Matsuda

国立循環器病センター研究所

1. はじめに

細胞はそれ自体で生命活動を維持できる最小単位であり、生体内では集合して組織・器官を形成している。上皮性細胞は二次元組織、間質系細胞は三次元組織を形成するが、これらの組織化過程を生体外で任意に操作できれば、一次元～三次元ハイブリッド組織体が構築できることになる。古くは細胞生物学研究者が細胞の接着や移動性の制御を試みており^{1),2)}、最近では、マイクロマシニングやリソグラフィの技術を利用した神経細胞の接着および神経突起の制御が試みられている³⁾。これらは細胞の接着性が①表面性状、吸着蛋白質や②形状（トポグラフィ）によって異なることを利用したもので、細胞接着の表面選択性（Differential Adhesiveness）あるいは細胞が鋭角の基材に好んで接着・増殖する性質（接触誘導）を利用するものである。しかしながら、これらの表面では細胞接着初期ではパターン化できるものの、経時的にその形態は失われるのが普通であり、表面接着選択性の厳密なる設計が必要である。ここで紹介する細胞の微細パターン化技術は細胞の接着性の表面依存性を明確に意図して設計したものである。まず、細胞接着・非接着の原理を説明し、ついで二次元微細表面加工を具体的化する技術および多次元細胞パターン培養について紹介する。

2. 細胞接着・非接着の原理

細胞を血清中で適当な表面物性を有する人工基材上で培養すると、細胞は接着・増殖する。これは血清中に含まれる接着性蛋白質（フィブロネクチンやビトロネクチン）が人工基材上に吸着し、蛋白質の細胞接着リガンド部位を細胞膜レセプターが分子認識して細

胞が接着・増殖することによる。1984年に Rouslahtiらはこれらの接着性蛋白質に共通した最小接着活性部位が Arg-Gly-Asp (RGD: アミノ酸一文字表示) のトリペプチドであることを見出した⁴⁾。一方、これを分子認識する細胞膜レセプターは2つの膜蛋白質の複合体であることが明らかにされている。したがって、人工基材に細胞接着性を付与する方法として、1) 血清中から比較的微量の接着性蛋白質を選択的に吸着させる、2) これらの接着性蛋白質を予め吸着させておく、3) あるいは接着性蛋白質や接着活性リガンド RGD 含有ペプチドを化学固定すれば良いことになる。

1) および2) の物理吸着を用いる方法において、吸着の熱力学的推進力は基材、水界面の自由エネルギー（界面張力）の減少である^{5)~7)}。一方、蛋白質を吸着し難く、かつ脱着しやすい表面は蛋白質と相互作用し難い非イオン性の親水性表面であり、これに加えて、界面構造（溶解高分子鎖の散漫構造: Diffuse Layer⁸⁾）や界面層の運動性（溶解鎖の易動性: Chain Mobility⁹⁾）の効果により吸着がさらに抑制される。以上が細胞接着・非接着を具体化する原理である。したがって、二次元平面で細胞接着性領域と非接着性領域を作製すれば、細胞の接着・移動・増殖の場を制限できることになる。任意のパターンを形成する第一段階は細胞接着領域の位置決め（Micropositioning）で

松田武久 国立循環器病センター研究所生体工学部（565 吹田市藤白台5）部長、工博1972年京大工学部大学院工学研究科博士課程修了。同年ケース・ウェスタン・リザーヴ大博士研究員、1974年ローム・アンド・ハース社中研勤務、1980年より国立循環器病センター研究所。

2-Dimensional Patterned Tissue Formation

ある。

3. 表面微細加工技術の原理

材料表面上で細胞サイズのレベルでこれらの相反する性質を部分的に形成できれば細胞接着・非接着の 0/1 (All or None) 制御ができ、目的とするパターン培養が可能になる。この実現には、(1) 細胞接着性基材に非接着性表面を部分的に形成させるか、(2) 逆に非接着性基材に接着性表面を部分形成させればよい。このような微細表面加工を細胞レベルで具体化するには、既存の化学修飾技術では困難である。

