

含フッ素ポリイミドによるバイオインターフェイスの構築

首都大院 都市環境 川上浩良

1 はじめに

最近の iPS 細胞に代表されるように、発生工学、細胞工学の進歩により細胞から器官、臓器の再生を目指す再生医療が注目を浴びている。再生医療を実現する上での一つの重要な要件は、細胞機能の制御とその組織化であり、細胞の構築なくして再生医療は実現できない。in vivo で細胞の組織化をはかるか、あるいは in vitro で細胞の組織化を行うかによりその方法論は異なるが、いずれにしても細胞が機能する足場（材料）が必要となる。特に in vitro で細胞から臓器を工学的に再生する場合、細胞を培養する環境が最も重要となる。組織由来の細胞は殆どが接着性であるため、先ず細胞が成長するには基材表面に接着する必要がある、さらに細胞の伸展、移動、分化を連続的に引き起こし特異的な機能を獲得した細胞の集合体を形成させる必要がある。基材上で細胞を効果的に分化させ、細胞機能を高発現させるための細胞培養環境の構築は極めて重要であるが、その方法論の1つに細胞凝集体の形成がある。細胞の凝集体は、細胞分化、遊走、細胞間相互作用に直接的に影響を与える形態を有し、器官、臓器中に通常存在する多様な細胞集合体の1つになりえるため、器官や臓器を工学的に再構築させるには都合のよい形態であり、再生医療を実現する上での1つの有用な手法と考えられている^{1), 2)}。

細胞の凝集体を形成させる方法には、①多孔質基材を用いた三次元培養、②糖鎖や接着性ペプチドなどの官能基を導入した基材上での培養、③細胞を分散状態のまま回転攪拌する旋回培養法、などが知られている^{3), 4)}。近年、我々は従来法とは全く異なる手法で簡便に細胞の凝集体を形成させる培養法を考案した^{5), 6)}。ポリイミド表面にラビングを施すと液晶配向膜が得られることはよく知られているが、我々は含フッ素ポリイミド表面にラビング処理を施すとナノ・マイクロレベルでの凹凸を持つパターンニング表面が形成され、その表面上で細胞はスフェロイドと呼ばれる凝集体を形成することを見出した。

本稿では、in vitro での再生医療の新しい方法論として、ラビングによるナノ・マイクロパターンニング化表面（微細凹凸）の作製法とその表面での細胞の制御を紹介し、ラビング処理含フッ素ポリイミド表面の新しいバイオマテリアルとしての可能性を紹介する。

Bio-interface Prepared by Fluorinated Polyimide. Hiroyoshi Kawakami

(Department of Applied Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan)

Phone: +81-42-677-1111 (Ext.) 4972, Fax: +81-42-677-2821

E-mail : kawakami-hiroyoshi@c.metro-u.ac.jp

2 ラビング法による微細凹凸パターン化表面の作製

我々は含フッ素ポリイミドが優れた生体適合性を有し、新しい人工臓器材料になりうること、新しいバイオインターフェイスになりうることを既に報告してきた⁷⁾⁻¹⁰⁾。今回は、含フッ素ポリイミドの細胞基材としての可能性について紹介する。ラビング法によるナノ・マイクロパターン表面（微細凹凸）上での細胞凝集体形成は、従来法とは全く異なるメカニズムで細胞の凝集体を形成させることが可能である。このパターン化表面の特徴は①基材の合成が簡便である ②細胞種を限定しないで凝集体を形成できる ③凝集体を容易に剥離できる である。以下にナノ・マイクロパターン化表面の作製法について述べる。

提案しているラビング法は従来の操作法とは異なり、かなり高い圧力でラビング処理を行なうことが特徴である。Fig.1に作製法を示すが、使用するポリイミド材料、用いる布により条件は若干異なるが、細胞の凝集体を形成させるには操作圧力は $5 \times 10^4 \text{Pa}$ 以上が必要であった。その結果、ラビングにより含フッ素ポリイミド表面には、操作圧力とラビング布表面特性に依存的した比較的規則性の高い凹凸が形成されることが明らかとなった。形成された凹凸の幅は約 $100 \text{nm} - 2 \mu\text{m}$ 、高さは約 $5 - 25 \text{nm}$ 程度であり、凹凸形態が連続層としてナノ・マイクロレベルでパターン化されていた (Fig.2)。微細凹凸を有するパターン化表面の特性を明らかにするため、水に対する接触角測定と AFM の付着力測定を行なった。水を用いたマクロな接触角測定では、ラビング表面とラビング未処理表面での差は殆ど認められなかったが、AFM 測定を用いたナノ・マイクロレベルでの測定からはラビング表面とラビング未処理表面での差が認められ、特にラビング表面、つまりパターン化表面の top 領域では比較的親水的な特性を示し、bottom 領域表面ではかなり疎水性が増加していることが明らかとなった。一方、ラビング未処理表面ではそのような傾向は認められなかった。つまり、このパターン化表面ではナノ・マイクロレベルで表面自由エネルギーが異なる凹凸ナノ表面が連続的に形成されるということが明らかとなった。

