

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士（工学）

電気化学的細胞脱離のための表面設計

掛川 貴弘

ナノサイエンス・ナノテクノロジー専攻

## 目次

第1章 序論	
1.1 背景	1
1.1.1 再生医療	1
1.1.2 細胞回収法	2
1.2 本研究の目的	6
参考文献	8
第2章 自己組織化ペプチドを用いた細胞接着制御	
2.1 はじめに	9
2.2 実験	9
2.2.1 試薬・装置	9
2.2.2 細胞非接着性ペプチドの金表面への吸着量	
・タンパク質の非特異吸着抑制効果	10
2.2.3 細胞非接着性・接着性ペプチド混合修飾表面への細胞接着	10
2.2.4 細胞接着性ペプチドを用いた電気化学的細胞脱離	11
2.2.5 細胞シートのコラーゲンゲルへの転写	12
2.3 結果・考察	13
2.3.1 細胞非接着性ペプチドの金表面への吸着量	
・タンパク質の非特異吸着抑制効果	13
2.3.2 細胞非接着性・接着性ペプチド混合修飾表面への細胞接着	15
2.3.3 細胞接着性ペプチドを用いた電気化学的細胞脱離	18
2.3.4 細胞シートのコラーゲンゲルへの転写	19
2.3 本章のまとめ	20
参考文献	21
第3章 細胞非接着性ペプチドの設計	
3.1 タンパク吸着と細胞接着	22
3.2 水晶振動子マイクロバランス法	26
3.3 分子動力学計算によるバルク液中でのペプチド二次構造	27
3.3.1 はじめに	27
3.3.2 実験手順	27
3.3.3 結果・考察	27
3.4 実験	28
3.4.1 試薬・装置	28
3.4.2 溶液中でのペプチド二次構造	29
3.4.3 金表面上へのペプチド吸着量	29

3. 4. 4	ペプチド修飾表面への水の接触角	30
3. 4. 5	ペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着量	30
3. 4. 6	細胞パターンニング	31
3. 5	結果・考察	32
3. 5. 1	溶液中でのペプチド二次構造	32
3. 5. 2	金表面上へのペプチド吸着量	33
3. 5. 3	ペプチド修飾表面への水の接触角	34
3. 5. 4	ペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着量	35
3. 5. 5	細胞パターンニング	36
3. 6	本章のまとめ	38
	参考文献	39

#### 第4章 細胞接着性ペプチドを用いた電気化学的細胞脱離

4. 1	はじめに	41
4. 2	自己組織化単分子膜	41
4. 3	電気化学的細胞脱離の原理	42
4. 4	実験	43
4. 4. 1	試薬・装置	43
4. 4. 2	細胞接着性ペプチドの金表面上への吸着量	43
4. 4. 3	細胞接着性ペプチドの還元脱離電位の測定	44
4. 4. 4	細胞接着性ペプチド修飾表面への細胞接着 ・電気化学的細胞脱離	44
4. 4. 5	マイクロ凹凸構造の電気化学的細胞脱離への応用	45
4. 4. 5. 1	ナノインプリンティング技術	45
4. 4. 5. 2	マイクロピラー基板上での電気化学的細胞脱離	45
4. 4. 5. 3	マイクロピラー基板上での細胞シートのコラーゲンゲルへの転写	46
4. 5	結果・考察	47
4. 5. 1	細胞接着性ペプチドの金表面上への吸着量	47
4. 5. 2	細胞接着性ペプチドの還元脱離電位	49
4. 5. 3	細胞接着性ペプチド修飾表面への細胞接着 ・電気化学的細胞脱離	50
4. 5. 4	マイクロピラー基板上での電気化学的細胞脱離	52
4. 5. 5	マイクロピラー基板上での細胞シートのコラーゲンゲルへの転写	54
4. 6	本章のまとめ	57
	参考文献	58

第5章	総括	59
-----	----	----

研究業績一覽 .....61

謝辭

## 第1章

### 序論

#### 1.1 背景

##### 1.1.1 再生医療

重篤な臓器不全患者に対する治療法として、現在臓器移植または人工臓器による治療が行われている。しかしながら、臓器移植には、慢性的なドナー不足、拒絶反応、免疫抑制に伴う合併症などの問題点がある。また、人工心臓や人工腎臓に代表される人工臓器による治療も効果が一時的であり、身体への負担が大きい、補助できる機能が限られているなどといった課題がある。これらの従来型治療法を代替する新たな治療法として、再生医療が注目されている。特に、今後の医療では患者を救命するだけでなく、失われた組織や臓器を再生し国民の健康を維持する技術が望まれている。これらの次世代医療技術は、高齢化社会の到来する我が国において、患者の「生活の質(Quality of Life)」の向上を含めた画期的な治療技術になりうると期待されている。また、その他の多くの疾病においても、通院や入院期間の短縮による医療費の削減、介護などの福祉費の減少に寄与すると考えられている。

再生医療とは、一般に損傷した臓器や組織などにおいて、生物が本来持つ再生能力を元に失われた組織を生体外で構築し、治療を行う技術である。そのアプローチとしてこれまでに、耳や鼻などの比較的単純な組織については、生分解性多孔質ポリマーを目的組織の形状に加工し、これに細胞を播種して移植する手法が試みられてきた<sup>[1]</sup>。しかし、この方法は移植後の細胞の増殖と自発的な組織化に依存しており、生分解に伴う局所的な pH の低下や、分解速度と細胞増殖速度との釣り合いがとれないといった問題があり、一部の組織に臨床応用されていないのが現状である。そのため、生体外で組織構造そのものを再構築し、それを移植する組織工学(Tissue Engineering)的的手法が求められている。

この手法は、生命医科学分野だけでは実現が困難であった研究領域であるが、理工学的な技術との連携により急速に進歩しつつある。組織を再構築した後に移植するこの治療法は、単に細胞を注射針で障害組織に注入する細胞移植療法と比較して、移植した組織の生着率が良い、高い治療効果が得られる、多様な組織・臓器の治療に応用でき得るといった利点がある。細胞は生体内では他の細胞や細胞外マトリックスに接着した状態で存在しており、その結合が生体のさまざまなシグナル伝達を担っているため、より生体内に近い組織の状態で移植することは非常に重要である。このためには、作製した三次元組織体を非侵襲的に培養表面から回収する技術が不可欠である。

### 1.1.2 細胞回収法

細胞回収技術として、ある外部刺激により表面の細胞接着性を変化させることにより細胞を回収する技術が報告されている。

#### 酵素処理法

通常の細胞培養において、ディッシュ上に接着した細胞を回収する際にはトリプシンやコラゲナーゼなどのタンパク分解酵素が用いられる。この酵素の作用により、細胞 - 培養基板間の接着分子や細胞 - 細胞間の結合が分解され、単離した細胞が回収可能である。しかし、これらの酵素は細胞 - 細胞間の結合を分解してしまうため、細胞同士が互いに結合した組織状態のまま回収することはできない。また、酵素処理により細胞膜に存在していた様々なタンパクも分解され、細胞は少なからずダメージを受ける。

#### 磁性ナノ粒子を利用した手法

九州大学の井藤らは、磁力の変化を利用して細胞組織を構築する技術を開発している<sup>2)</sup>。これは、磁性ナノ粒子であるマグネタイトを細胞内に取り込ませることによって細胞を磁気標識し、磁石を目的の位置に設置し、磁力で細胞を任意の場所に配置・接着させて、細胞を高密度に集積させる、または細胞からなる3次元組織を構築する手法である。また、細胞非接着性の培養基板上に磁力によって細胞を固定させているため、組織を構築した後に磁石を取り除くのみで容易に回収可能である(Fig. 1. 1)。井藤らはこ

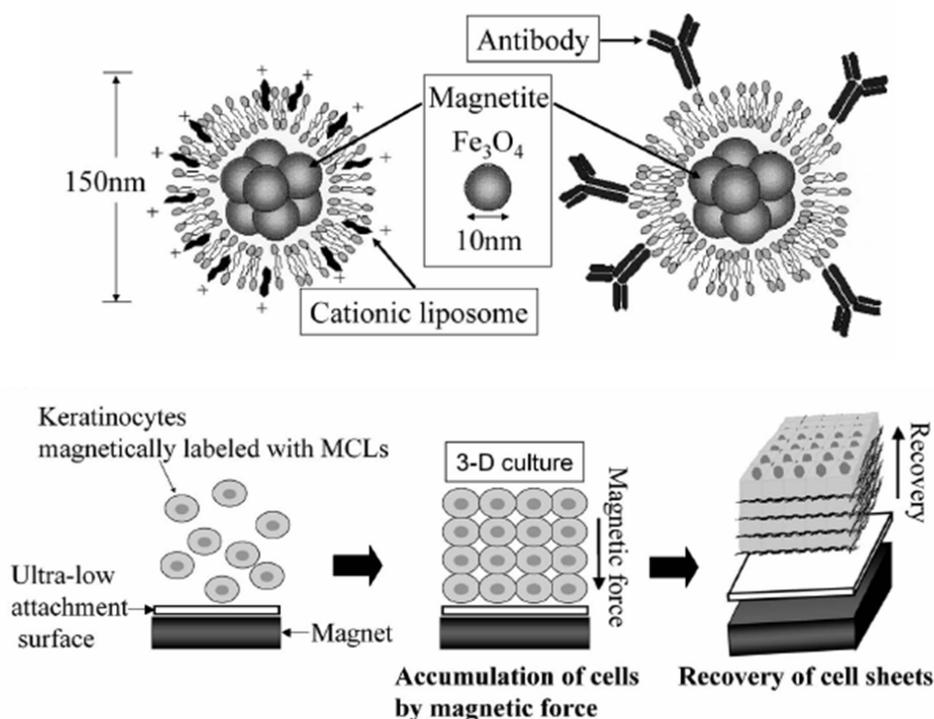


Fig. 1. 1 磁性ナノ粒子の構造(上)と3次元組織の構築(下)

の技術を用いて、異種の細胞シートとの共培養や血管を模倣した管状構造の構築を報告している。

### 光刺激を利用した手法

光反応を利用した手法では、光の波長に応じてシストランスの異性体変化が生じる分子や特定の部位で開裂が生じる分子が利用されている(Fig. 1. 2)。この手法では、azobenzen や spiropyran などを含む単分子膜が利用されている。J. Auernheimer らは、中央に azobenzen、片末端に RGD ペプチドを備えた分子を用いている。この分子層で覆われた表面に紫外光を照射することにより、位置特異的に細胞接着性をスイッチングしたり、接着した細胞を脱離できることが報告されている<sup>[3, 4]</sup>。

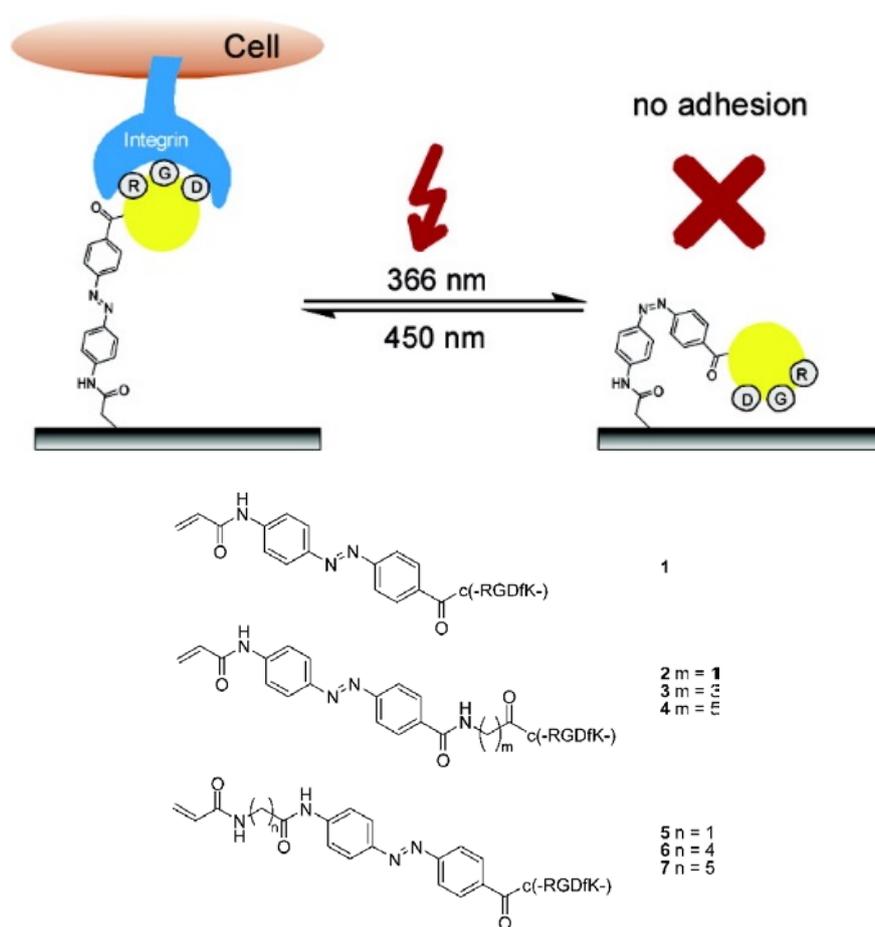


Fig. 1. 2 光刺激を利用した細胞接着制御

### 温度変化を利用した手法

東京女子医科大学の岡野らは、シート状のパーツ組織を構築し、これらを積層化させることで目的組織を構築する「細胞シート工学」を提唱している<sup>[5]</sup>。この手法では、細胞シートをその構造を維持したまま回収するために温度応答性ポリマー(PNIPAM)と呼ばれる特殊なポリマーを培養皿表面に修飾している。温度応答性ポリマーは、32°Cより高温側では疎水性(細胞接着性)、低温側では親水性(細胞非接着性)を示すため、このポリマー状で細胞シートを形成させた後に温度を下げることによって細胞の接着性が弱まり、細胞シートが培養皿から自発的に剥離する。この技術により回収した角膜や心筋の細胞シートは、臨床試験にて安全性や効果を評価する段階まで達している(Fig. 1.3)<sup>[6]</sup>。