マイクロリソグラフィ技術を用いればミクロン・レベルでの加工が可能なのは LSI で良く知られており、この技術を応用すれば良い。

光固定化は、(1) 材料表面に光反応性基を導入し、合成高分子、蛋白質、ペプチドを吸着させて光固定させる方法、および (2) 光反応性基を導入した吸着材を吸着させ、光固定する方法が考えられる。われわれの経験では、いずれも有効であった。以下に、高分子表面を改質するために、われわれが開発した光修飾技術の光反応性基 (表 1, フェニルアジド基および *o*-ニトロベンジルエステル基) を利用する方法^{10)~23)} を述べる。光照射により前者ではナイトレンが、後者ではカルボキシル基が生成することはよく知られている。フェニルアジド基を有するモノマーとして *o*-アジドスチレンおよび *p*-アジド安息香酸エチルアクリレート¹⁰⁾ を合成し、これと種々のモノマーのラジカル共重合体を合成した。親水性表面を得たい場合には、コモノマーとしてジメチルアクリルアミド (表 1:3)、疎水性の場合にはスチレン (表 1:4)、正荷電を導入したい場合にはビニルピリジン、負荷電の場合には、スルホン化スチレンやアクリル酸を用いた。*p*-アジド安息香酸が出発物質として利用できるので、アミノ化ポリマーに高分子反応でアジド安息香酸を容易に導入できる。ポリジメチルアクリルアミドとポリビニルアミンの共重合体 (アクリルアミドとジメチルアクリルアミドの共重合体をホフマン分解によりアクリルアミド単位をアミノ化) およびポリアリルアミンとの高分子反応により、フェニルアジド基を側鎖に導入した (表 1:5 および 6)。一方、吸着材が蛋白質の場合には、*p*-アジド安息香酸と目的とする蛋白質を水溶性カルボジイミドでカップリングさせると光反応性蛋白質が容易に合成できた。光反応性フィブロネクチン、ゼラチンおよびアルブミン (表 1:13) である。また、細胞接着活性 RGD 配列含有ペプチドの N 末端に *p*-アジド安息香酸を縮合させると、光感応性の接着活性ペプチド (表 1:9) が合成できた。ポリエ

表 1 光反応性を有する合成高分子、ペプチド、生体コロイド (蛋白質、多糖)

チレングリコール、長鎖アルキル基およびフッ素化アルキル基の末端にフェニルアジドを化学導入し、低分子型の光反応性修飾剤を合成した (表 1:9-12)。ヒアルロン酸の水酸基と *p*-アジド安息香酸を縮合すると、光反応性ヒアルロン酸 (表 1:14) が合成できた。これらの光反応性吸着材の中で細胞接着性表面を与えるのは、疎水性、極性および適度の帯電を有するイオン性共重合体、ゼラチン、フィブロネクチン、接着性ペプチド、疎水性低分子化合物であった。一方非接着性は非イオン性の親水性共重合体、アルブミン、ヒアルロン酸、およびポリエチレングリコールであった。

上記 (2) の方法では、ポリ (*o*-アジドスチレン)あるいはポリ (*p*-アジド安息香酸エチルアクリレート) の薄膜をコーティングすると、吸着材と基材の同時接合が可能であった (表 1:1 および 2)。また、アミノ基を表面に有する高分子やガラスと *p*-アジド安

図 1 表面微細加工と細胞パターン化の作製法

息香酸の化学反応によって光反応性基材を表面に導入でき、これと吸着剤の光反応によって固定できた。

4. 細胞の微細パターン形成

上記の (1), (2) いずれの方法によっても、吸着薄膜を溶媒キャストによって形成させてから、写真製版や IC 回路に用いられるフォトマスクを被せ UV 照射すると吸着材が化学固定化される (図 1)。化学固定化されたことを X 線光電子解析および接触角測定から確認した。血清中でも脱離することなく固定層は安定であった。基材と固定化吸着材の性質を大きく変えることによって、原理的には細胞のパターン化はフォトマスクに対してネガ型とポジ型の二種類が可能である。すなわち、基材が細胞接着性で吸着材が細胞非接着性であれば、細胞は未露光部のみに接着・増殖する。逆に、基材が非接着性で吸着材が細胞接着性であれば、上とは逆のパターン培養になる。

