〔総 合 論 文〕

温度応答性高分子ブラシの精密設計とバイオセパレーションへの応用

長瀬 健一*¹・岡野 光夫*^{2,3}・金澤 秀子*¹

(受付 2017 年 9 月 11 日・審査終了 2017 年 12 月 18 日)

(早期公開 2018 年 2 月 16 日・DOI:10.1295/koron.2017-0073)

要 旨 現在の医療ではバイオ医薬品を用いた治療や細胞を生体に移植する再生医療が効果的な治療方法として用いられている。これらの治療法に使用するタンパク質、細胞の重要性が高まってきており、活性を損なうことなく効率的に分離・精製する機能的な分離技術の開発が求められている。そこで筆者らは、外部温度変化のみで分離対象のタンパク質、細胞との相互作用を制御して分離を行う温度応答性高分子ブラシ修飾表面の開発を行っている。本報ではこれらの温度応答性高分子ブラシの特性とバイオセパレーションへの応用について概説する。

1 結 言

現在の医療では、低分子化合物の医薬品を用いた治療に加えて、抗体医薬品に代表されるタンパク質から構成されるバイオ医薬品を用いた治療が展開されている¹⁾。また近年では細胞懸濁液や細胞から作製された細胞組織を生体に移植し、生体の治癒能力を最大限に引き出す再生医療が注目を集めている^{2)~4)}。これらの治療法を展開する上で原料となるタンパク質や細胞を効率的に分離する分離技術が必要とされている。現在のタンパク質の分離には、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィーを組合せて用いているが、これらは高濃度の塩の添加や移動相のpH制御によるタンパク質の変性の可能性、さらには、アフィニティークロマトグラフィーにおけるリガンドや目的タンパク質の溶出用試薬の混入の問題が懸念されている。細胞の分離については、蛍光標示式細胞分離法(FACS)や磁気細胞分離法(MACS)が高精度な細胞分離方法として幅広く利用されているが、これらの細胞分離方法は蛍光

色素や磁気ビーズを細胞表面に修飾する必要がある、移植後に生体内で影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで筆者らは、これらの問題を克服する新たな分離方法として、温度応答性高分子を用いた新規分離方法を提案している。温度応答性高分子ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm)は温度変化にตอบสนองして32°Cの下限臨界溶液温度(LCST)を境に高分子の水和・脱水和により親水性・疎水性を変化させる⁵⁾。この特性を利用して、PIPAAmまたは各種機能性モノマーとの共重合体をクロマトグラフィー担体に修飾した固定相を用いた温度応答性クロマトグラフィーを開発している。また、細胞を未修飾でかつ細胞の活性を維持したまま分離する新たな細胞分離技術として、温度応答性高分子修飾表面を用いた細胞分離方法を開発している。これらの分離方法は、温度応答性高分子の修飾方法によりその特性が大きく異なる。近年では原子移動ラジカル重合(ATRP)^{6)~9)}や可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合^{10)~12)}が発明され、精密な高分子重合が可能となっている。とくに表面開始ATRPは高密度な高分子ブラシを基材表面に修飾することが可能であるため、さまざまな機能を有するバイオインターフェイス設計に応用されている^{13)~18)}。

この表面開始ATRPにより作製した温度応答性高分子ブラシはPIPAAmの重合を制御しながら高密度に修飾することが可能であり、分離対象のタンパク質や細胞の特性に合わせたさまざまな温度応答性高分子ブラシを設計

*¹ 慶應義塾大学薬学部 (〒105-8512 東京都港区芝公園1-5-30)

*² 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 (〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1)

*³ Cell Sheet Tissue Engineering Center (CSTEC) and Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Chemistry, University of Utah (Salt Lake City, Utah 84112, USA)

Table 1. Properties of thermoresponsive polymer brushes for bioseparation

Polymer brush	Application	Property	Representative References
PIPAAm	Chromatography using hydrophobic interaction. Cell separation.	Temperature responsive hydrophobic/hydrophilic change.	21), 51)
P(IPAAm-co-BMA)	Chromatography for enhanced hydrophobic interaction. Cell separation by changing temperature step-wise.	Lower transition temperature. Enhanced hydrophobicity.	28), 53)
P(IPAAm-co-DMAEMA)	Thermoresponsive anion exchange chromatography.	Weak cationic property	35)
P(IPAAm-co-AAc-co-tBAAm)	Thermoresponsive cation exchange chromatography.	Weak anionic property	36)
P(IPAAm-co-DMAAm-co-tBAAm)	Thermoresponsive anion exchange chromatography. Cell separation for mesenchymal stem cell.	Relatively weak cationic property.	43), 54)
P(IPAAm-co-APTAC-co-tBAAm)	Thermoresponsive strong anion exchange chromatography.	Strong cationic property.	45)
P(IPAAm-co-AMPS-co-tBAAm)	Thermoresponsive strong cation exchange chromatography.	Strong anionic property.	46)
PAPTAC- <i>b</i> -PIPAAm	Protein adsorption chromatography for acidic proteins.	Stronger cationic property than P(IPAAm-co-APTAC).	47)
PAMPS- <i>b</i> -PIPAAm	Proteins adsorption chromatography for basic proteins.	Stronger cationic property than P(IPAAm-co-AMPS).	48)