また、ベンチャー企業である株式会社セルシートは温度応答性ポリマーを基板表面に固定した細胞シート回収用培養皿 *UpCell* を販売している。この手法は大変効果的であるが、培養期間を通して厳密な温度管理が必要であり、また組織を脱着させるのに30~70分という比較的長い時間を要するといった課題がある<sup>[7, 8]</sup>。特に、多層化細胞シートの作製のように細胞シートを繰り返し剥離する場合には、より短時間で脱着可能な技術が求められる。

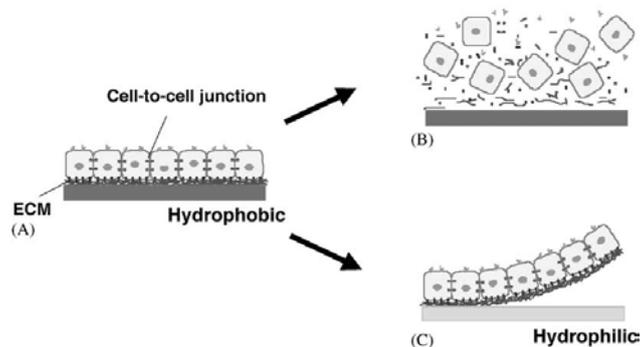


Fig. 1.3 温度応答性ポリマーを利用した細胞シートの回収(上)  
および角膜移植 (下)

### 電気刺激を利用した手法

電気刺激を利用した手法は、単分子膜の構造変化を利用する手法、電気化学的な反

応を利用する手法に大別できる。単分子膜の構造変化を利用する方法では、バルキーな保護基を挿入することで低密度のアルカンチオール自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer, SAM)を金表面に形成し、その後この保護基を除去することでアルカンチオール分子が構造変化を生じるスペースを確保する。そして、この表面に正の電位を印加すると末端のカルボキシル基が電極に引き寄せられて分子が屈曲することで表面にアルキル鎖が提示されて疎水性となる。逆に負の電位を印加するとカルボキシル基が反発して表面に提示され親水性となる。このようにして表面の親・疎水をスイッチングするものである(Fig. 1. 4)<sup>[9]</sup>。

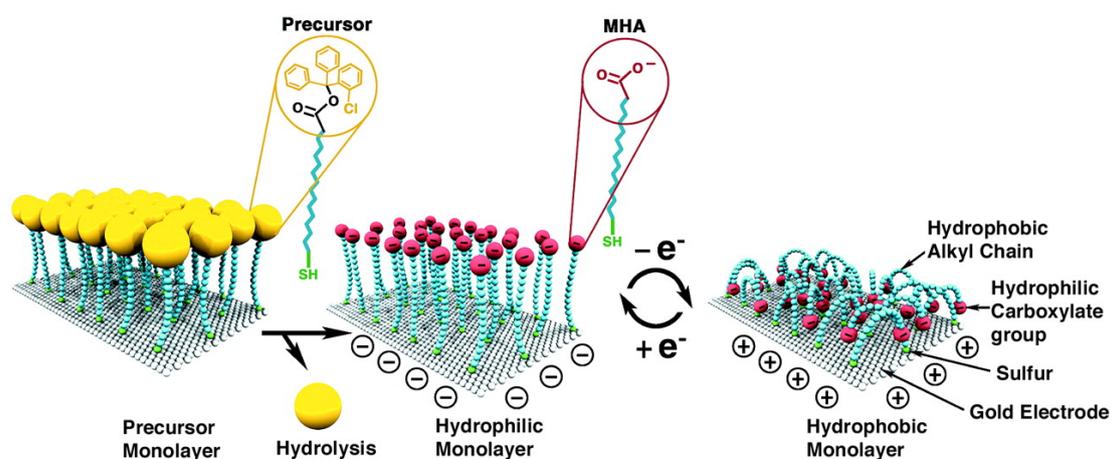


Fig. 1. 4 単分子膜の構造変化を利用した細胞接着制御

また、電気化学的な反応を利用する方法では、2種類の異なる quinone 類を含む SAM を表面にパターンニングし、それぞれが正または負の電位印加により酸化、もしくは還元され、切断される反応を利用し、細胞脱離が可能であることが報告されている(Fig. 1. 5)<sup>[10]</sup>。

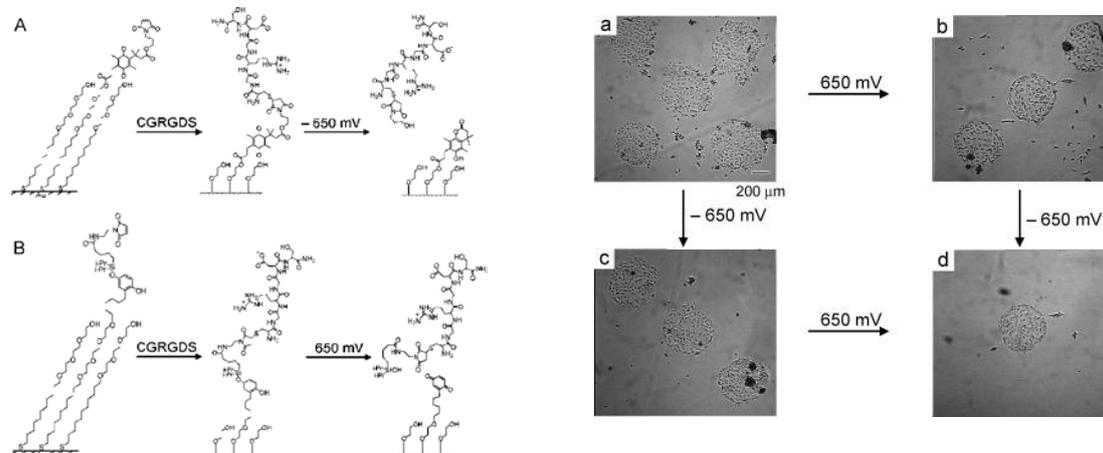


Fig. 1. 5 電気化学反応を利用した細胞接着制御

電気化学的な反応を利用したその他の手法として、金表面上に形成した高密度のアルカンチオール自己組織化単分子膜、もしくはブリッジ型ペプチドを、用いた手法が報告されている<sup>[11,12]</sup>。この原理は、金-チオール結合を利用して金電極上に単分子層を形成し、これを介して接着させた細胞を金-チオール結合を切断することで脱離させるものである(Fig. 1. 6)。これまでに、アルカンチオール自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayer: SAM)、もしくは中央に細胞接着アミノ酸配列 RGD、両末端にチオール基を有するアミノ酸であるシステイン (C) を有するブリッジ型オリゴペプチド(配列: CRRGDWLC)を用いて、細胞や細胞シート、スフェロイドの回収が可能であることが示されている。アルカンチオール SAM を用いる方法では、5分程度で細胞を脱離させることが可能であったが、アルカンチオール分子は生体内に存在しないものであるため、将来の臨床応用において安全性の問題が生じる可能性がある<sup>[13,14]</sup>。一方、オリゴペプチドを用いた方法は、ペプチドは分解されてもアミノ酸が生じるのみであることから安全性の高い方法であるといえるが、電位印加後にも 5~10%ほどの細胞は脱離せず、基板に残存するという課題がある。

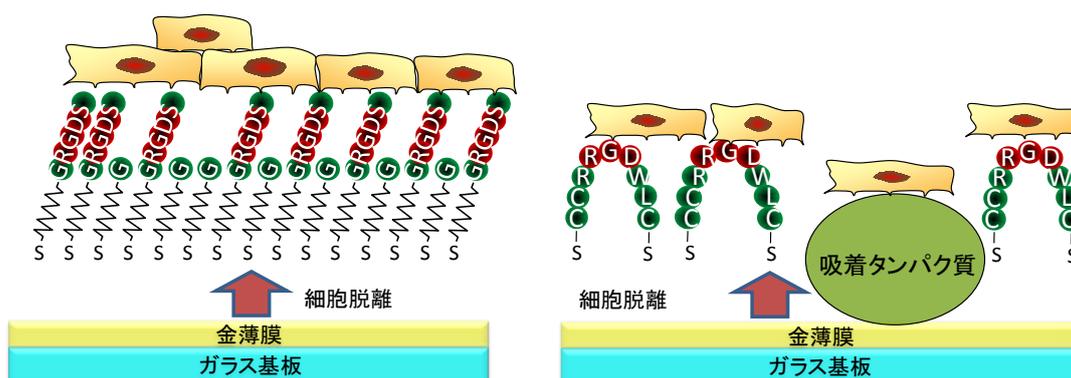


Fig. 1. 6 電気化学的細胞脱離法

アルカンチオール SAM(右)、ブリッジ型オリゴペプチド(左)

## 1.2 本研究の目的

本研究では、電気化学的細胞脱離法の安全性、残存細胞という 2 つの課題を解決し、安全かつ確実な細胞脱離技術の確立を目的とした。

残存細胞の原因に関して、ペプチド層がアルカンチオール SAM のように密な分子層を形成していないため、培地中のタンパクなどが金表面に直接非特異吸着し、これを介して細胞が接着してしまったためであると考えた。つまり、自己組織化し表面を密に覆うオリゴペプチドを設計すれば、安全かつ確実な細胞脱離が実現できるのではないかと考えた。

そこで、リジン (K)、グルタミン酸 (E) のようなプラス、マイナスにチャージしたアミノ酸を交互に配置したオリゴペプチド二種類を設計した(Fig. 1. 13)。細胞接着配

列を持たない細胞非接着性オリゴペプチド、は、末端のシステイン（C）の持つチオール基を介して金表面に自発的に結合し、隣接するペプチド間においてリジン（K、+電荷）とグルタミン酸（E、-電荷）の静電的な相互作用によって自己組織化するように設計した。この細胞非接着性オリゴペプチドは表面の電荷が打ち消される、いわゆる両性イオンオリゴペプチドでもある。すでに、このような両性イオン分子が、従来のポリエチレングリコールのようなポリマーコート表面と同等以上の非特異吸着抑制効果があることは報告されている<sup>[15]</sup>。また、末端に細胞接着配列 RGD を配置した細胞接着性オリゴペプチドも加えることで、タンパクの非特異吸着を抑制した上で細胞が接着できる表面を設計した。これにより、素早くかつ確実な細胞脱離が実現できるのではないかと考えた。

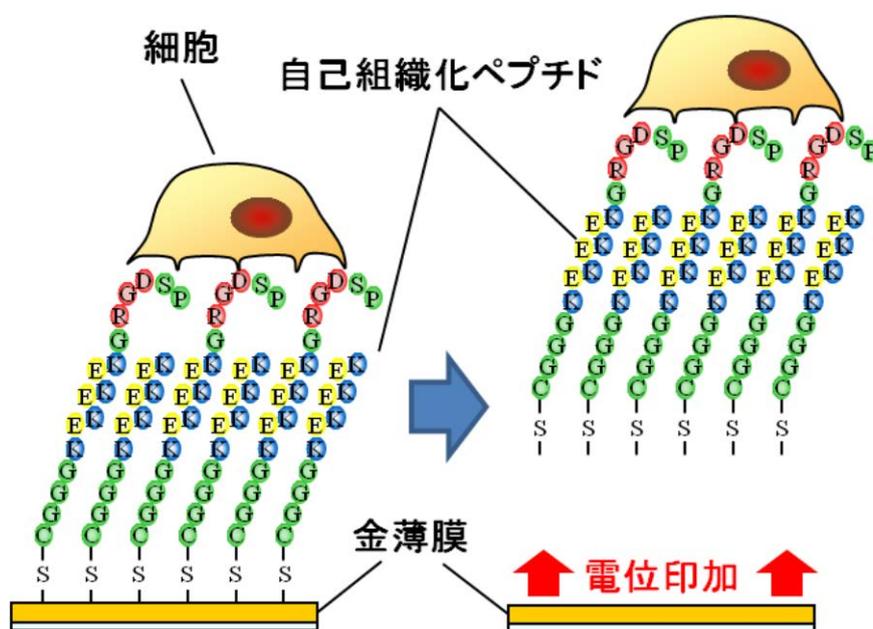


Fig. 1. 7 自己組織化オリゴペプチドを用いた電気化学的細胞脱離

## 参考文献

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-6.
- [2] Ito A, Honda H, Kamihira M. Construction of 3D tissue-like structure using functional magnetite nanoparticles. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2008;128:21-8.
- [3] Ichimura K, Oh SK, Nakagawa M. Light-driven motion of liquids on a photoresponsive surface. *Science*. 2000;288:1624-6.
- [4] Hayashi G, Hagihara M, Dohno C, Nakatani K. Photoregulation of a peptide-RNA interaction on a gold surface. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129:8678-9.
- [5] Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering. *Materials Today*. 2004;7:42-7.
- [6] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *New England Journal of Medicine*. 2004;351:1187-96.
- [7] 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*. 2000;50:82-9.
- [8] Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Accelerated cell sheet recovery by co-grafting of PEG with PIPAAm onto porous cell culture membranes. *Biomaterials*. 2003;24:1223-32.
- [9] Lahann J, Mitragotri S, Tran TN, Kaido H, Sundaram J, Choi IS, et al. A reversibly switching surface. *Science*. 2003;299:371-4.
- [10] Yeo WS, Mrksich M. Electroactive self-assembled monolayers that permit orthogonal control over the adhesion of cells to patterned substrates. *Langmuir*. 2006;22:10816-20.
- [11] Inaba R, Khademhosseini A, Suzuki H, Fukuda J. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers for engineering cellular tissues. *Biomaterials*. 2009;30:3573-9.
- [12] Seto Y, Inaba R, Okuyama T, Sassa F, Suzuki H, Fukuda J. Engineering of capillary-like structures in tissue constructs by electrochemical detachment of cells. *Biomaterials*. 2010;31:2209-15.
- [13] Barbosa JN, Barbosa MA, Aguas AP. Adhesion of human leukocytes to biomaterials: An in vitro study using alkanethiolate monolayers with different chemically functionalized surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;65A:429-34.
- [14] Barbosa JN, Barbosa MA, Aguas AP. Inflammatory responses and cell adhesion to self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Biomaterials*. 2004;25:2557-63.
- [15] Chen SF, Cao ZQ, Jiang SY. Ultra-low fouling peptide surfaces derived from natural amino acids. *Biomaterials*. 2009;30:5892-6.