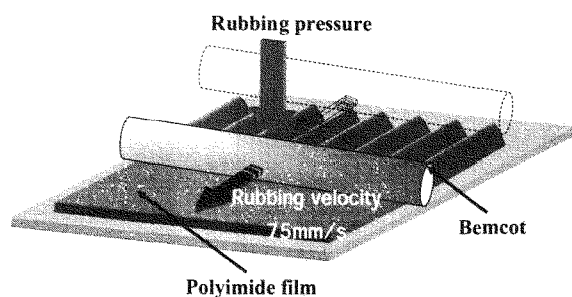


Fig. 1 Schematic representation of rubbing method.

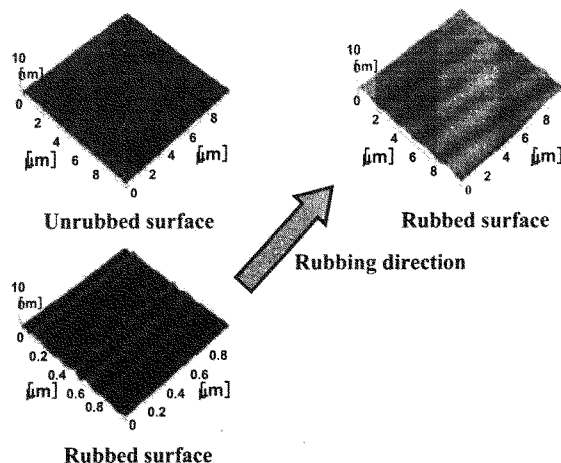


Fig. 2 AFM images of polyimide surface.

3 パターン化表面での細胞増殖挙動と細胞機能の評価

上述したように、ラビング条件により含フッ素ポリイミド表面にはナノあるいはマイクロレベルの凹凸パターン化を形成することができるが、現在のところ細胞レベルの接着や増殖挙動には凹凸パターンレベルの著しい差異はほとんど見られないことと、作製が容易であるマイクロパターン化表面での細胞挙動の結果を紹介する。我々はFR細胞（ラット皮膚由来繊維芽細胞）と HepG2（ヒト肝癌由来細胞）をマイクロパターン化表面上に播種し、播種後の細胞の接着性、増殖能を観察した。Fig.3 には 3 日後の細胞挙動を示したが、FR細胞、HepG2 細胞共にラビング未処理表面では一般的によく見られる細胞が伸展した 2 次元培養を示したのに対し、ラビング処理表面では細胞凝集体であるスフェロイドが確認された。我々は従来の手法とは全く異なる方法で、しかも極めて簡便な方法で肝細胞の凝集体の形成に成功したが、このラビング法の特徴の 1 つは、細胞腫を限定せずにスフェロイドを形成できることである。これは、従来法とは異なり、ラビング表面が特定の細胞と特異的な相互作用を持たないため、多層形成が可能な細胞種であれば細胞を播種した後、細胞が自発的に凝集体を形成するためである。さらに、ラビング処理された含フッ素ポリイミド表面のもう 1 つの特徴は、微細凹凸パターン化表面から凝集体を容易に剥離できることである (Fig.4)。これまでは培養基材から細胞を回収する場合、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を用い細胞を回収する方法が一般的であった。しかし、トリプシン処理を行なうと細胞膜表面に形成された細胞接着分子や受容体、細胞成長因子受容体などが分解され、細胞損傷を引き起こすことが知られている。一方、ラビング処理表面に形成した凝集体は極めて少量の EGTA 添加により凝集体形態とその機能を維持しながら簡単に凝集体を基材表面から脱離できるため、回収も極めて容易に行なえることがわかった。非侵襲的な脱離に近い方法で、細胞損傷を伴わず回収できることもラビング表面の特徴と言える。