している (Table 1). 本報では、これらの温度制御による機能的なバイオセパレーションを実現する温度応答性高分子ブラシのこれまでの検討について解説する。

2 温度応答性クロマトグラフィー担体の作製方法とその特性

現在、低分子の生理活性物質、または中、高分子のペプチド、タンパク質の分離、分析において、カラムクロマトグラフィーやHPLCが広く用いられている。これらの分離・分析の際には、オクタデシル基修飾シリカゲル、イオン交換基修飾シリカゲルに代表される固定相と生体試料との相互作用を制御するため、有機溶媒を含んだ移動相、または高濃度の塩を含んだ移動相を用いる。しかし、これらの移動相は、タンパク質などの活性を失活させる可能性がある。そこで、水や低濃度の緩衝液のみを用いて、生理活性物質の活性を維持したまま分離、分析を行う温度応答性クロマトグラフィーが開発された (Figure 1(a))。この温度応答性クロマトグラフィーは、PIPAAmを修飾した担体を固定相として用いている。固定相表面に修飾されたPIPAAmが温度変化に伴い脱水和を起し、表面の疎水性が変化するため、溶質との疎水性相互作用が変化する (Figure 1(b))。このため、従来の逆相クロマトグラフィーとは異なり、移動相に有機溶媒を添加する必要がないため、分離対象の溶質の活性を損なわずに分離、分析を行うことが可能となる。

初期の温度応答性クロマトグラフィー担体は、表面にアミノプロピル基を有するシリカビーズに、末端に活性

エステル基を有するPIPAAmをカップリング反応により反応させる事で作製した (Figure 2(a))。このPIPAAm修飾シリカビーズをクロマトグラフィー担体として充填したカラムを用いて、疎水性ステロイドの保持時間をカラム温度の制御により調節できることを世界に先駆けて発見している¹⁹⁾。しかし、一度重合したPIPAAmをカップリング反応により修飾する方法は、PIPAAm分子鎖長を調節する事が可能であるが、シリカビーズ表面に修飾されたPIPAAm分子の立体障害により、PIPAAmの修飾密度が妨げられるため、PIPAAmの修飾密度はそれほど上がらない。このため溶質との疎水性相互作用は比較的弱くなってしまふ。

PIPAAm修飾クロマトグラフィー担体として次に検討されたのが、架橋剤を添加して表面開始ラジカル重合により作製したPIPAAmゲル修飾シリカビーズである (Figure 2(b))²⁰⁾。この担体はカップリング反応により作製したPIPAAm修飾シリカビーズよりもPIPAAm修飾量を多くすることが可能である。これにより、カップリング反応により作製したPIPAAm修飾シリカビーズと比較してステロイドの保持時間が延長するものの、溶質がゲル層に潜り込みピークがブロードになる問題点を有する。また、シリカビーズ表面に形成されたPIPAAmのゲル層の厚みを精密に制御することは難しい。

そこでこれらの問題点を克服するクロマトグラフィー担体として、表面開始ATRPを用いた高密度なブラシ状のPIPAAmを修飾したシリカビーズ担体の作製が行われた (Figure 2(c))²¹⁾。0.1 chains/nm²という非常に高

Figure 1. (Color online) Concept of thermoresponsive chromatography using PIPAAm modified stationary phase (a), and temperature modulated separation of hydrophobic steroids using all aqueous mobile phase (b).

Figure 2. (Color online) Various types of thermoresponsive polymer modified silica beads for thermoresponsive chromatography. (a) Linear PIPAAm modified stationary phase prepared through coupling reaction, (b) PIPAAm hydrogel modified stationary phase prepared through radical polymerization, and (c) PIPAAm brush modified stationary phase prepared through ATRP.

密度な PIPAAm の修飾が可能であり、単位面積当たりの PIPAAm の修飾量を著しく増大させることができた。また、PIPAAm ブラシ修飾担体を充填したカラムを用いることで、強力な溶質との相互作用により溶質の保持時間が著しく長くなることが示された。また、表面開始 ATRP は精密な高分子修飾が可能であるため、PIPAAm の分子鎖長、修飾密度を容易に制御する事が可能である²²⁾。これにより、シリカビーズ表面上の PIPAAm の修飾構造を精密に設計し、溶質との相互作用を調節することが可能である^{23)~25)}。

表面開始 ATRP を用いた PIPAAm の修飾方法により、シリカビーズ表面に高密度な PIPAAm の修飾を行うことで溶質との強力な疎水性相互作用を起こすことができる。これにより、従来の修飾方法で作製した PIPAAm 修飾ビーズでは分離できなかった溶質の分離の可能性が考えられ、適用できる溶質の種類を大幅に拡大できると考える。

3 共重合により機能性を付与した温度応答性高分子ブラシ修飾シリカビーズ担体

温度応答性高分子に *n*-butylmethacrylate (BMA) のような疎水性の強いモノマーを共重合により導入することで、温度応答性高分子の疎水性を強くし、さらに相転移温度を下げられることが報告されている。実際に

Figure 3. (Color online) Thermoresponsive chromatography using hydrophobized thermoresponsive polymer brush modified silica beads as stationary phase (a), and temperature modulated separation of the benzoic acids mixture (b). Adapted from ref⁽²⁸⁾ with permission from American Chemical Society.