## 第2章

### 自己組織化ペプチドを用いた細胞接着制御

#### 2.1 はじめに

電気化学的細胞脱離の課題であった安全性、残存細胞の問題を解決するため、新たに自己組織化ペプチドを設計した。細胞接着配列を持たない細胞非接着性ペプチド(配列: CGGGKEKEKEK)は、末端のシステイン(C)の持つチオール基を介して、金表面に自発的に結合し、隣接するペプチド間においてリジン(K、+電荷)およびグルタミン酸(E、-電荷)の静電的な相互作用によって表面で自己組織化するように設計したものである。また、末端に細胞接着配列 RGD を付与した細胞接着性ペプチド(配列: CGGGKEKEKEKGRGDSP)も加えることで、タンパクの非特異吸着を抑制しつつ細胞が接着可能な表面を設計した。本章では、上述二種類の自己組織化ペプチドについて金表面上への吸着量、タンパク質の非特異吸着抑制効果、電気化学的細胞脱離への影響を評価した。

#### 2.2 実験

##### 2.2.1 試薬・装置

以下に、実験に用いた試薬および装置を示す。特に記述のないものは、全て市販品を使用した。試薬の調製には、MilliQ 水を用いた。

##### 【試薬】

- ・細胞非接着性オリゴペプチド : CGGGKEKEKEK, Sigma-Aldrich Japan
- ・細胞接着性オリゴペプチド : CGGGKEKEKEKGRGDSP, Sigma-Aldrich Japan
- ・ブリッジ型オリゴペプチド : CCRRGDWLC, Sigma-Aldrich Japan
- ・Fibrinogen, F0129 : Sigma-Aldrich Japan
- ・Fibronectin, from bovine plasma : F4759, Sigma-Aldrich Japan
- ・Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), D5796, Sigma
- ・マウス線維芽細胞 Swiss 3T3(RCB1642), Riken Cell Bank
- ・ヒト間葉系幹細胞 hBMSC, Lonza, Switzerland
- ・コラーゲンタイプ 1A, 新田ゼラチン

##### 【装置】

- ・AFFINIX QN, initium
- ・スパッタデポジション装置 CFS-4ES-231, Shibaura Eletec
- ・位相差顕微鏡 IX-71, Olympus
- ・ポテンシostat / ガルバノスタット : HA-151, Hokuto denko

- ・ Ag/AgCl 参照電極： #2080A, HORIBA
- ・ 位相差顕微鏡： IX-71, Olympus

### 2.2.2 細胞非接着性ペプチドの金表面への吸着量・タンパク質の非特異吸着抑制効果 実験手順

#### 電極表面の洗浄

1%SDS 溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、濃硫酸：過酸化水素水=3：1 の Piranha 溶液を滴下し、室温で 5 分間放置後、純水で洗浄した。

#### 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が±3 Hz/min 程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

#### オリゴペプチドの修飾

電極表面にオリゴペプチド溶液(50 μM 細胞非接着性オリゴペプチド水溶液, 50 μM ブリッジ型オリゴペプチド水溶液)をそれぞれ滴下し、4℃で一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

#### オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

#### タンパク質の吸着

オリゴペプチド修飾電極に 1 mg/ml フィブリノーゲン、1 mg/ml フィブロネクチン溶液をそれぞれ滴下し、室温で 30 分間放置した。

#### タンパク質吸着電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

### 2.2.3 細胞非接着性・接着性ペプチド混合修飾表面への細胞接着

#### 実験手順

#### 基板洗浄

カバーガラスを 25%アンモニア水：30%過酸化水素水：純水=1：1：4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

#### Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。Cr は Au の密着層である。その後引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

#### オリゴペプチドの修飾

細胞接着性オリゴペプチド：細胞非接着性オリゴペプチド = 100：0, 1：99, 0.1：99.9,

0.01 : 99.99, 0.001 : 99.999, 0 : 100 (Total conc. 50  $\mu\text{M}$ )のオリゴペプチド溶液に金基板をそれぞれ浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

#### 基板の滅菌

オリゴペプチドを修飾した金基板をクリーンベンチ内で70 %エタノール→滅菌水の順に洗浄して滅菌し、 $\phi$  35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

#### 細胞の播種

マウス線維芽細胞 3T3 を 10%FBS 添加培地に、 $5.0 \times 10^5$  cells/ml の密度で懸濁し、1 ディッシュあたり 2 ml 量、つまり  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の密度で細胞を播種した。

#### 接着細胞数のカウント

培養後、接着細胞数をカウントした。

### 2.2.4 細胞接着性ペプチドを用いた電気化学的細胞脱離

#### 実験手順

##### 基板洗浄

カバーガラスを 25 %アンモニア水 : 30 %過酸化水素水 : 純水 = 1 : 1 : 4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

##### Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。Cr は Au の密着層である。その後引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

##### 細胞接着性オリゴペプチドの修飾

金基板を 50  $\mu\text{M}$  細胞接着性オリゴペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

##### 基板の滅菌

細胞接着性オリゴペプチドを修飾した金基板をクリーンベンチ内で70 %エタノール→滅菌水の順に洗浄して滅菌し、 $\phi$  35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

##### 細胞の播種

マウス線維芽細胞 3T3 を 10%FBS 添加培地に  $2.5 \times 10^5$  cells/ml の密度で懸濁し、1 ディッシュあたり 2 ml 量、つまり  $5.0 \times 10^5$  cells/ml の密度で細胞を播種した。

##### 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内(37°C, 5%  $\text{CO}_2$ -Air)のもとで 24 時間培養した。

##### 電位の印加

細胞培養基板のパッドとなる部分の細胞および水滴を綿棒で除去し、これを作用極、市販の Ag/AgCl 電極を参照極、白金板を対極とし、三電極系を形成した。これらをポテンシオスタットに接続し、PBS 中で定電位 -1.0 V を一定時間印加した。

細胞数のカウント

電位印加後、基板を別のディッシュに移し、位相差顕微鏡画像を CCD カメラによって撮影した。撮影箇所は基板の中央付近を3箇所とした。撮影後、残存細胞数をカウントした。

**2.2.5 細胞シートのコラーゲンゲルへの転写**

実験手順

基板洗浄

カバーガラスを 25%アンモニア水：30%過酸化水素水：純水=1：1：4 の沸騰水溶液に5分間浸漬し、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を1分間スパッタした。Cr は Au の密着層である。その後引き続き、Au を同条件にて2分間スパッタした。

細胞接着性オリゴペプチドの修飾

金基板を 50  $\mu\text{M}$  細胞接着性オリゴペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

基板の滅菌

細胞接着性オリゴペプチドを修飾した金基板をクリーンベンチ内で70 %エタノール→滅菌水の順に洗浄して滅菌し、 $\phi$  35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

細胞の播種

ヒト間葉系幹細胞 hBMSC を 10%FBS 添加培地に  $5.0 \times 10^5$  cells/ml の密度で懸濁し、1ディッシュあたり 2 ml 量、つまり  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の密度で細胞を播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内(37°C, 5%  $\text{CO}_2$ -Air)のもとで72時間培養し、細胞シートを形成させた。

コラーゲンゲル層の形成

細胞シートを形成させた基板の周囲に PDMS の囲いを装着し、そこへコラーゲンゲル前駆体溶液(コラーゲンタイプ 1A： $\times 10$  培地：緩衝液 = 8:1:1)を 300  $\mu\text{l}$  入れ、インキュベータ内で30分間静置し、ゲル化させた。

電位の印加

PDMS の囲いの装着された基板を作用極、市販の Ag/AgCl 電極を参照極、白金板を対極として三電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続し、定電位-1.0 V を5分間印加し、細胞シートを脱離させコラーゲンゲルへ転写した。

細胞シートの生死染色

5 mg FDA / ml in DMSO 溶液 2  $\mu\text{l}$  と、40  $\mu\text{g}$  EB / ml in PBS 溶液 1 ml を混合し、これを回

収した細胞シートの入ったディッシュに加え、37°C下で5分間インキュベートした後、PBSで3回洗浄した。

#### 蛍光顕微鏡観察

FDA, EBを蛍光顕微鏡観察し、CCDカメラで画像を撮影した。これらの色素について、Table 2.1にまとめた。

Table 2.1 FDA および EB の染色対象および波長

色素名	染色対象	励起光波長	蛍光波長 / 発色
FDA (Fluorescein diacetate)	生細胞 (エステラーゼ基質)	495 nm	520 nm / 黄緑
EB (Ethidium bromide)	死細胞 (DNA, 細胞膜不透過)	510 nm	595 nm / 赤

## 2.3 結果・考察

### 2.3.1 細胞非接着性ペプチドの金表面への吸着量・タンパク質の非特異吸着抑制効果

本節では、水晶振動子マイクロバランス法(Quartz Crystal Microbalance: QCM)を用いて、金表面に形成した細胞非接着性オリゴペプチドの吸着量を測定し、従来法である両末端にシステイン、中央に細胞接着配列 RGD を持つブリッジ型オリゴペプチドとの比較を行う。また、それぞれのペプチドを修飾した表面へのタンパク質の非特異吸着について検討した。

それぞれのオリゴペプチドの吸着量を Fig. 2.1 に示す。2つのオリゴペプチドの吸着量に大きな差は見られなかった。ブリッジ型オリゴペプチドは、両末端にチオール基を含むアミノ酸であるシステインを有するため、ジスルフィド結合によりペプチド分子同士が結合した形ができやすい。一方、細胞非接着性オリゴペプチドでは、システインは片末端のみであるため、ジスルフィド結合は起こりにくく、表面に密に吸着しているものと考えられる。実際、今回の結果より細胞非接着性オリゴペプチドが表面に四角配置で吸着していると仮定すると、ペプチド分子間の距離は約 1.2 nm と見積もることができる。アルカンチオール自己組織化単分子膜の分子間距離を同様の仮定で見積もると、約 0.6 nm であり<sup>11)</sup>、今回設計した細胞非接着性オリゴペプチドも密に吸着していると考えられる。

それぞれのペプチドを修飾した表面へのタンパク質の非特異吸着を測定したところ、Fig. 2.2 に示すように、どちらのオリゴペプチドを修飾した表面でも、未修飾表面と比較してタンパク質の吸着は抑制された。しかし、減少割合には大きな差があり、フィブロネクチンではブリッジ型オリゴペプチドでは 55 %、細胞非接着性オリゴペプチドでは 6.8 %、フィブリノーゲンではブリッジ型オリゴペプチドでは 29 %、細胞非接

着性オリゴペプチドでは3.6%であった。フィブロネクチンは細胞外マトリックスの一種であり、他の細胞外マトリックスとの橋渡し役としての役割や、細胞表面のインテグリンレセプターとの相互作用を通して細胞接着に大きく関わっている。また、フィブリノーゲンはフィブロネクチンと構造的に似ており、培養表面に素早く吸着する<sup>2)</sup>。したがって、この2つのタンパク質の吸着を抑制できる表面は、細胞接着抑制や、細胞のパターニングに有用であると考えられる。