次にマイクロパターン表面で形成されたスフェロイド機能の結果の一部を紹介する。繊維芽細胞である FR の細胞機能の指標としてコラーゲン産生量の測定が知られている。

Fig.5 にコラーゲン産生量を

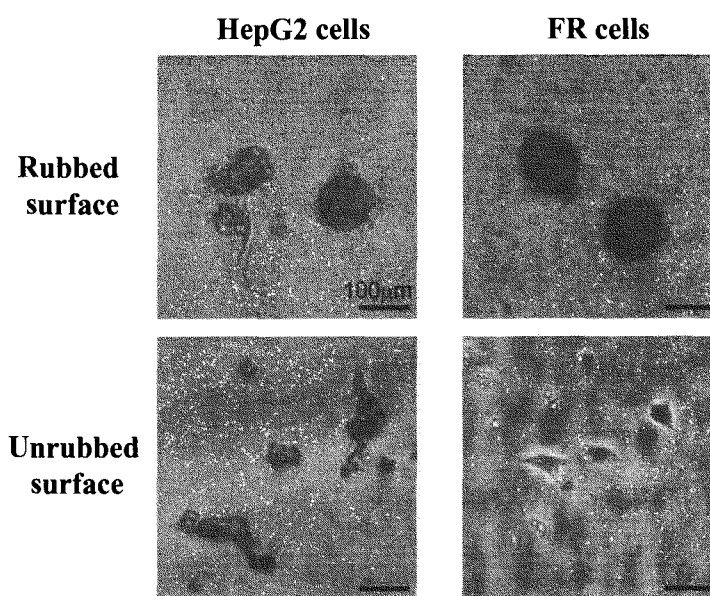


Fig. 3 Phase contrast micrographs of cells.

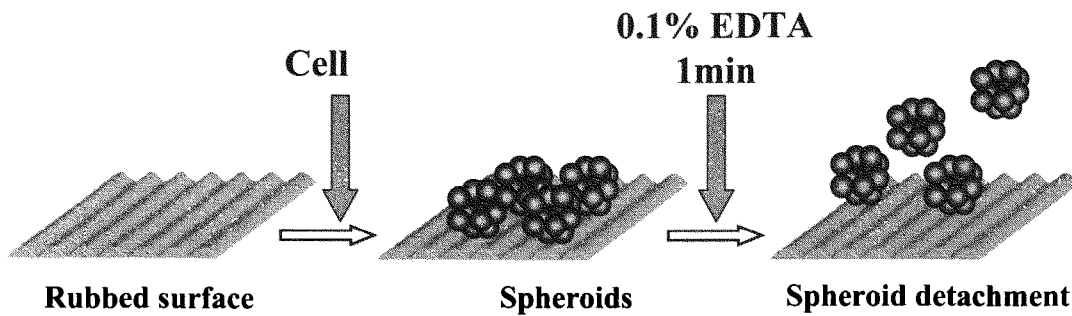


Fig. 4 Detachment of spheroids from rubbed polyimide film.

示したが、ラビング表面上でのコラーゲン産生量は TCPS（ポリスチレン培養皿）に比べ増加しておりその差は顕著であった。これは、スフェロイドでは細胞—細胞間相互作用が強く働くため、二次元培養に比べより生体環境に近い細胞構造を形成しているためである。また、ラビング処理した含フッ素ポリイミド表面上での肝細胞スフェロイド機能をアルブミン産生量から評価すると、やはりラビング表面での産生量は未処理表面に比べ 20%程度増加することが確認できた。

これらの結果は、微細凹凸表面で形成された細胞スフェロイドの機能が、従来の二次元培養に比べ細胞間相互作用の増加により著しく向上し、再生医療で用いられる細胞としては極めて有望であるということを示している。

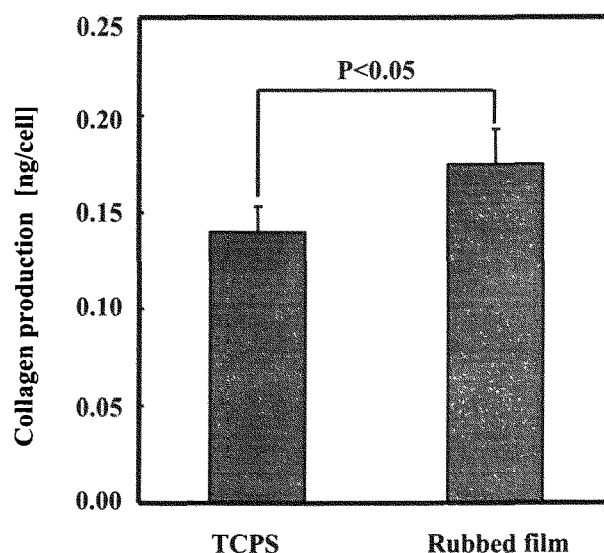


Fig. 5 Amount of collagen production on TCPS and rubbed polyimide film.