P(IPAAm-co-BMA) を修飾したクロマトグラフィー担体は、PIPAAm を修飾した担体よりも疎水性ステロイドの保持時間を長くすることが可能であり、インスリンのフラグメントやPTH アミノ酸を分離できる事が示されている^(26),27)。この特性を温度応答性高分子ブラシに適用することで、溶質との疎水性相互作用をさらに強力にした温度応答性クロマトグラフィー担体の作製が可能である (Figure 3(a))。表面開始 ATRP により P(IPAAm-co-BMA) ブラシをシリカビーズ表面に修飾した担体を作製し、この担体を充填したカラムを用いる事で、比較的親水性の高い溶質である安息香酸の保持時間を延長し、分離精度を各段に向上させる事が可能であることがわかった (Figure 3(b))⁽²⁸⁾。

正荷電，負荷電を有するモノマーを共重合により温度応答性高分子に導入する事で，荷電密度を温度により制御する事が可能であることが示されている (Figure 4(a))⁽²⁹⁾。この特性を応用した温度応答性イオン交換クロマトグラフィーが検討されている。IPAAm，アクリル酸 (AAc)，疎水性モノマーの *tert* ブチルアクリルアミド (tBAAm) の三元共重合体 P(IPAAm-co-AAc-co-tBAAm) を架橋剤である *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (MBAAm) の存在下でラジカル重合により作製した負荷電を有する温度応答性ゲルを修飾したシリカビーズを作製した。このシリカビーズを充填したカラムにカテコールアミン，アンジオテンシンの塩基性の溶質を流して溶出挙動を確認したところ，カラム温度の変化により

Figure 4. (Color online) Thermoresponsive ionic chromatography using thermoresponsive-ionic copolymer brush modified stationary phase. (a) temperature-modulated ionic properties of thermoresponsive ionic copolymer. (b) thermoresponsive cationic polymer brush modified silica beads as stationary phase, and (c) temperature modulated separation of the adenosine nucleotides mixture. Adapted from ref³⁵⁾, with permission from American Chemical Society.

保持時間が変化する事がわかった^{30)~32)}。これは温度変化によりシリカビーズ表面に修飾された高分子層の荷電密度が変化することで溶質との静電的相互作用が変化する事に起因している。また同様に、IPAAm, *N,N*-dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAAm), BMA の共重合体を修飾し、正荷電を有する三次元の網目構造を有するゲル表面を構築した担体を充填したカラムを作製し、温度変化によるアデノシンヌクレオチド、オリゴヌクレオチドの分離を行っている^{33),34)}。そこで、これらの

温度応答性イオン交換クロマトグラフィーの性能を向上させるため、荷電を導入した温度応答性高分子ブラシ修飾シリカビーズを開発した。IPAAm と 2-(dimethylamino)-ethylmethacrylate (DMAEMA) の共重合体 P(IPAAm-co-DMAEMA) ブラシをシリカビーズに修飾し、これらを充填したカラムを用いてアデノシンヌクレオチド (AMP, ADP, ATP) の溶出挙動を観察したところ、従来までのゲル表面修飾シリカビーズ充填カラムと比較してきわめて長い保持時間が観察された (Figure 4(b), 4(c))³⁵⁾。これはシリカビーズの表面に高密度に修飾された P(IPAAm-co-DMAEMA) ブラシとアデノシンヌクレオチドが極めて強い静電的相互作用を示すためと考えられる。また、アデノシンヌクレオチドの保持時間が温度により著しく変化した (Figure 4(c))。これは、シリカビーズ表面に高密度に修飾された P(IPAAm-co-DMAEMA) の正荷電が、温度の上昇に伴いブラシの脱水和により荷電密度が変化するためである³⁵⁾。同様にアニオン性の温度応答性高分子 P(IPAAm-co-AAc-co-tBAAm) ブラシを高密度にシリカビーズ表面に修飾した担体を充填したカラムを用いることで、塩基性のカテコールアミン、アンジオテンシンの保持をカラム温度により制御することが可能であり、分離精度が向上することがわかっている³⁶⁾。

これらの温度応答性高分子ブラシ修飾担体は強力な溶質との相互作用が得られ、分離性能を向上させることが可能であるが、溶質の保持時間が長くなり、分析時間が長くなってしまいう問題が生じる。そこでこれらの問題点を克服する温度応答性高分子ブラシ修飾モノリスシリカカラムを開発している (Figure 5)^{37)~40)}。三次元の網目構造のシリカ多孔質体であるモノリスシリカのカラムは、シリカビーズを充填したカラムよりも移動相の線速度が速く、溶質の拡散距離も短いため、分析速度を著しく短くできることが報告されている^{41),42)}。そこで、モノリスシリカ多孔質体に温度応答性高分子ブラシを表面開始 ATRP により修飾して作製したカラムにより、疎水性ステロイドを著しく短い保持時間で精度良く分離できることが示されている (Figure 5(b))。同様に P(IPAAm-co-BMA) ブラシを修飾したモノリスシリカ担体により安息香酸を短時間で分離できる事が示されている⁴⁰⁾。さらには、P(IPAAm-co-DMAEMA-co-tBAAm) ブラシを修飾したモノリスシリカ担体はアデノシンヌクレオチドの高速分析に応用可能であり³⁸⁾、P(IPAAm-co-AAc-co-tBAAm) ブラシを修飾した担体はカテコールアミン、アンジオテンシンの短い保持時間での分離を可能にしている³⁹⁾。