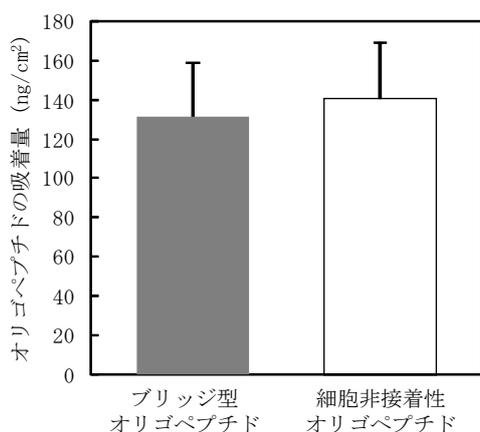


Fig. 2.1 ペプチド吸着量

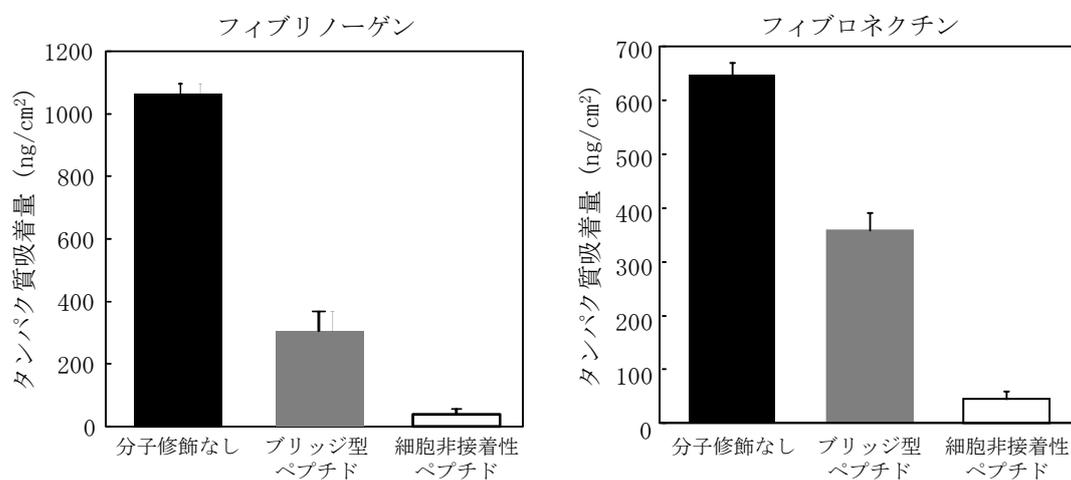


Fig. 2.2 タンパク質の非特異吸着抑制効果

### 2.3.2 細胞非接着性・接着性ペプチド混合修飾表面への細胞接着

本節では、設計した細胞非接着性ペプチド、また、末端に細胞接着配列 RGD を加えた細胞接着性ペプチドを混合し、修飾した表面への細胞接着を評価することで、ペプチド修飾により細胞接着が制御可能であるか、また細胞接着に必要な RGD 数を明らかにした。

二種類のオリゴペプチドを混合して修飾した表面への細胞の初期接着を確認した。Fig. 2.3 は、3 時間培養後の画像、Fig. 2.4 は、この画像から求めた定量的なデータを示している。この結果より、細胞接着性オリゴペプチドの割合が 100% ~ 1% の場合、接着細胞数に大きな違いは観られないが、0.1% 以下の場合、細胞接着性オリゴペプチドの割合が減少するにつれて接着細胞数は減少しており、また、100% ~ 1% の場合、細胞がより伸展しているのに対し、0.1% 以下の場合、初期接着細胞数が抑制された。

続いて、細胞増殖評価を行うため、細胞密度が疎な条件において同様の評価を行った結果が Fig. 2.5 である。二種類のオリゴペプチドを混合して修飾した表面においては、細胞の初期接着だけでなく、増殖にも違いがみられた。細胞接着性オリゴペプチドの割合が 100% ~ 1% の場合では、細胞は良好に増殖した。一方、0.1% 以下の場合、細胞増殖は抑制された。実際、培養 2 日目の増殖率を初期接着細胞数から求めたところ、100%、1% ではそれぞれ 2.9、3.0 であったのに対し、0.1%、0.01%、0.001%、0% では、それぞれ 1.7、0.8、1.5、0.9 であった。

細胞接着に必要な RGD の量は、オリゴエチレングリコールを有するアルカンチオールと、オリゴエチレングリコールの末端に RGD ペプチドを有するアルカンチオールの種々の混合比の溶液より調製された自己組織化単分子膜上への細胞接着を確認する実験によって明らかにされている<sup>[3, 4]</sup>。これによれば、細胞接着にはオリゴエチレングリコールの末端に RGD ペプチドを有するアルカンチオールの割合は少なくとも 0.01% 必要であり、細胞の伸展には少なくとも 0.1% 必要である。最も密なアルカンチオール自己組織化単分子膜の最大吸着量を 0.93 nmol/cm<sup>2</sup> と仮定<sup>[5]</sup>して細胞の接着、伸展に必要な RGD の量を見積もると、それぞれ、9.3 fmol/cm<sup>2</sup>、930 fmol/cm<sup>2</sup> となる。

また、細胞非接着性オリゴペプチドの吸着量は 140 ng/cm<sup>2</sup> であった。細胞接着性オリゴペプチドの吸着量も同等であると仮定して、細胞接着性オリゴペプチド 0.1% の場合の RGD の量を見積もると、細胞接着には 140 fmol/cm<sup>2</sup> の RGD が必要であった。

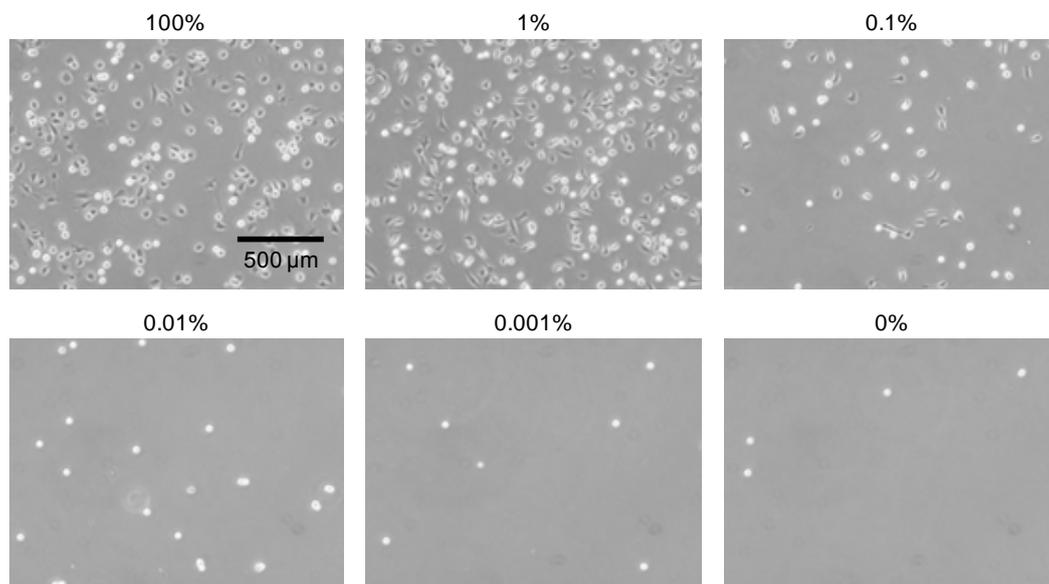


Fig. 2.3 オリゴペプチド混合修飾表面への細胞初期接着

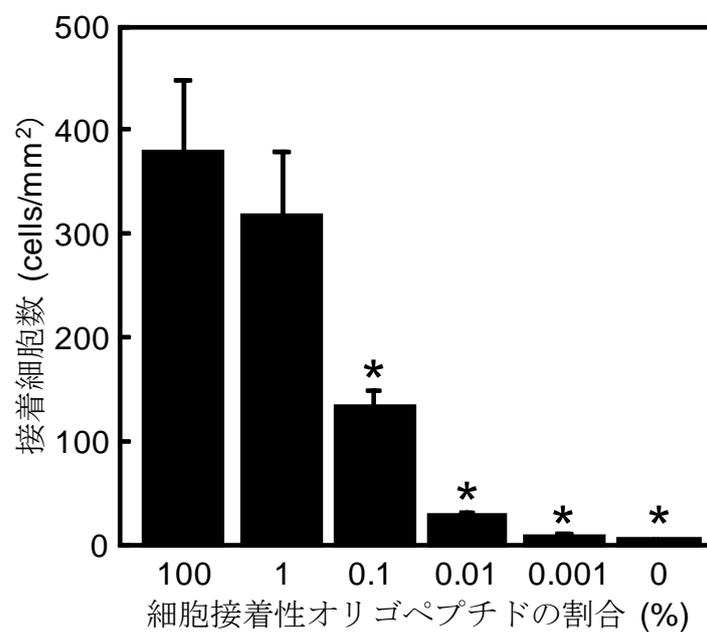


Fig. 2.4 オリゴペプチド混合修飾表面上の接着細胞数

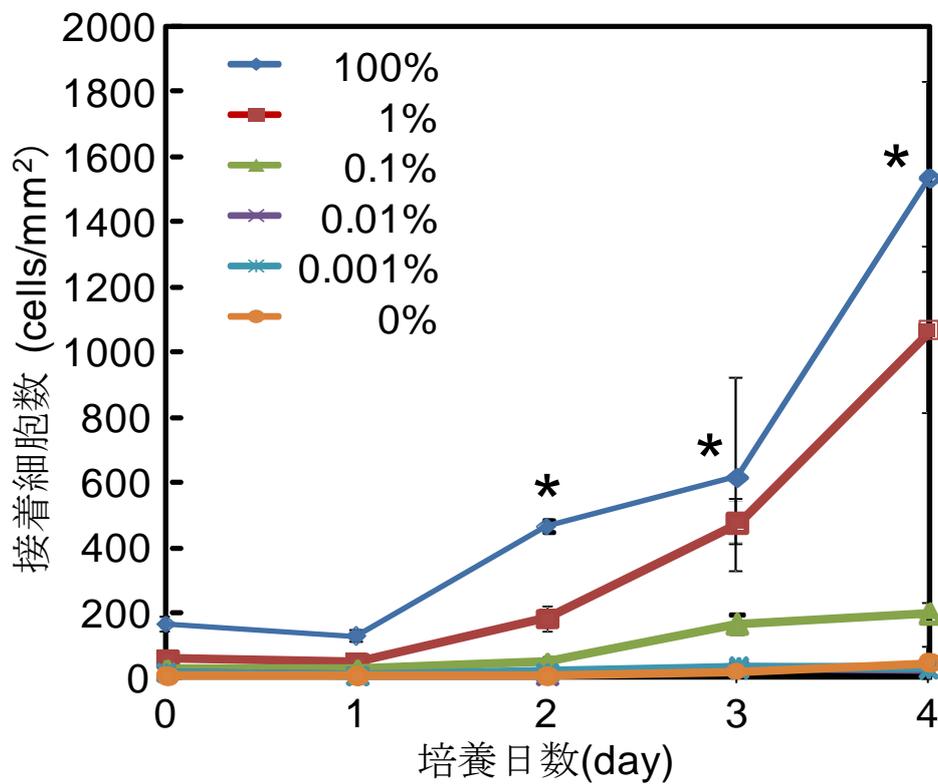


Fig. 2.5 オリゴペプチド混合修飾表面上での細胞増殖

### 2.3.3 細胞接着性ペプチドを用いた電気化学的細胞脱離

Fig. 2.6 に、電位印加による細胞脱離の様子を定量的に評価した結果を示す。ここで、縦軸は電位印加前に基板に接着していた細胞数を 100%としたときの残存細胞率 (%)を示しており、横軸は、電位印加時間を表している。

従来法であるブリッジ型オリゴペプチドを用いた場合は 5 分間の電位印加後にも 10% ほどの細胞が残存している。また、アルカンチオール分子を用いた場合、5 分間の電位印加で全ての細胞が脱離している。一方、細胞接着性オリゴペプチドを修飾した基板では、電位印加 1 分後には約 70%の細胞が脱離し、2 分後にはほぼ 100%の細胞が脱離しており、より素早くかつ確実な細胞脱離が実現された

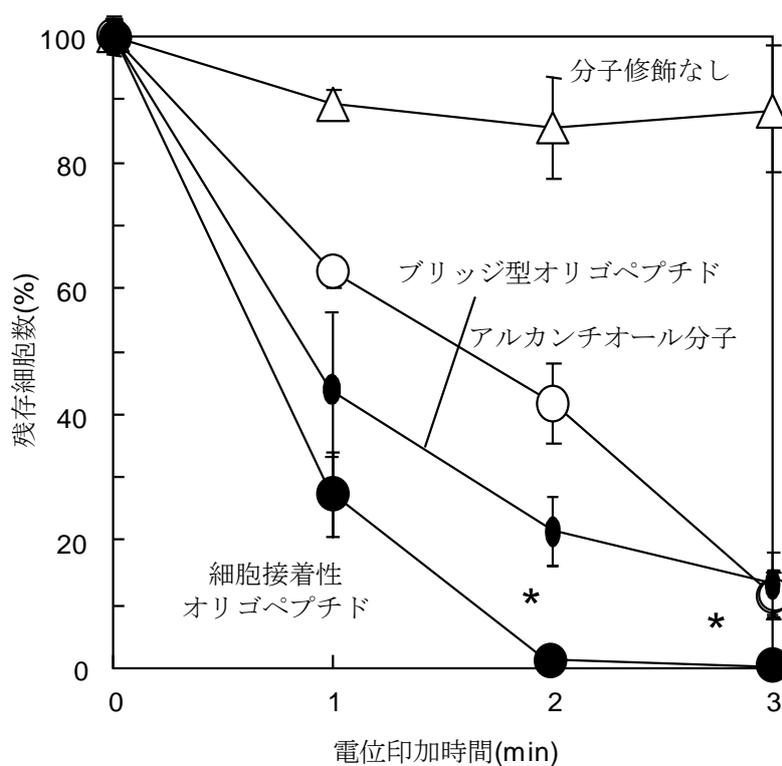


Fig. 2.6 電位印加による細胞脱離の比較

### 2.3.4 細胞シートのコラーゲンゲルへの転写

細胞接着性オリゴペプチド修飾基板上でヒト間葉系幹細胞 hBMSC を培養したところ、3日間程度でコンフルエントとなり、細胞同士が互いに結合したシート状の組織が形成された。基板上に $-1.0\text{ V}$ の定電位を印加したところ、5分間の電位印加により細胞シートが回収された(Fig. 2. 7)。この写真からわかるように、脱離させた細胞シートは細胞間の結合を維持しており、本手法によりシート状の細胞組織の回収が可能であることが示された。これまで単離した状態で接着していた細胞は2分間でほぼ完全に脱離したが、細胞シートの脱離には5分間電位を印加した。これは、電極表面を細胞が覆うことによってイオンや物質移動が妨げられ、細胞自体が抵抗となり電位が均一にかからないのではないかと考えたためである。