4 ポリイミド細胞基材の今後の展開

現在、細胞から臓器の再生をはかる確固たる方法論は確立していない。生体内分解性高分子を用い細胞の凝集体を構築する方法や、細胞をシート状に回収し角膜などのシートとして再生する方法が検討されているが、臓器の再生を実現するにはまだ多くの問題が残されている。臓器は様々な細胞腫から構成させているため、生体由来器官や臓器を再生するには、培養された異なる細胞種の凝集体をヘテロに組み合わせ三次元的にビルディング化を行う必要がある。また、細胞スフェロイドはあまりに大きくなりすぎると、内部への栄養が行き届かなくなり壊死することも知られている。つまり、臓器を再生するにはスフェロイドの大きさを制御しながら血管系の構築を進めビルディング化をはかる必要がある。

我々は、ラビング処理された含フッ素ポリイミド表面にマスクを用いてイオン照射を行なうことにより、細胞スフェロイドの大きさを自在に制御できることを明らかにしてきた。スフェロイドの大きさやパターンは、イオン注入時に使用するマスクにより決定できるため、様々なヘテロなスフェロイドを容易に作製することができる。スフェロイドの大きさや機能を維持したまま基材から剥離することも可能で、既にスフェロイドの融合による巨大化スフェロイドの作製にも成功している。さらに近年、含フッ素ポリイミド上で血管の再生にも成功、血管を導入した新しいスフェロイドの作製にも着手した。このように、ヘテロなスフェロイドを位置、時間、空間を制御しながらビルディング化を行い、血管も必要に応じて導入できれば、臓器の再生も不可能ではないと考えられる。

細胞チップは、バイオテクノロジー産業で急成長が期待される細胞治療において最も重要な役割を果たす技術として注目されているが、細胞チップの作製において特に重要となるのは、細胞の分化と増殖を制御する基材の開発と細胞の微細パターン化技術である。高い細胞機能を保ったまま、高密度に細胞を基材に固定化するには、細胞基材間を制御できる新しいバイointerフェイスを構築する必要がある。機能細胞をアレイ化し、ハイスループットな解析が可能となれば、細胞機能を明確に解析できるようになるため、環境分析、ドラッグスクリーニング、セルトランスフェクション、セル分化誘導研究、再生医療技術等へ細胞チップを用いることが可能となる。

今回我々が提案した基材は、スフェロイドのサイズ、位置を制御してスフェロイドを大量生産できる新しい細胞培養基材であり、ラビング処理により含フッ素ポリイミド膜表面で形成されたナノパターン表面では、細胞が自発的にスフェロイドを形成し、イオン注入処理によりスフェロイドのサイズと位置制御を行うことにより、イオン注入領域にサイズの揃ったスフェロイドを選択的に形成できるため、新しい細胞チップの可能性も示している。

参考文献

- 1) R. Langer, J. P. Vacanti, *Science*, **260**,920(1993).
- 2) P. Parsons-Wingerter, W. M. Saltzman, *Biotechnol. Prog.*, **9**,600(1993).
- 3) J. G. Tong, F. Alvarez, *Exp. Cell. Res.*, **200**,326(1992).
- 4) Y. Sakai, M. Suzuki, *Int. J. Artif. Organs*, **19**,294(1996).
- 5) S. Nagaoka, K. Ahiba, H. Kawakami, *Mater. Sci. Eng. C*, **20**,181(2002)
- 6) H. Kawakami, Y. Okuyama, N. Matsumoto, S. Nagaoka, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **16**,1023(2005)
- 7) H. Kawakami, T. Takahashi, S. Nagaoka, Y. Nakayama, *Polym. Adv. Technol.*, **12**,1(2001).
- 8) M. Niwa, H. Kawakami, M. Kanno, S. Nagaoka, T. Kanamori, T. Shinbo, S. Kubota, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **12**,533(2001).
- 9) M. Kanno, H. Kawakami, S. Nagaoka, S. Kubota, *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**,53(2002).
- 10) 川上浩良、*医学のあゆみ*、199,779(2001).
- 11) 川上浩良、*膜型人工肺の設計*、*設計工学*、**36**, 297-301 (2001).