疎水性官能基を有するモノマーを温度応答性高分子ブラシに共重合することで、溶質との疎水性相互作用をさらに強力にし、PIPAAm ブラシでは分離できなかった溶質の分離が可能になると考える。さらには、酸性官能基、あるいは塩基性官能基を有するモノマーを共重合す

Figure 5. (Color online) Scheme for preparation of thermoresponsive polymer brush modified monolithic silica column (a), and high speed separation of hydrophobic steroids (b). Adapted from Ref³⁷⁾ with permission from American Chemical Society.

ること、温度変化による溶質との静電的相互作用の制御を可能にし、温度応答性イオン交換クロマトグラフィーとしての使用を可能にしている。これにより、荷電を有するさまざまな溶質の分離が可能になると考える。

4 タンパク質を吸着・脱着する温度応答性高分子ブラシ

タンパク質はそれぞれ特有の静電的性質を有しており、この特性を利用してイオン交換クロマトグラフィーによる分離が行われている。しかし、静電的相互作用を制御するために高濃度の塩を含んだ移動相を流す必要があり、これによりタンパク質が変性を起こす可能性がある。そこで、移動相の組成を変化させずにわずかな温度変化でタンパク質を分離、精製する試みが行われている (Figure 6)。

P(IPAAm-co-DMAPAAm-co-tBAAm) をシリカビーズ表

面に高密度で修飾した担体を充填したカラムにヒト血清アルブミン、 γ グロブリンを注入し、各温度での溶出挙動を確認したところ、 γ グロブリンはすべての温度で溶出したのに対し、HSAは低温では溶出するが40°Cでは吸着して溶出しなかった⁴³⁾。これは、温度が上昇するに伴いカチオン性の温度応答性高分子ブラシが脱水和を起し、疎水性が強くなるため、酸性タンパク質のHSAとの静電的相互作用、疎水性相互作用が複合的に作用し、HSAを吸着させているためである。これに対し、 γ グロブリンは等電点が中性付近であるため、静電的な相互作用が弱く、カラム温度を増加させても吸着しない。この特性を利用して温度変化のみで、HSA、 γ グロブリンの分離に成功している (Figure 6(a))⁴³⁾。同様に、アニオン性の温度応答性高分子 P(IPAAm-co-AAc-co-tBAAm) のブラシを修飾した担体を充填したカラムを用いて、塩基性タンパク質のリゾチームの溶出挙動を確認したところ、低温では溶出していたリゾチームが30°Cで吸着し

Figure 6. (Color online) Temperature-modulated protein separation using thermoresponsive ionic copolymer brush modified stationary phase. (a) Separation of human serum albumin and γ -globulin using thermoresponsive cationic copolymer brush, adapted from ref.⁴³⁾ with permission from Elsevier, and (b) Purification of lysozyme from egg-white proteins using thermoresponsive anionic copolymer brush, adapted from ref.⁴⁴⁾ with Royal Society of Chemistry.

溶出しなくなることがわかった。この特性を利用して卵白中のリゾチームをカラム温度変化のみで精製することを可能にしている (Figure 6(b))⁴⁴⁾。これらの温度変化によるタンパク質吸着・脱着の特性を温度応答性高分子のイオン性官能基を変化させることで調節することができる。カチオン性の温度応答性高分子ブラシでは、第四級アミンを官能基にもつ 3-acrylamidopropyl trimethylammonium chloride (APTAC) を用いた P(IPAAm-co-APTAC-co-tBAAm) ブラシをシリカビーズ表面に修飾した担体を用いる事で、より強力な酸性タンパク質の吸着特性を示すことが見いだされている⁴⁵⁾。またアニオン性の温度応答性高分子ブラシの場合はスルホン酸基を有する 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid (AMPS) を用いた P(IPAAm-co-AMPS-co-tBAAm) ブラシを修飾した担体を充填したカラムを用いることで、弱酸官能基を有する P(IPAAm-co-AAc-co-tBAAm) ブラシ修飾担体と比較して強力な塩基性タンパク質の吸着挙動を示すことが確かめられている⁴⁶⁾。

これらの荷電を有する温度応答性高分子ブラシを修飾した担体は、導入する荷電官能基の性質や移動相組成を調節することで、温度変化による目的タンパク質の特異的な吸着・脱着が可能であるため、バイオ医薬品精製への応用が可能であると考えられる。