電位印加により脱離させた細胞シートの生細胞/死細胞染色の結果を Fig. 2. 8 に示す。この画像より、死細胞は極わずかであり、ほとんどの細胞が良好な生存状態を維持していることが確認され、電位印加による細胞シートへの悪影響はほとんどないことが示された。

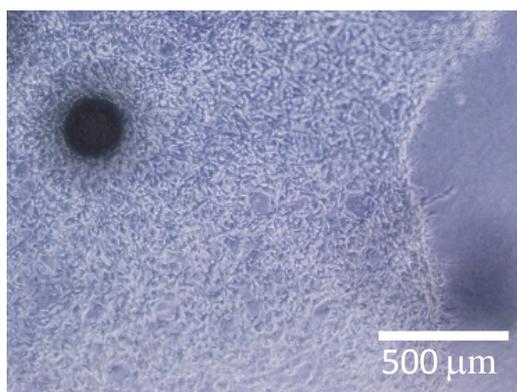


Fig. 2. 7 電位印加により回収した細胞シート

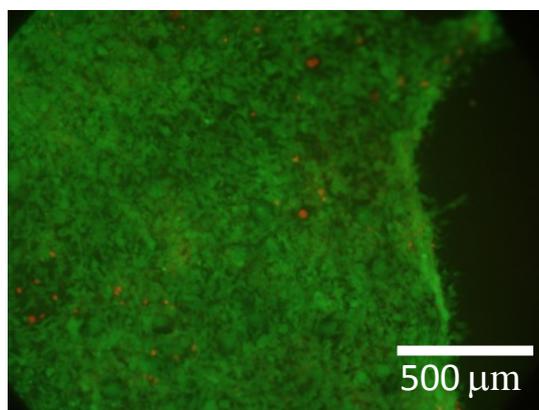


Fig. 2. 8 回収した細胞シートの生細胞(緑)/死細胞(赤)染色

#### 2.4 本章のまとめ

本章で設計した自己組織化ペプチドを用いることで、タンパク質の非特異吸着を抑制しつつ細胞が接着可能な表面を作製可能であり、ペプチド分子のみを用いて基板表面から細胞を完全に脱離させられる技術を確立した。一方で、より詳細にペプチドおよび基板表面の設計を行うことで、更に効率的な細胞脱離を実現できる可能性がある。そこで、次章以降においてペプチド配列、基板表面の形状について更に詳細に検討を行う。

## 参考文献

- [1] Widrig CA, Chung C, Porter MD. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1991;310:335-59.
- [2] Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM. A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir*. 2001;17:5605-20.
- [3] Roberts C, Chen CS, Mrksich M, Martichonok V, Ingber DE, Whitesides GM. Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)<sub>3</sub>OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120:6548-55.
- [4] Houseman BT, Mrksich M. The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion. *Biomaterials*. 2001;22:943-55.
- [5] Prime KL, Whitesides GM. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) - A model system using self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115:10714-21.

## 第3章

## 細胞非接着性ペプチドの設計

## 3.1 タンパク吸着と細胞接着

人工材料が細胞とタンパクを含む液体に接すると、まず液中のタンパクが表面に吸着し、これを介して細胞が接着する。つまり、細胞と培養基板との相互作用を制御するには、タンパク吸着の観点から材料を設計することが重要である。この細胞接着過程において、吸着タンパクと細胞の相互作用やその後の細胞内情報伝達については生物学的なプロセスであるが、初期の基板表面へのタンパク吸着については物理化学の領域である。そこで、コロイド化学における付着理論を適用し、タンパク質の初期吸着と表面自由エネルギーの関係が解析されている。Fig. 3.1 に血漿中に含まれるタンパクである $\gamma$ グロブリンの種々の表面上への吸着量と、水の接触角の相関を示す<sup>[1]</sup>。これより、親水性表面、もしくは疎水性表面においてタンパク吸着が抑制され、水に対する接触角が $70^\circ$  付近で最大値をとることが分かる。これは、コロイド化学における表面自由エネルギー変化から求められた実線で示される理論曲線とよく一致するものである。細胞は吸着タンパクを介して接着するため、これらの表面への細胞接着数を評価すると同じ傾向が示される(Fig. 3.2)。つまり、親水性の高い表面ほど接着細胞数が少ない傾向となり、水に対する接触角が $70^\circ$  付近で最大値をとる。

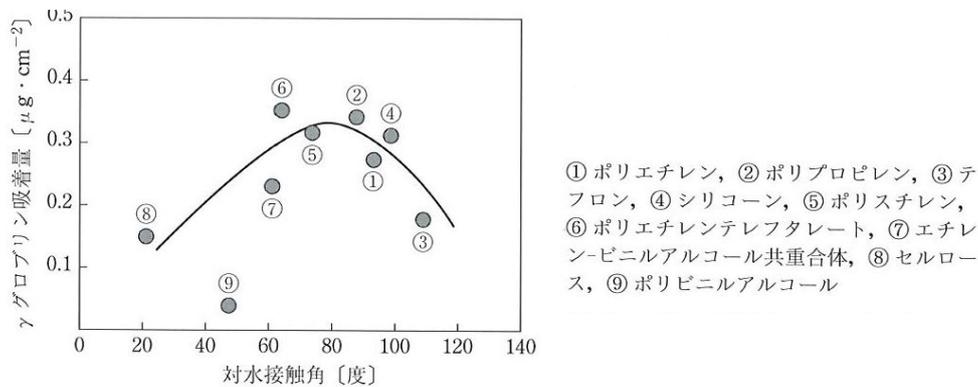
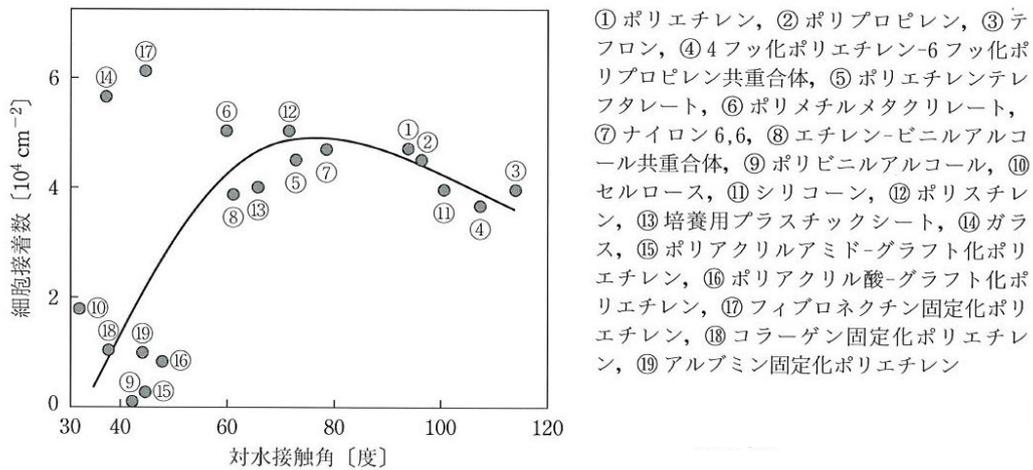


Fig. 3.1 種々の表面上への $\gamma$ グロブリンの吸着量<sup>[1]</sup>

Fig. 3.2 種々の表面上への初期細胞接着数<sup>[1]</sup>

一方、これらのグラフの中には、理論曲線からやや離れたものや極端に異なるプロットも存在する。このことは、接触角以外の複数の支配因子の存在を示唆しているが、高分子材料表面の分析手法が真空中や空気中で行われるのに対し、水中では表面状態が変化してしまうという問題があり、複数の因子を考慮した理論構築には至っていないのが現状である。これまでに、水環境により変化しない安定な表面が必要である。このような表面として、金薄膜上に形成させたアルカンチオール自己組織化単分子膜を用いた研究が数多くなされている。金属表面をチオール基 (-RSH) や、ジスルフィド基 (-RS-SR-) を有する有機分子の希薄溶液に浸漬すると、チオール基またはジスルフィド基が金属と強い相互作用をし、自発的に結合する。さらに、R の部分が長鎖のアルキル鎖であれば、表面に固定される際にアルキル鎖同士が、ファンデルワールス力によりタイトにパッキングし、金属表面上に分子が整列した自己組織化単分子膜が形成される。この自己組織化単分子膜は、多少の環境変化ではその特性が大きく変化することのない安定な表面を提供可能である。更に、チオール基やジスルフィド基とは逆のアルキル鎖末端に機能性官能基を有する分子を用いることで種々の機能を固体表面に導入でき、その表面特性を制御することができる。種々の官能基を有する自己組織化単分子膜表面へのタンパク吸着と水に対する接触角の相関を Fig. 3.3 に示す<sup>[2]</sup>。Fig. 3.3 より、タンパク吸着を抑制可能な表面の条件の一つとして、親水性の高い表面が挙げられる。また、親水性表面においても、片末端がカルボン酸である 11-メルカプトウンデカン酸や、アミノ基である 11-アミノウンデカンチオールを有するような、電荷を有する表面へのタンパク吸着は、水酸基のような、電荷を持たない官能基の表面と比較してより多くのタンパクが吸着することが知られている。Fig. 3.3 中で例外として、オリゴエチレングリコールを有する表面は接触角から予想されるより、更に低いタンパク吸着となっている。オリゴエチレングリコール(OEG)やポリエチレングリコール(PEG)は、運動性が高く、オ

リゴエチレングリコール鎖の立体斥力の寄与によりタンパク吸着が阻害される(Fig. 3.4)。つまり、タンパク吸着を抑制可能な表面は、①親水性が高く、かつ電荷をもたない表面、もしくは、②立体斥力のはたらく表面を作製することが必要である。立体斥力の

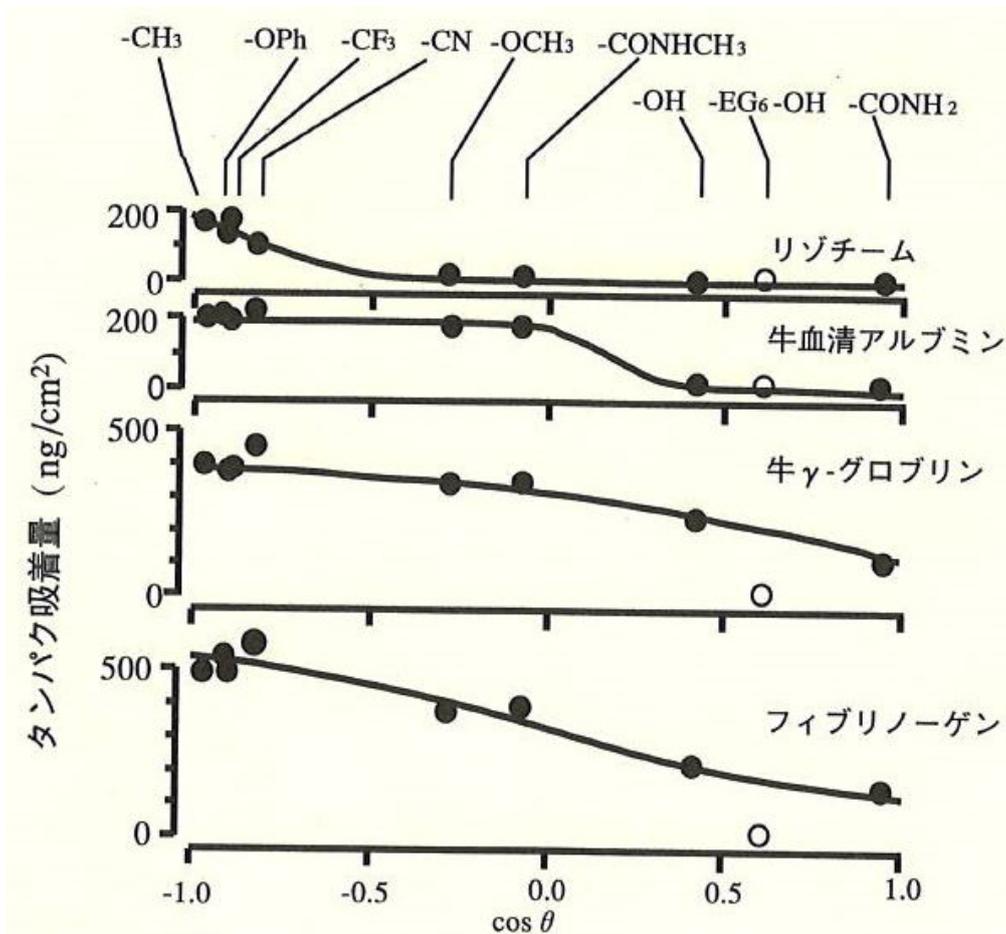


Fig. 3.3 種々の官能基を有する自己組織化単分子膜上へのタンパク吸着<sup>[2]</sup>

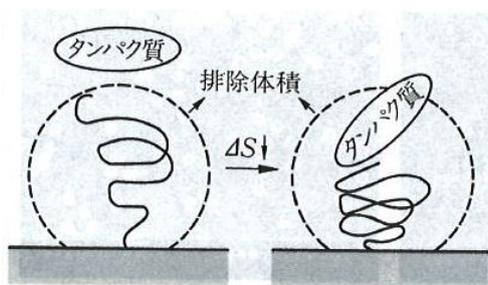


Fig. 3.4 オリゴエチレングリコールの立体排除効果<sup>[2]</sup>

はたらく表面として、上述のようにオリゴエチレングリコールを用いた手法が報告されている。Fig. 3.5は、オリゴエチレングリコールと細胞接着分子であるフィブロネクチンを表面にパターンすることで、細胞接着、非接着を制御した例である<sup>[3]</sup>。