パターン培養の実例を示すと、基材に組織培養用ポリスチレンシャーレ、光修飾化材に非イオン性の親水性高分子 (表 1:3) をコーティングして光固定した後に血管内皮細胞を播種すると、図 2 中段 (細胞はトリパンブルーで染色) に示した二次元パターン化組織が形成した (上段は用いたフォトマスクで、そのスペーサ幅は 200 ミクロン)。一方、細胞非接着性のポリビニルアルコール (PVA) 表面に疎水性の光反応性共重合体 (表 1:4) で修飾すると、図 2 下段のパターン化がえられた。中段・下段の二次元パターンはフォトマスクに対してネガおよびポジ型である。同様な方法により形成したパターンのホフマン分解位相差顕微鏡で拡大観察すると、細胞は非接着面には接着・増殖せず、接着性表面のみに増殖して二次元組織が形成されており、血管内皮細胞では 1 ヶ月以上にわたってパターンは維持された。一方、細胞サイズの 25 ミクロン幅のフォトマスクで表面微細加工すると、細胞が二列に配向し、線幅を 16 ミクロンにすると、細胞の一次元配列が実現した。上記の帯状のフォトマスクで

(上: フォトマスク, 中および下: ネガ型およびポジ型の細胞パターン)

図 2 血管内皮細胞の微細パターン化

はなく、円型のフォトマスクにより修飾した表面では、直径数十ミクロンでは 3~4 個の細胞よりなる無配向のコロニーが形成した (図 3)。光反応性接着活性ペプチド性 (表 1:9) を PVA 表面に光固定する、あるいは組織培養シャーレに反応性ポリエチレングリコール (表 1:11) を化学固定すると、細胞は接着性表面のみに接着・増殖しパターン形成が同様にできた。

接着性あるいは非接着性の蛋白質を表面微細領域に化学固定して細胞パターンを形成させることができる。活性エステル基を側鎖に有する光反応性共重合体 (表 1:15) を用いると、光照射部に細胞接着性あるいは非接着性の蛋白質を化学固定できた。また、光反応性アルブミンを吸着・光固定すると、光照射部のみがアルブミン固定された。これは、抗体染色法による視覚化より確認した。原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy) で観察すると、光照射部と未照射部は明瞭なる境界を有しており、本技術が高精度の微細加工技術であることがわかった。o-ニトロベンジルエステルを側鎖に有するポリマー (表 1:16) をコーティングし、光照射すると、表面にカルボキシル基が生成し、縮合剤を用いるとアルブミンが固定できた。いずれも基材と蛋白質の組合せを選択することにより、パターン形成は可能であった。

固定化吸着剤の膜厚が細胞サイズよりも大きくなると、三次元レベルでのパターン培養が原理的に可能で

(右上および左上はネガ型およびポジ型パターン：位相差顕微鏡)

図3 血管内皮細胞の円型コロニーパターン

ある。固定化膜厚を約10ミクロンにすると、基材表面に凸凹の溝と土手を有する三次元構造ができ、この場合にも表面の選択的接着性によって、土手の上のみ、あるいは溝だけに細胞は接着・増殖をすることができるようになった。

5. その他の表面微細加工技術とパターン培養

電子線照射やイオン注入 (Ion Implantation) によって照射部のみ表面微細修飾し、表面細胞接着性を促進させる試みが最近なされている。

一方、ポリテトラフルオロエチレン表面に接着性蛋白質を化学固定すると、パターン培養ができること²⁵⁾、また、Na イオンの注入により表面での細胞接着性が顕著に増大し、二次元パターンがおこる²⁴⁾。ITO₂ を蒸着したガラスの表面では、電位に感応して神経細胞の増殖が抑制され、軸索形成に分化する²⁶⁾。三次元レベルのパターン化はマイクロリソグラフィやマイクロマシニングの技術によって実現されている³⁾。われわれはフォトマスクを被せた PVA 表面をグロー放電処理すると、照射部のみに細胞が接着・増殖し、パターンが形成することを見い出し、エキシマレーザーによる表面アブレーションと表面光反応を組合せて、高精度でかつ高信頼性の三次元パターン培養技術を開発しつつある。