5 ブロック共重合により作製された温度応答性高分子ブラシ

ATRP では多段階での重合が可能であり、温度応答性高分子ブラシに荷電のセグメントの導入や、疎水性セグメントの導入が可能となる。第一段階の ATRP で第四級アミンの官能基をもつ PAPTAC のブラシをシリカビーズ表面に修飾し、その後、第二段階の ATRP で温度応答性の PIPAAm ブラシを PAPTAC に修飾する事で PAPTAC-*h*-PIPAAm ブラシ修飾シリカビーズを作製した⁴⁷⁾。このシリカビーズをカラムに充填し、乳清タンパク質の溶出挙動を確認したところ、ランダム共重合で作製した P(IPAAm-co-APTAC) ブラシ修飾シリカビーズを充填したカラムよりも強い酸性タンパク質の吸着特性を示し、 α ラクトアルブミンと β ラクトグロブリンが温度 30 °C で吸着し、10 °C で脱着することがわかった。この性質を利用して乳清タンパク質をカラム温度変化のみで分離・精製できることを示している (Figure 7)⁴⁷⁾。また同様に第一段階の ATRP で強酸官能基を有する PAMPS の高密度ブラシをシリカビーズ表面に構築し、その後、第二段階の ATRP で PIPAAm を修飾する事で、PAMPS-*h*-PIPAAm ブラシ修飾シリカビーズを作製した⁴⁸⁾。このビーズを充填したカラムを用いることで、ランダム共重

Figure 7. (Color online) Temperature-modulated proteins separation using thermoresponsive block copolymer brush having ionic basal segment. (a) Temperature-modulated separation of milk serum proteins using thermoresponsive ionic copolymer brush, and (b) Illustration of temperature modulated proteins adsorption on thermoresponsive ionic block copolymer brush, adapted from ref⁴⁷⁾ with permission from Royal Society of Chemistry.

合で作製した P(IPAAm-co-AMPS) よりも強い塩基性タンパク質の吸着特性を示し、 α キモトリプシンノーゲン A の温度による吸着・脱着が可能になった⁴⁸⁾。

またブロックコポリマーブラシはシリカビーズ担体の耐久性を向上させるのにも有用である事が見いだされている⁴⁹⁾。第一段階の ATRP で疎水性の PtBAAm ブラシをシリカビーズ表面上に構築し、その後、第二段階の ATRP で PIPAAm ブラシを修飾し、PtBAAm-*b*-PIPAAm ブラシをシリカビーズ表面に構築した。この担体を充填したカラムと pH10 の緩衝液を移動相として用いて温度 40°C でステロイドの溶出挙動の経時変化を観察したところ、PIPAAm ブラシ修飾担体では 18 時間で保持時間が短くなり、ピーク形状が崩れていくのに対し、PtBAAm-*b*-PIPAAm ブラシ修飾シリカビーズ担体を用いた場合は、54 時間までピーク形状が維持されているのがわかった。これは PIPAAm ブラシではシリカビーズ表面がアルカリ性の緩衝液に溶解されて PIPAAm が脱離していくのに対し、PtBAAm-*b*-PIPAAm ブラシではシリカビーズ表面が PtBAAm の疎水性により保護されているためと考えられる⁴⁹⁾。

温度応答性高分子ブラシとイオン性あるいは疎水性高分子ブラシとのブロック共重合体ブラシは、温度応答性高分子ブラシの性質と疎水性高分子ブラシ、あるいはイオン性高分子ブラシの両方の性質を利用することが可能である。これにより、任意のブロック共重合体ブラシを担体表面に修飾する事でさまざまな溶質の分離、あるいは、シリカビーズ担体の耐久性向上が可能となる。

6 温度応答性高分子ブラシを用いた細胞分離システム

細胞を生体内に移植して治療を行う再生医療が新たな医療として展開されており、それに伴い、生体外で細胞組織を作製する試みが行われている^{2),3)}。この際、移植用細胞の精製技術、あるいは細胞組織作製における細胞分離技術が必要となる。既存の細胞分離方法として、蛍光抗体を細胞表面に結合させて分離する手法や、磁気ビーズを細胞表面に結合させて分離する手法が一般的であるが、これらは細胞表面への修飾が必要となる。

一方で、温度応答性高分子を修飾した基材表面は、細胞の接着・脱着を温度により制御できる事が報告されている⁵⁰⁾。この特性を利用して細胞を未修飾の状態 で分離する温度応答性高分子ブラシについての研究がなされている。

ガラス基板表面にシランカップリング処理により ATRP 開始剤を修飾し、その後、表面開始 ATRP により PIPAAm ブラシを修飾した表面を作製した⁵¹⁾。この PIPAAm ブラシ基板にヒト血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF)、ヒト平滑筋細胞 (SMC)、ヒト骨格筋筋芽細胞 (HSMM) の四種類の細胞を播種したところ、37°C での接着速度はほぼ等しいものの、20°C での脱着速度が著しく異なることがわかった。この特性を利用して、HUVEC と HSMM の PIPAAm ブラシからの脱着速度の差を利用した分離が達成されている (Figure 8(a))⁵¹⁾。

また温度応答性表面からの細胞の脱着には温度応答性表面の親水性・疎水性だけではなく、細胞の代謝活性が

Figure 8. (Color online) Temperature-modulated cell separation using thermoresponsive polymer brush modified substrates. (a) Cell separation using PIPAAm brush by utilizing the difference in cell detachment rate. (b) cell separation using P(IPAAm-co-BMA) brush by multi step temperature change, (c) cell separation using P(IPAAm-co-DMAAm-co-tBAAm) brush by utilizing the difference in cell adhesion properties. (d) Cell separation using the PIPAAm brush modified patterned substrates.