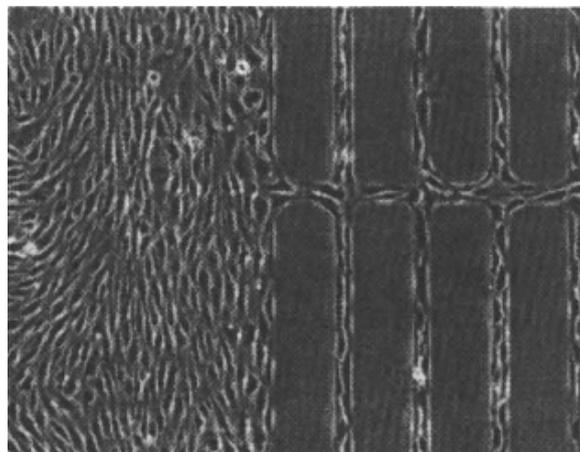


Fig. 3.5 オリゴエチレングリコールを用いた細胞接着制御<sup>[3]</sup>

また、親水性が高く、電荷を持たない表面として、両性イオン分子を用いる例が報告されている。両性イオン分子では、イオン溶媒和によって親水性となっている。近年、両性イオン分子であるポリカルボキシベタイン(pCB)へのタンパク質の吸着は、SPR測定で検出不可能な程に少ない ( $<0.3 \text{ ng/cm}^2$ )ことも報告されている<sup>[4]</sup>。この結果は多くのタンパク質を含んだ血漿や血清に対しても同様であった。こうした非特異吸着を極端に抑制する表面は、表面にナノメートルオーダーの両性イオン分子層を有することが必要である。また、正負のそれぞれの電荷を持つ分子であっても、それらを表面上に分子レベルで均等に配置し、見かけ上は表面の電荷がニュートラルになるような場合も、両性イオンと同様に、高い非特異吸着抑制効果を示すことが知られている<sup>[5]</sup>。したがって、正負の電荷を持ったアミノ酸を交互に配置し、表面の電荷を打ち消すような配列のオリゴペプチドを設計することでタンパク質の非特異吸着が抑制可能であると考えられる。

そこで本研究では、細胞非接着性オリゴペプチドを3つのセグメントに分けてデザインした。3つのセグメントは、金との結合に用いるアンカー、表面の影響を打ち消すためのリンカー配列、密な分子層を形成させるための両性イオン配列である。アンカーには、チオール基を有するアミノ酸であるシステイン (C) を用い、金-チオール結合により自発的に結合させるようにした。リンカー配列には、GGG、PPP、FFF などのように3つのアミノ酸を連続して配置し、表面の影響を打ち消しつつ密な分子層形成を阻害しない配列となるよう設計した。このオリゴペプチド設計で最も重要な点は、リジン (K, +電荷) およびグルタミン酸 (E, -電荷) の繰り返し配列 (KEKE, KEKEKE 等) を導入し、隣接する分子間で静電的な引力を生じさせ、金表面上で密な分子層を形成するよう設計したことである (Fig. 3.6)。これまでに、このようなプラスとマイナスに荷電した両性イオンオリゴペプチドが、アミノ酸配列のデザイン次第では、バルク液

中で自己組織化しナノファイバーを形成すること、さらにそれらが絡み合っただロゲルが得られることが報告されている<sup>6)</sup>。また、材料表面を別のタイプの両性イオンオリゴペプチドで覆うと、ニュートラルな電荷状態かつ親水性の表面が得られるために、ポリエチレングリコールのようなポリマー修飾表面と同等以上の非特異吸着抑制効果があることが報告されている<sup>6,7)</sup>。

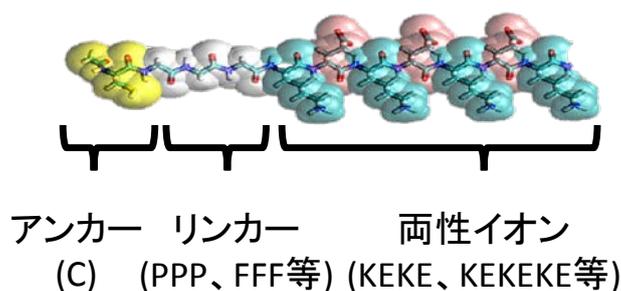


Fig. 3.6 細胞非接着性ペプチドの構成

### 3.2 水晶振動子マイクロバランス法

水晶振動子は、水晶の結晶を薄い板状に切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をしている。この水晶振動子の金属薄膜に交流電場を印加すると、ある一定の共振周波数で振動する性質を示す。金属薄膜上にナノグラム程度の物質が吸着すると、共振周波数が減少するため、微量天秤として利用することができる<sup>8)</sup>。このような方法を QCM 法と呼ぶ。Fig. 3.7 に、本実験で用いた QCM 電極を示す。

水晶振動子の両側の金属電極に交流電圧を印加すると、水晶振動子は圧電効果により共振振動を起こすので、このときの共振周波数変化を測定する。共振周波数は、水晶振動子表面で起こる物質の吸着や溶解に伴い変化するので、この変化を質量変化に換算することができる。微小質量変化  $\Delta m$  と共振周波数の微小変化  $\Delta f$  には、以下の Sauerbrey 式が成り立つ。

$$\Delta F = -\frac{2F_0^2}{\sqrt{\rho_Q \mu_Q}} \frac{\Delta m}{A}$$

$\Delta F$ : 周波数変化量

$\Delta m$ : 質量変化量

$F_0$ : 基本周波数

$\rho_Q$ : 水晶の密度

$\mu_Q$ : 水晶のせん断応力

A: 金電極面積

ここで、基本共振周波数 27 MHz の水晶振動子を使用した場合、今回の測定系では共振周波数変化 1 Hz の減少は質量変化 30 pg の増加に対応し、質量変化を検出可能である。



Fig. 3.7 本実験で用いた QCM センサー

上記 Sauerbrey の式によると、右項には水晶振動子の基本周波数  $F_0$  が入っている。つまり、水晶振動子の基本周波数を高くすればするほど、検出される振動数変化の値が大きくなり、質量検出感度が大きくなる。本実験に用いた QCM 装置では、27 MHz という高周波基本周波数の水晶振動子を用いているため、吸着による重量変化が小さいペプチド、タンパク質などの生体内の様々な分子の相互作用の様子を検出できる。

### 3.3 分子動力学計算によるバルク液中でのペプチド二次構造

#### 3.3.1 はじめに

上述した設計指針に基づき細胞非接着性ペプチドを設計するとしても、その組み合わせは膨大な数に及ぶためすべてを実験的に検証することはできない。そこで、Politecnico di Milano の Dr. Alfonso Gautieri 氏との共同研究により、分子動力学計算を用いてアンカーと細胞接着配列を固定し、リンカー、両性イオン配列を変化させて 80 種類の組み合わせについてバルク中でのペプチド二次構造シミュレーションを行った。

#### 3.3.2 実験手順

上述の指針によって設計した自己組織化ペプチドにおいて金表面上でタンパク吸着を抑制するには、ペプチド自身の二次構造が重要であることが報告されている。そこでまず、バルク液中での種々のペプチド二次構造について分子動力学計算を行った。シミュレーションは 300–500 K、11 レプリカについて、CHARMM 力場を用い、レプリカ交換分子動力学法によって行われた。それぞれのレプリカにつき 50 ns のシミュレーションが行われた<sup>[9-11]</sup>。

#### 3.3.3 結果・考察

バルク液中での二次構造のシミュレーションに用いたリンカー、両性イオンの組み合わせを Table 3.1 に示す。これらの組み合わせの中から、二次構造を形成する傾向の高い配列、低い配列を抽出した(Fig. 3. 8)。全体の傾向を以下に示す。

- ・両性イオン部分の繰り返し配列が長いほど、安定な $\alpha$ ヘリックス構造となる。
- ・リンカー部分がプロリン(P)が PPP、もしくは PPPP となる場合、両性イオン部分の繰り返し配列が短い場合にも、安定なポリプロリンII構造となる。
- ・リンカーがアラニン(A)A3 残基以上、もしくはフェニルアラニン(F)F3 残基以上の場合、リンカー部分を含んだ安定な $\alpha$ ヘリックス構造となる。

以上の傾向を踏まえ、二次構造を形成する傾向が高い配列として、CPPPKKEKEKEKEK、CFFFKEKEKEKEKEKEKEK、低い配列として CFFFKEKEK、CFKEKEKEK を抽出し、続いて実際に実験的に検証を行った。

Table 3.1 リンカー、両性イオンの組み合わせ

リンカー					両性イオン
G	A	P	F	S	KEK
GG	AA	PP	FF	SS	KEKEKEK
GGG	AAA	PPP	FFF	SSS	KEKEKEKEK
GGGG	AAAA	PPPP	FFFF	SSSS	KEKEKEKEKEKEK

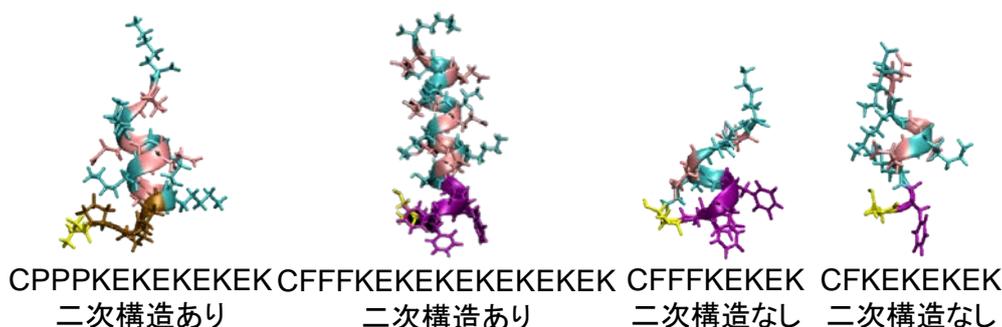


Fig. 3. 8 分子動力学計算によるペプチド二次構造

### 3.4 実験

#### 3.4.1 試薬・装置

以下に、実験に用いた試薬および装置を示す。特に記述のないものは、全て市販品を使用した。試薬の調製には、MilliQ 水を用いた。

##### 【試薬】

- ・オリゴペプチド

CPPPKKEKEKEKEK, 株式会社スクラム

CFFFKEKEKEKEKEKEKEK, 株式会社スクラム

CFKEKEKEK, 株式会社スクラム

CFFFKEKEK, 株式会社スクラム

- ・カバーガラス, 松浪硝子工業株式会社
- ・MEM  $\alpha$ , D5796, gibco
- ・ヒト線維芽細胞
- ・Fibronectin, from bovine plasma, F4759, Sigma
- ・Fibrinogen, F0129, Sigma

#### 【装置】

- ・J-820 型円二色分散計, 日本分光株式会社
- ・AFFINIX QN, initium
- ・スパッタリングデポジション装置 CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ・デジタルマイクロスコープ VHX-200, キーエンス
- ・位相差顕微鏡: IX-71, Olympus

### 3.4.2 溶液中でのペプチド二次構造

実験手順

#### ペプチド溶液の調製

それぞれのオリゴペプチドを 10 mM 塩化カリウム、50 mM 硫酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)に 0.1 mg/ml の濃度で溶解した。

#### CD スペクトル測定

光路長 1 mm のキュベットにそれぞれの 400  $\mu$ l オリゴペプチド溶液を導入し、CD スペクトル測定を行った。測定波長範囲は 190 nm~270 nm である。

### 3.4.3 金表面上へのペプチド吸着量

実験手順

#### 電極表面の洗浄

1%SDS 溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、濃硫酸：過酸化水素水=3：1 の Piranha 溶液を滴下し、室温で 5 分間放置後、純水で洗浄した。

#### 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が  $\pm 3$  Hz/min 程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

#### オリゴペプチドの修飾

電極表面に 50  $\mu$ M オリゴペプチド溶液をそれぞれ滴下し、4°Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

#### オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

#### タンパク質の吸着

オリゴペプチド修飾電極に 1 mg/ml フィブリンノーゲン、溶液をそれぞれ滴下し、室温で 30 分間放置した。

#### タンパク質吸着電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

### 3.4.4 ペプチド修飾表面への水の接触角

実験手順

#### 基板洗浄

カバーガラスを 25 %アンモニア水 : 30 %過酸化水素水 : 純水 = 1 : 1 : 4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

#### Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。Cr は Au の密着層である。その後引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

#### 電極表面の洗浄

濃硫酸 : 過酸化水素水 = 3 : 1 の Piranha 溶液を滴下し、室温で 5 分間放置後、純水で洗浄した。

#### オリゴペプチドの修飾

電極表面に 50  $\mu$ M オリゴペプチド溶液をそれぞれ滴下し、4°Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

#### 接触角測定

オリゴペプチド修飾表面へ 10  $\mu$ l の純水を滴下し、デジタルマイクロスコープを用いて接触角を測定した。

### 3.4.5 ペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着量

実験手順

#### 電極表面の洗浄

1 %SDS 溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、濃硫酸 : 過酸化水素水 = 3 : 1 の Piranha 溶液を滴下し、室温で 5 分間放置後、純水で洗浄した。

#### 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が  $\pm 3$  Hz/min 程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

オリゴペプチドの修飾

電極表面に 50  $\mu$ M オリゴペプチド溶液をそれぞれ滴下し、4°Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

タンパク質の吸着

オリゴペプチド修飾電極に 1 mg/ml フィブリノーゲンを滴下し、室温で 30 分間放置した。

タンパク質吸着電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

**3.4.6 細胞パターンニング**

実験手順

[PDMS スタンプの作製]