6. おわりに

人工基材表面での細胞の基本行動を能動的に制御し、ハイブリッド二次元組織体を形成させる化学を説明した。ここで紹介した表面微細修飾技術は細胞の接着・非接着機構を物理化学的に具体化する簡便な化学

である。二次元レベルでの接着・増殖・移動・分化誘導が可能になった。神経細胞の人工回路網形成から学ぶニューロコンピュータや細胞生物学の Research Tool となりうるものと期待している。

なお、本研究は菅原隆理学修士 (国立循環器病センター) および井上 隆工学修士 (鐘ヶ淵化学中央研究所) との共同研究成果をまとめた。

文 献

- 1) P.C. Letrouneau: *Developmental Biology*, **44**, 92 (1975)
- 2) R.A. Rovasio, A. Delouvee, R. Yamada: *J. Cell Biology*, **96**, 462 (1983)
- 3) T. Hirano, K. Torimitsu, A. Kawana, J. Fukuda: *Brain Research*, **446**, 189 (1988)
- 4) E. Ruoslahti: *J. Clin. Inv.*, **87**, 1 (1991)
- 5) 松田武久: 高分子, **31**, 645 (1984)
- 6) 松田武久: バイオマテリアルの最前線 (筏 義人編) CMC 出版, 1989
- 7) 松田武久: 界面コロイド実験法, 広川書店, p.166 (1990)
- 8) Y. Ikada, Y. Tamada: *Polymers in Medicine 2*, Plenum Press, 101, 1986
- 9) S. Nagaoka: *Trans. Amer. Intern. Organs.*, **33**, 76, (1987)
- 10) 松田武久, 井上和彦, 阿久津哲造: 人工臓器, **19**, 1143 (1990)
- 11) 松田武久, 井上和彦, 阿久津哲造: 人工臓器, **19**, 1078 (1990)
- 12) T. Matsuda, K. Inoue: *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **36**, 161 (1990)
- 13) T. Matsuda, K. Inoue, T. Sugawara: *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **35**, 195 (1990)
- 14) T. Matsuda, K. Inoue, E. Ozeki, T. Akutsu: *Int. J. Artif. Organs.*, **14**, 193 (1990)
- 15) T. Matsuda, K. Inoue, T. Sugawara, T. Akutsu: *Artificial Heart-3*. Springer-Verlag (1991) p.69
- 16) 松田武久: 組織培養, **16**, 184 (1990)
- 17) 松田武久: 化学と工業, **43**, 1488 (1990)
- 18) 松田武久: 高分子, **39**, 873 (1990)
- 19) 松田武久: 精密工学会誌, **56**, 2187 (1990)
- 20) 松田武久: マイクロマシン研究会誌, **3**, 45 (1990)
- 21) 菅原 隆, 松田武久: 人工臓器, **21**, 234 (1992)
- 22) 菅原 隆, 松田武久: 人工臓器, **21**, 186 (1992)
- 23) 松田武久: 生体材料, **10**, 18 (1992)
- 24) J. Lee, M. Kaibara, M. Iwaki, H. Sasabe, Y. Suzuki, M. Kusakabe: IVth. World Congress on Biomaterials, Abstract p.220, Berlin (1992)
- 25) J. Rainferl, R. Bellamkonda, J. Jacob, A. Pahizgar, T. Vargo, J. Cardella, P. Aoblscher: *ibid.*, p465, Berlin (1992)
- 26) M. Aizawa, N. Motokoshi, H. Shinohara, Y. Ikaraiyama, S. Furukawa: Proc. 12th Annual Int. Conf. of IEEE Engineering in Medicine and Biology Soc., 1740 (1990)