重要であることが示されており、細胞の種類ごとに細胞脱着に適した温度が存在する⁵²⁾。そこでこの特性を利用した細胞分離システムが提案されている⁵³⁾。P(IPAAm-co-BMA) ブラシを修飾したガラス基板を表面開始 ATRP により作製し、HUVEC、NHDF を 37°C で接着させ、その後、10°C、20°C の温度で脱着挙動を確認したところ、HUVEC は 20°C で脱着しやすく、NHDF は 10°C で脱着しやすい傾向が見られた。この特性を利用して、両細胞の混合懸濁液を 37°C で播種し、温度を 10°C に下げて NHDF を回収し、その後、温度を 20°C に上げて HUVEC を回収することで、HUVEC、NHDF の両方の細胞を多段階に温度を制御して分離できる事を示している (Figure 8(b))⁵³⁾。

また温度応答性高分子ブラシに正荷電を導入した P(IPAAm-co-DMAAm-co-tBAAm) ブラシを用いて、骨髄由来の間葉系幹細胞 (hbmMSC) の精製を可能にしている⁵⁴⁾。P(IPAAm-co-DMAAm-co-tBAAm) ブラシを修飾したガラス基板を作製し、hbmMSC と NHDF を 37°C で播種したところ、hbmMSC はカチオン性ポリマーブラシに接着しやすく、NHDF は接着しにくい傾向を示した。また、温度を 20°C に下げる事で接着していた hbmMSC が脱着することが示された。これにより、両方の細胞を播種し、接着・脱着を行うことで hbmMSC の比率を多くすることが可能であることがわかった。また、hbmMSC と他の骨髄由来細胞の混合懸濁液から、hbmMSC のみを P(IPAAm-co-DMAAm-co-tBAAm) ブラシ

シに選択的に接着させ、温度を低下させることで精製された hbmMSC を回収することに成功している (Figure 8(c))⁵⁴⁾。これにより、P(IPAAm-co-DMAAm-co-tBAAm) ブラシを用いる事で hbmMSC を温度変化のみで精製できる事を示している。

細胞の接着性は接着面の立体的な構造により変化することが知られている。そこで、熱ナノインプリントリソグラフィー (NIL) により、表面に大きさ 0.5 μm 、1.0 μm 、2.0 μm のピラー、ホール、ライン構造を有する poly(styrene-co-vinyl benzyl chloride) (P(St-co-VBC)) の薄膜を作製し、その後、表面開始 ATRP により PIPAAm ブラシを修飾することで温度応答性の微細構造基板を作製した^{55), 56)}。この基板に HUVEC、NHDF、HSMM を播種したところ、それぞれのパターン形状で細胞ごとに異なった接着形態を示した。とくに 2.0 μm のホール形状の基材上で HUVEC は接着しにくく、HSMM は脱着しにくい傾向を示した。一方、NHDF は温度に反応して接着、脱着する挙動を示した。この特性を利用して、三種類の細胞の混合懸濁液を播種したところ、37°C で接着し、20°C で脱着すると高い比率の NHDF が得られることがわかった (Figure 8(d))⁵⁶⁾。

これらの温度応答性高分子ブラシを用いた細胞分離の検討は、平板の上で行われているので細胞処理量がわずかである。そこで、大容量の細胞分離を目的とした細胞分離カラムの設計を行っている。212~250 μm のガラスビーズ表面に ATRP 開始剤を修飾し、その後、ATRP

Figure 9. (Color online) Temperature-modulated cell separation system for large scale cell separation using thermoresponsive polymer brush modified packing materials. (a) PIPAAm brush modified glass beads packed column for separation of lymphocyte subpopulations. (b) PIPAAm brush modified microfibers for purification of adipose derived mesenchymal stem cell (ADSC).

により PIPAAm を修飾した⁵⁷⁾。このガラスビーズを poly(vinyl chloride) のチューブに充填し、ラットから採取した T 細胞、B 細胞を流したところ、B 細胞は温度に応答して接着・脱着する特性を示したが、T 細胞は接着を起こすが脱着しない傾向を示した。これにより、カラムのリンパ球中の B 細胞、T 細胞の比率をカラムにより制御することが可能であることがわかった (Figure 9(a))⁵⁷⁾。