SU-8 の塗布

SU-8 25 を 500 rpm (5s)  $\rightarrow$  2000 rpm (10s)にて基板洗浄したガラス基板上にスピニングした。

プリベーク

スピニング後のガラス基板上に SU-8 25 を更に 4 g 滴下し、65°C のホットプレートで 10 分間ベーク後、95°C のホットプレートで 8 時間ベークした。

SU-8 の露光

マスクアライナを用いて、フォトマスクの情報から SU-8 を露光した。露光時間は、480 秒とした。

ポストベーク

露光した SU-8 を 65°C のホットプレートで 5 分間ベーク後、95°C のホットプレートで 15 分間ベークした。

SU-8 の現像

SU-8 を専用現像液に約 10 分間浸漬、攪拌して現像した。現像後、新たな現像液でリンスして窒素ガスで乾燥させた。更に、2-プロパノールで基板表面の汚れを充分洗い流し、窒素ガスで乾燥させた。この段階で、SU-8 のテンプレートが完成した。

PDMS の調整と塗布

PDMS 前駆体と硬化剤を 10 : 1 の質量比で混合したものを、SU-8 テンプレート上に均一に塗布した。その後、簡易真空ポンプで気泡を除去し、80°C のオーブン内に 30 分間放置し硬化させた。硬化した PDMS を SU-8 テンプレートから剥がしとり、PDMS スタンプが完成した。

[金表面パターンニング修飾]

#### Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、総研化学株式会社より提供していただいたマイクロピラー、もしくはナノピラー構造を表面にもつ光硬化性樹脂シートに、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。その後引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

#### フィブロネクチンコート

フィブロネクチン溶液をスライドガラス上に少量滴下し、別のスライドガラスを上を被せることで溶液を均一に広げた。PDMS スタンプを溶液に接触させ、これを基板に密着させた。1 時間放置したあと、基板を PBS で 2 回洗浄し、乾燥させた。

#### ペプチド修飾

50  $\mu\text{M}$  ペプチド溶液に金基板を浸漬させ、一晩放置した後、純水で洗浄した。

#### 基板の滅菌

表面をパターンニング修飾した金基板をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順に洗浄して滅菌し、滅菌済みディッシュに入れた。

#### 細胞の播種

ヒト線維芽細胞を 10%FBS、1%penicilline/streptomycin 添加培地に  $5 \times 10^5$  cells/dish の密度で播種した。

#### 培地交換

播種した細胞をインキュベータ内で 37°C、5%CO<sub>2</sub>-Air のもとで 24 時間培養した後、新しいディッシュに移し替えた。

### 3.5 結果・考察

#### 3.5.1 溶液中でのペプチド二次構造

分子動力学計算により、バルク液中でのペプチド二次構造を推定し、これに基づき 4 種類のペプチドを抽出した。本節では、溶液中での二次構造を実験的に確認するため、円偏光二色性(CD)スペクトル測定を行った。

それぞれのオリゴペプチドの CD スペクトルを Fig. 3.9 に示す。CD とは、キラルな物資が円偏光を吸収する際、左円偏光、右円偏光に対し吸光度に差が生じる現象である。CD スペクトルでは、円偏光の波長に対し、円偏光二色性の大きさをプロットしたものである。タンパク質やペプチドの  $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ 構造、不規則構造のそれぞれで紫外領域でのスペクトルパターンが異なるため、二次構造を推定することが可能である。オリゴペプチド CPPPKEKEKEKEK においては、200 nm 付近に大きな負の極大、また、225 nm 付近に小さな正の極大が観察された。これは、プロリン由来のポリプロリンヘリックスによるものであり、二次構造を形成していることが示された。これは、溶液中でのペプチド二次構造のシミュレーション結果と一致するものである。一方、その他の

三種類のペプチドについては、210 nm 付近の楕円率が低く、また 195 nm 付近に負の極大がみられることから、二次構造を形成していないことが示された<sup>[12]</sup>。直接の関連は検討する必要があるが、二次構造を有する CPPPKKEKEKEKEK を用いた場合、後に示すタンパク質の吸着が抑制される傾向がみられた。

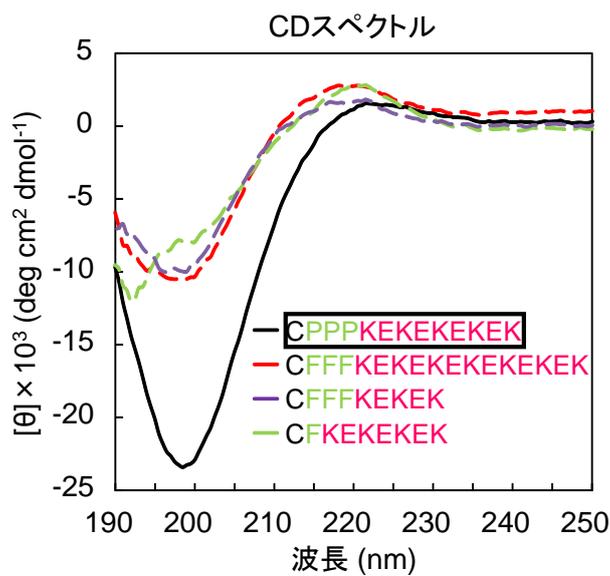


Fig. 3.9 オリゴペプチドの吸着量

### 3.5.2 金表面上へのペプチド吸着量

前節までの検討により、溶液中で凝集せず、また二次構造の有無の観点から、4種類のペプチド配列を見出した。本節では、QCMを用いてそれぞれのオリゴペプチドの金表面への吸着量を検討した。

Fig. 3.10 に示すように、いずれのオリゴペプチドを修飾した表面においても、ペプチド吸着量に大きな差はみられなかった。それぞれのオリゴペプチドが四角配置で金表面上に配置していると仮定し、分子間距離を求めると約 1.2 ~ 1.4 nm となる。同様の仮定で計算したアルカンチオール自己組織化単分子膜の分子間距離が約 0.6 nm であること<sup>[13]</sup>、また、PEG 密度とタンパク質非特異吸着の相関によれば、PEG 鎖密度 0.4 nm/nm<sup>2</sup>、つまり分子間距離が約 0.6 nm 程度がしきい値となりアルブミン非特異吸着が抑制されることが報告されている<sup>[14]</sup>。アミノ酸のサイズを考慮すると、いずれのペプチドも金表面上で密な層を形成していると判断でき、タンパク質の非特異吸着抑制に有用であることが示唆された。

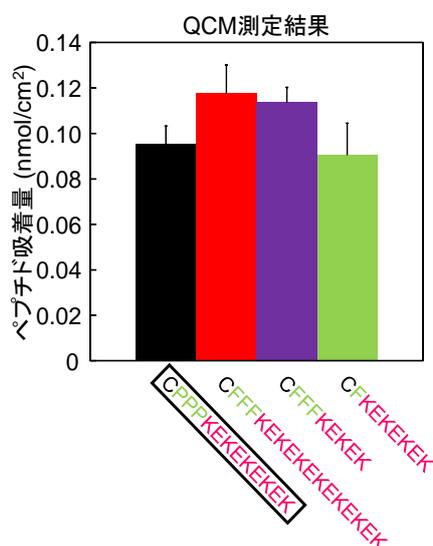


Fig. 3. 10 金表面上へのペプチド吸着量

### 3. 5. 3 ペプチド修飾表面への水の接触角

これまでの検討により、選択したペプチドが金表面上に密な層を形成することが示された。本節では、ペプチド修飾による濡れ性の変化を測定するため、ペプチド修飾表面の水の接触角測定を行った。

接触角測定の結果、ペプチド修飾により、ペプチド修飾前と比べて金表面が親水性となることが示された (Fig. 3. 11)。特に、CPPPKKEKEKEKEKEK、CFFFKKEKEKEKEKEKEK と、KE の繰り返し配列が長いペプチドを修飾した表面程、親水性の強い表面となった。K や E は、極性が高く、タンパク質中においても表面に局在している割合が高い。また、両性イオン部分において水和層が形成され、極端に親水性の高い表面が形成されたと考えられる<sup>[15]</sup>。水の接触角とタンパク吸着の関連として、末端に種々の官能基を有するアルカンチオール SAM を用いた検討がなされている。親水性の高い SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OH、疎水性の高い SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub> を混合して修飾した表面では、SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OH の混合割合が高い程親水性の高い表面が形成され、100% SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OH の表面では水の接触角が約 20° と、極端に親水性となる。このような表面ではタンパク質の非特異吸着が疎水性の高い表面と比較して抑制されることが示されている<sup>[16]</sup>。したがって、今回用いたペプチドについてもタンパク吸着が抑制されることが期待できるため、次節において実際に測定をおこなった。

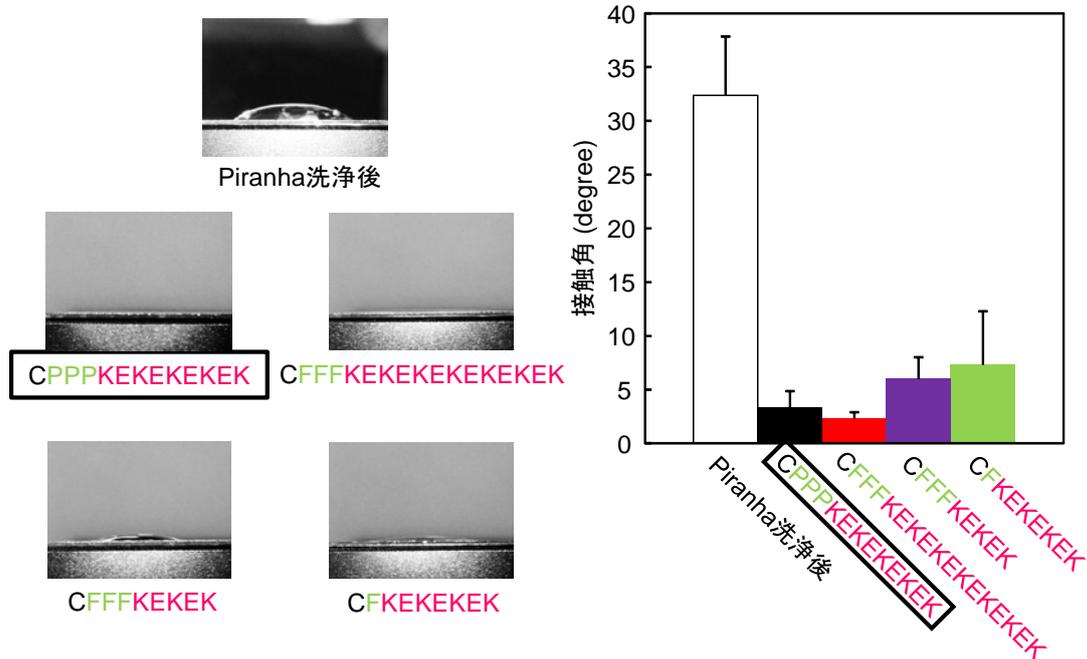


Fig. 3.11 金表面上への水の接触角

### 3.5.4 ペプチド修飾表面へのタンパク質の非特異吸着量

ペプチド修飾により密な分子層が形成され、親水性の高い表面が形成された。続いて実際に、この表面へのタンパク質の非特異吸着抑制能について評価するため、QCMによりフィブリノーゲン吸着量を測定した。

Fig. 3.12 に示すように、いずれのオリゴペプチドを修飾した表面でも、未修飾表面と比較してタンパク質の吸着は抑制された。しかし、減少割合には大きな差があり、CPPPKEKEKEKEK を修飾した表面では、フィブリノーゲン吸着量が未修飾表面と比較して 93%減少し、吸着量は  $39 \pm 30 \text{ ng/cm}^2$  であった。前章で設計した細胞非接着性オリゴペプチド修飾表面へのフィブリノーゲン吸着量が  $38 \pm 18 \text{ ng/cm}^2$  であったこと、また PEG を修飾した表面へのフィブリノーゲン吸着は、未修飾表面と比較して 96 ~ 98%抑制されること<sup>[17]</sup>を考慮すると、タンパク質の非特異吸着抑制層が形成されたと考えられる。また、フィブリノーゲンは代表的な細胞接着性糖タンパクであるフィブロネクチンと構造的に似ており、培養表面に素早く吸着する<sup>[18]</sup>。したがって、フィブリノーゲンの吸着を抑制できる表面は、細胞接着抑制や、細胞のパターニングに有用であるといえる。

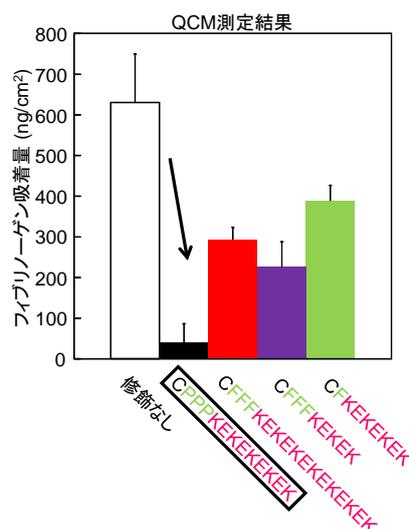


Fig. 3. 12 タンパク質の非特異吸着抑制能

### 3. 5. 5 細胞パターンニング

これまでの検討により、CPPPKKEKEKEKEKの修飾により、金表面が極端に親水性となること、また、フィブリンノーゲンの吸着が抑制されることが示された。本節では、金表面上に細胞非接着領域としてそれぞれのペプチド、細胞接着領域としてフィブロネクチンをパターンニングすることで、実際に細胞接着を制御可能であるか評価した。