また、ガラスビーズに代わる新たな充填剤として温度応答性のマイクロファイバーの検討を行っている⁵⁸⁾。外径 20 μm のマイクロファイバーを PVBC 溶液からエレクトロスピニング法で調製し、その後、PIPAAm ブラシをマイクロファイバー表面に ATRP により修飾し、温度応答性マイクロファイバーを作製した。このマイクロファイバーに HUVEC、NHDF を播種したところ、温度 37°C で NHDF はマイクロファイバーに伸展して接着する挙動が見られたが、HUVEC は伸展して接着しなかった。また温度を 20°C に下げて培養するとファイバーに接着していた NHDF が脱着した。この特性を利用し、NHDF と HUVEC のマイクロファイバーへの接着性の差を利用した分離が可能であった。また三種類の脂肪組織由来の細胞である脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC)、脂肪細胞、微小血管内皮細胞を播種したところ、ADSC のみがマイクロファイバーに接着し、他の細胞は接着しないことがわかった。温度を下げると接着していた ADSC は脱着し、回収できることから、温度応答性マイクロ

ファイバーを用いて脂肪組織から ADSC を精製することが可能であることがわかった⁵⁸⁾。

目的細胞の特性に合わせて、温度応答性高分子ブラシの種類、あるいは修飾する基材の形状を調節する事で、さまざまな細胞を特異的に接着・脱着させ、温度制御のみによる細胞分離が可能となる。これらの温度応答性高分子ブラシを用いた細胞分離の手法は、抗体で識別する方法よりも精度は低いですが、細胞を未修飾で活性が高い状態で回収できるため、移植用細胞の精製や *in vitro* での組織作製における細胞組成調製などさまざまな応用例が考えられる。

7 結 論

本報では温度応答性高分子ブラシを用いたバイオセパレーションについて系統的に概説した。さまざまな分離媒体の表面に温度応答性高分子ブラシを構築する事で、分離対象の生理活性物質、タンパク質、細胞の機能を損なわずに分離することが可能である。これらの分離技術は、バイオ医薬品の製造工程における精製技術、再生医療での治療用細胞の精製への応用が可能であると考えられる。今後、分離対象物質の物性を考慮し、温度応答性高分子ブラシの構造を精密に調節することで、さらなるバイオセパレーションの発展的な応用が期待される。

謝 辞 本報の研究内容の一部は国立研究開発法人科学技術振興機構の研究成果展開事業 (先端計測分析技術・機器開発プログラム)、日本学術振興会 科学研究費助成事業基盤研究 (C)、日本学術振興会 日中韓フォーサイト事業の助成により行われました。また本報で述べた研究成果は、東京理科大学の菊池明彦先生、早稲田大学の武田直也先生との共同研究によるものであり、ここに深謝いたします。

文 献

- 1) P. Goddard, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **6**, 103 (1991).
- 2) P. Menasché, A. A. Hagège, M. Scorsin, B. Pouzet, M. Desnos, D. Duboc, K. Schwartz, J.-T. Vilquin, and J.-P. Marolleau, *The Lancet*, **357**, 279 (2001).
- 3) R. Langer and J. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
- 4) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, and Y. Tano, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1187 (2004).
- 5) M. Heskins and J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, **2**, 1441 (1968).
- 6) K. Matyjaszewski and J. Xia, *Chem. Rev.*, **101**, 2921 (2001).
- 7) H.-i. Lee, J. Pietrasik, S. S. Sheiko, and K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.*, **35**, 24 (2010).
- 8) K. Matyjaszewski and N. V. Tsarevsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 6513 (2014).
- 9) J.-F. Lutz, J.-M. Lehn, E. W. Meijer, and K. Matyjaszewski, *Nat. Rev. Mater.*, **1**, 16024 (2016).

- 10) G. Moad, E. Rizzardo, and S. H. Thang, *Aust. J. Chem.*, **58**, 379 (2005).
- 11) G. Moad, E. Rizzardo, and S. H. Thang, *Aust. J. Chem.*, **62**, 1402 (2009).
- 12) G. Moad, *Polym. Chem.*, **8**, 177 (2017).
- 13) C. Yoshikawa, A. Goto, Y. Tsujii, T. Fukuda, T. Kimura, K. Yamamoto, and A. Kishida, *Macromolecules*, **39**, 2284 (2006).
- 14) Y. Inoue and K. Ishihara, *Colloids Surf., B*, **81**, 350 (2010).
- 15) K. Ishihara, T. Kitagawa, and Y. Inoue, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **1**, 103 (2014).
- 16) H. Kitano, H. Suzuki, K. Matsuura, and K. Ohno, *Langmuir*, **26**, 6767 (2010).
- 17) Y. Terayama, M. Kikuchi, M. Kobayashi, and A. Takahara, *Macromolecules*, **44**, 104 (2010).
- 18) S. Desseaux and H.-A. Klok, *Biomaterials*, **44**, 24 (2015).
- 19) H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, and T. Okano, *Anal. Chem.*, **68**, 100 (1996).
- 20) T. Yakushiji, K. Sakai, A. Kikuchi, T. Aoyagi, Y. Sakurai, and T. Okano, *Anal. Chem.*, **71**, 1125 (1999).
- 21) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *Langmuir*, **23**, 9409 (2007).
- 22) K. Nagase, M. Watanabe, A. Kikuchi, M. Yamato, and T. Okano, *Macromol. Biosci.*, **11**, 400 (2011).
- 23) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *Langmuir*, **24**, 511 (2008).
- 24) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, M. Annaka, H. Kanazawa, and T. Okano, *Langmuir*, **24**, 10981 (2008).
- 25) K. Nagase, A. Mizutani, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 8617 (2011).
- 26) H. Kanazawa, Y. Kashiwase, K. Yamamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, Y. Sakurai, and T. Okano, *Anal. Chem.*, **69**, 823 (1997).
- 27) H. Kanazawa, T. Sunamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, and T. Okano, *Anal. Chem.*, **72**, 5961 (2000).
- 28) K. Nagase, M. Kumazaki, H. Kanazawa, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, M. Annaka, and T. Okano, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2**, 1247 (2010).
- 29) H. Feil, Y. H. Bae, J. Feijen, and S. W. Kim, *Macromolecules*, **25**, 5528 (1992).
- 30) J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano, *Anal. Chem.*, **73**, 2027 (2001).
- 31) J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano, *J. Chromatogr. A*, **958**, 109 (2002).
- 32) J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano, *Anal. Chem.*, **75**, 3244 (2003).
- 33) A. Kikuchi, J. Kobayashi, T. Okano, T. Iwasa, and K. Sakai, *J. Bioact. Compatible Polym.*, **22**, 575 (2007).
- 34) E. Ayano, C. Sakamoto, H. Kanazawa, A. Kikuchi, and T. Okano, *Anal. Sci.*, **22**, 539 (2006).
- 35) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **9**, 1340 (2008).
- 36) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, M. Annaka, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **11**, 215 (2010).
- 37) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *Langmuir*, **27**, 10830 (2011).
- 38) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 1442 (2013).
- 39) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **15**, 1204 (2014).
- 40) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *RSC Adv.*, **5**, 66155 (2015).
- 41) H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, and N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **68**, 3498 (1996).
- 42) N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, and T. Ikegami, *J. Chromatogr. A*, **965**, 35 (2002).
- 43) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *Biomaterials*, **32**, 619 (2011).
- 44) K. Nagase, S. F. Yuk, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *J. Mater. Chem.*, **21**, 2590 (2011).
- 45) K. Nagase, M. Geven, S. Kimura, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, D. W. Grijpma, H. Kanazawa, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **15**, 1031 (2014).
- 46) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **15**, 3846 (2014).
- 47) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *RSC Adv.*, **6**, 26254 (2016).
- 48) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *RSC Adv.*, **6**, 93169 (2016).
- 49) K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, and T. Okano, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **4**, 1998 (2012).
- 50) N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, and Y. Sakurai, *Macromol. Rapid Commun.*, **11**, 571 (1990).
- 51) K. Nagase, A. Kimura, T. Shimizu, K. Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, and T. Okano, *J. Mater. Chem.*, **22**, 19514 (2012).
- 52) T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, and Y. Sakurai, *Biomaterials*, **16**, 297 (1995).
- 53) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **14**, 3423 (2013).
- 54) K. Nagase, Y. Hatakeyama, T. Shimizu, K. Matsuura, M. Yamato, N. Takeda, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **16**, 532 (2015).
- 55) K. Nagase, T. Onuma, M. Yamato, N. Takeda, and T. Okano, *Macromol. Rapid Commun.*, **36**, 1965 (2015).
- 56) K. Nagase, R. Shukuwa, T. Onuma, M. Yamato, N. Takeda, and T. Okano, *J. Mater. Chem. B*, **5**, 5924 (2017).
- 57) K. Nagase, N. Mukae, A. Kikuchi, and T. Okano, *Macromol. Biosci.*, **12**, 333 (2012).
- 58) K. Nagase, Y. Sakurada, S. Onizuka, T. Iwata, M. Yamato, N. Takeda, and T. Okano, *Acta Biomaterialia*, **53**, 81 (2017).

[Comprehensive Papers]

Design of Functional Thermoresponsive Polymer Brushes and Their Application to Bioseparation

Kenichi NAGASE^{*1}, Teruo OKANO^{*2,*3}, and Hideko KANAZAWA^{*1}

^{*1}*Faculty of Pharmacy, Keio University (1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan)*

^{*2}*Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, TWIns (8-1 Kawadacho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan)*

^{*3}*Cell Sheet Tissue Engineering Center (CSTEC) and Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Chemistry, University of Utah (Salt Lake City, Utah 84112, USA)*

Protein drugs and therapeutic cells are among promising current and future therapies for patients. The importance of these proteins and cells has increased in the clinical field, and protein and cell purification methods, without losing their potency or biological activity, are urgently needed. We prepared thermoresponsive polymer brushes as a new protein and cell separation tool because interactions between the polymer brushes and targeted proteins and cells can be modulated by changing the external solution temperature without using other agents that might contaminate these biologics or disrupt their function. Using these new thermoresponsive polymer brushes, a variety of different bio-separations have been performed by simple temperature changes in aqueous solutions. The present review describes the recent achievement in bioseparation using thermoresponsive polymer brushes.

KEY WORDS Polymer Brush / Thermoresponsive Polymer / Bioseparation / Chromatography / Cell Separation /

(Received September 11, 2017; Accepted December 18, 2017; Advance Publication February 16, 2018) [Kobunshi Ronbunshu, **75**, 143—154 (2018)]

©2018, The Society of Polymer Science, Japan