細胞パターンニングの手法として、紫外光の照射によるもの<sup>[19]</sup>、インクジェットを用いて直接細胞をパターンニングする手法<sup>[20]</sup>などが報告されており、複数種の細胞のパターンニングや、表面の細胞接着性を制御可能である。本実験では、マイクロコンタクトプリンティング技術によりフィブロネクチン、ペプチドのパターンニングを行った。マイクロコンタクトプリンティング技術ではまず、ミリ～ナノオーダーの形状を持つスタンプを作成する。このスタンプの凸部分に分子を塗布し、これを基板に密着させることでパターンニングを行う手法である<sup>[21]</sup>。1枚の基板にパターンニング可能な細胞の種類は限られる一方、スタンプのみによって簡便かつ高精度にパターンニングが可能である。本実験では、幅 500  $\mu\text{m}$ 、間隔 500  $\mu\text{m}$  のライン状のフィブロネクチンパターンを形成し、その後金基板をペプチド溶液に浸漬することでペプチドとフィブロネクチンのパターンを形成した。

このような基板にヒト繊維芽細胞を播種し、観察を行った。その結果、培養3時間後には、CFKEKEKEK修飾基板以外の三種類のペプチドを修飾した基板では、フィブロネクチンを修飾した領域にのみ細胞が接着し、細胞パターンが観察された。更に培養を続けたところ、細胞はフィブロネクチン領域内でのみ増殖し、パターン形状は3日間維持された。しかし、培養6日目にはCFFFKEKEKEK修飾基板では、細胞非接着領域に

も細胞が増殖し、細胞パターンは観察されなかった (Fig. 3. 13)。一方、CPPPKEKEKEKEK、および CFFFKEKEKEKEKEKEKEK を修飾した基板では 6 日間培養後にも細胞接着領域にのみ細胞が接着し、細胞パターンが観察された。チオール基を介して金ナノ粒子に接着させた 4 回の K および E の繰り返し配列を有するペプチドが、タンパク質溶液中、また無希釈血清中で少なくとも 24 時間安定であることが報告されている<sup>[22]</sup>。今回使用した 10% の血清を含む培養培地中においても、4 回以上の KE の繰り返し配列を有するペプチドは細胞パターンの長期維持が可能であり、安定であるといえる。また、Fig. 3. 13 下に示すように、これら二種類のペプチドでは、金表面に結合した後配向性を有するペプチド層を形成する傾向が分子動力学計算により示されている。つまり、ペプチドが配向性をもつことで細胞パターンの形成や維持に効果が得られることが示唆された。

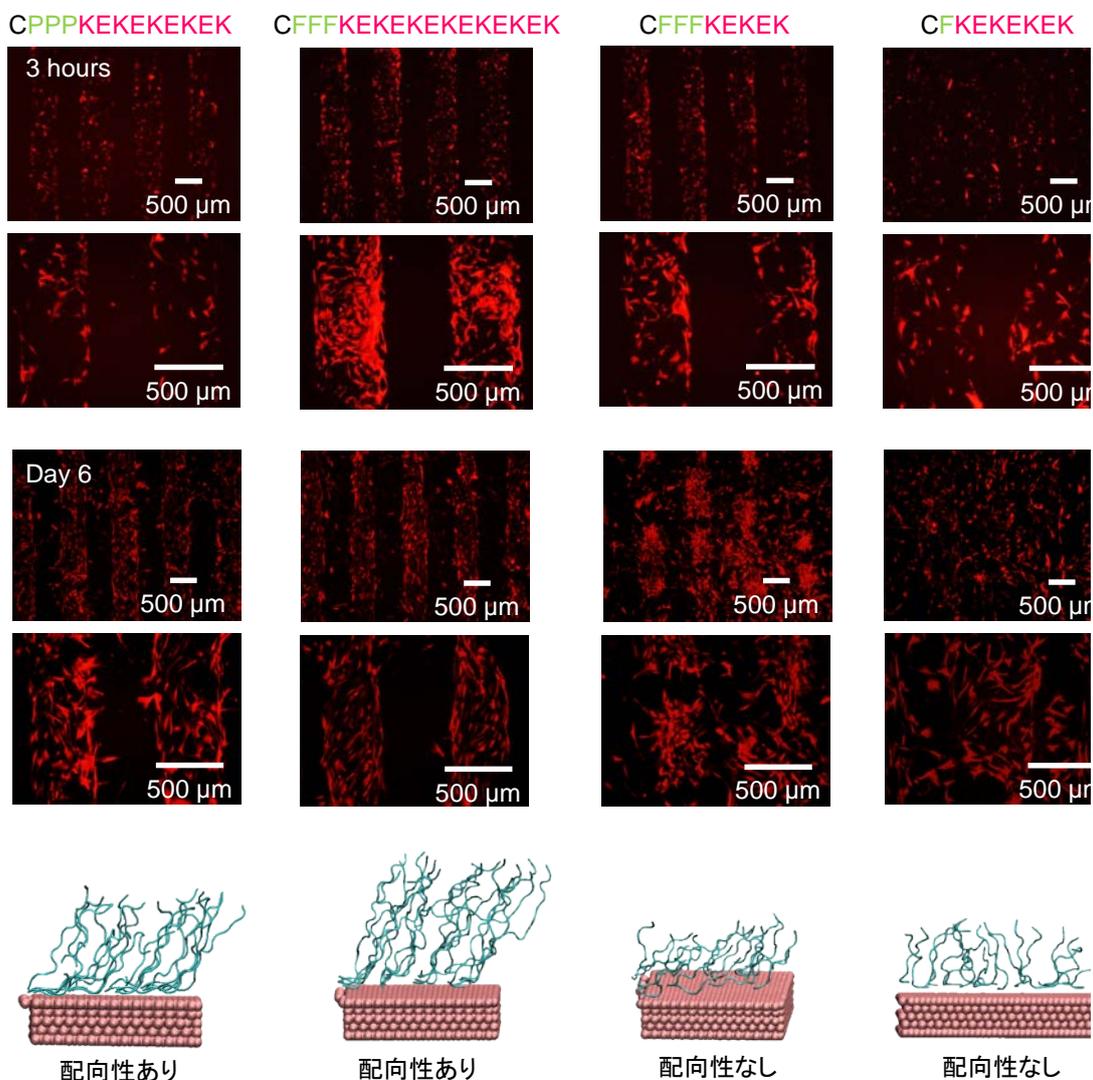


Fig. 3. 13 細胞パターンニング (上) ペプチド層の配向性 (下)

### 3.6 本章のまとめ

本章では、電気化学的細胞脱離に必要な細胞非接着性ペプチドの設計を行った。まず、分子動力学計算により、バルク液中では凝集せず、金表面に結合して分子層を形成するペプチド配列を抽出した。4種類のペプチドについて溶液中での二次構造、金表面への吸着量、タンパク質の非特異吸着抑制能、細胞パターンニングについて評価を行い、タンパク質の非特異吸着、細胞接着を抑制するペプチド配列として、CPPPKKEKEKEKEKを見出した。

## 参考文献

- [1] 田畑康彦 編著、再生医療のためのバイオマテリアル、コロナ社 (2006)
- [2] 岩田博夫、バイオマテリアル、共立出版 (2005)
- [3] Mrksich M, Whitesides GM. Using self-assembled monolayers that present oligo(ethylene glycol) groups to control the interactions of proteins with surfaces. *Poly(Ethylene Glycol): Chemistry and Biological Applications*. 1997;680:361-73.
- [4] Zhang Z, Chao T, Chen SF, Jiang SY. Superlow fouling sulfobetaine and carboxybetaine polymers on glass slides. *Langmuir*. 2006;22:10072-7.
- [5] Chen SF, Cao ZQ, Jiang SY. Ultra-low fouling peptide surfaces derived from natural amino acids. *Biomaterials*. 2009;30:5892-6.
- [6] Zhang SG. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology*. 2003;21:1171-8.
- [7] Nowinski AK, Sun F, White AD, Keefe AJ, Jiang SY. Sequence, Structure, and Function of Peptide Self-Assembled Monolayers. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134:6000-5.
- [8] QCM 法の原理、株式会社イニシウム <http://www.initium2000.com/about/>
- [9] MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B*. 1998;102:3586-616.
- [10] Nelson MT, Humphrey W, Gurov A, Dalke A, Kale LV, Skeel RD, et al. NAMD: A parallel, object oriented molecular dynamics program. *International Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing*. 1996;10:251-68.
- [11] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. 1996;14:33-8.
- [12] Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*. 2006;1:2876-90.
- [13] Widrig CA, Chung C, Porter MD. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1991;310:335-59.
- [14] Uchida K, Hoshino Y, Tamura A, Yoshimoto K, Kojima S, Yamashita K, et al. Creation of a mixed poly(ethylene glycol) tethered-chain surface for preventing the nonspecific adsorption of proteins and peptides. *Biointerphases*. 2007;2:126-30.
- [15] White AD, Nowinski AK, Huang WJ, Keefe AJ, Sun F, Jiang SY. Decoding nonspecific interactions from nature. *Chemical Science*. 2012;3:3488-94.
- [16] Rodrigues SN, Goncalves IC, Martins MCL, Barbosa MA, Ratner BD. Fibrinogen

adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 2006;27:5357-67.

[17] Huang NP, Michel R, Voros J, Textor M, Hofer R, Rossi A, et al. Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Surface-analytical characterization and resistance to serum and fibrinogen adsorption. *Langmuir*. 2001;17:489-98.

[18] Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM. A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir*. 2001;17:5605-20.

[19] Efremov AN, Stanganello E, Welle A, Scholpp S, Levkin PA. Micropatterned superhydrophobic structures for the simultaneous culture of multiple cell types and the study of cell-cell communication. *Biomaterials*. 2013;34:1757-63.

[20] Mironov V, Prestwich G, Forgacs G. Bioprinting living structures. *Journal of Materials Chemistry*. 2007;17:2054-60.

[21] Mrksich M, Whitesides GM. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1996;25:55-78.

[22] Nowinski AK, White AD, Keefe AJ, Jiang SY. Biologically Inspired Stealth Peptide-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2014;30:1864-70.

## 第4章

### 細胞接着性ペプチドを用いた電気化学的細胞脱離

#### 4.1 はじめに

本章では、細胞非接着性ペプチド CPPPKEKEKEKEK の末端に細胞接着配列を付与した細胞接着性ペプチド CPPPKEKEKEKEKGRGDSP の評価を行う。細胞接着配列の付与によるペプチド吸着密度の変化、また電気化学的細胞脱離の評価を行う。更に、表面の化学修飾に加え、物理的な凹凸構造を加えることで、電極周囲へのイオン流入を促進させ、より迅速な細胞脱離が可能であることを示す。

#### 4.2 自己組織化単分子膜

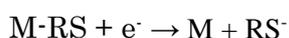
自己組織化法は、固体表面に種々の分子を配向、集積させる方法の1つであり簡単に高密度かつ高配向な自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer: SAM)を構築することができ、活発に研究、応用がなされている。自己組織化単分子膜の形成には特殊な装置を必要とせず、チオール分子の溶液中に基板を浸漬するだけで容易に形成できる。

基板として最もよく用いられている Au(111)面に吸着したアルカンチオール分子は、金原子の間に規則的に硫黄原子が並んだ( $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ )R30°構造をとり、アルキル鎖は金表面に対して垂直方向から約 30°傾いて密に配列している<sup>[1]</sup>。

自己組織化単分子膜は、種々の浸漬条件 (溶媒・濃度・温度・浸漬時間)によって構造、配向を制御することも可能である。基板としては金を用いるのが代表的であるが、他にも銀、銅、白金、ITO などの酸化物、化合物半導体などでも自己組織化単分子膜が形成されることが報告されている。

金属表面をチオール基 (-RSH)や、ジスルフィド基 (-RS-SR-)を有する有機分子の希薄溶液に浸漬すると、チオール基またはジスルフィド基が金属と強い相互作用をし、表面に有機分子が固定される。さらに、R の部分が長鎖のアルキル鎖であれば、表面に固定される際にアルキル鎖同士が、ファンデルワールス力によりタイトにパッキングし、金属表面上に分子が整列した単分子膜が形成される。この自己組織化単分子膜は、多少の環境変化ではその特性が大きく変化することのない安定な表面を提供することができる。更に、チオール基やジスルフィド基とは反対側のアルキル鎖末端に機能性官能基を有する分子を用いることで種々の機能を固体表面に導入でき、その表面特性を制御することが可能である。

アルカンチオールなどの自己組織化単分子膜で被覆された金属電極をアルカリ性水溶液に浸漬し、負の電位を掃引すると、



の還元反応が進行し、吸着していたチオール分子が還元されると共に脱離することが知られている。この反応量は、サイクリックボルタンメトリーにより還元電流を観測することで間接的に定量できる。

### 4.3 電気化学的細胞脱離の原理

培養表面から確実に細胞を脱離させるため、設計した細胞接着性オリゴペプチドをスペーサーとして基板と細胞間に導入した。このペプチドでは、片末端にチオール基を有するアミノ酸であるシステインを配置し、金基板との化学結合に用いた。また、リンカーとして3つのプロリン、ペプチドを表面で密に自己組織化させるため、プラスの電荷をもつリジン、マイナスの電荷を持つグルタミン酸を交互に配置した。更に、細胞接着のため、システインとの逆末端には細胞接着配列である RGD を配置した。この細胞接着性オリゴペプチドを修飾した表面に細胞を播種すると、細胞は RGD を認識してペプチドに接着し、その後、負電位を印加することでペプチドの還元脱離に伴って細胞を金表面から完全に脱離させることが可能であると考えた。Fig. 4.1 にその様子を示した。

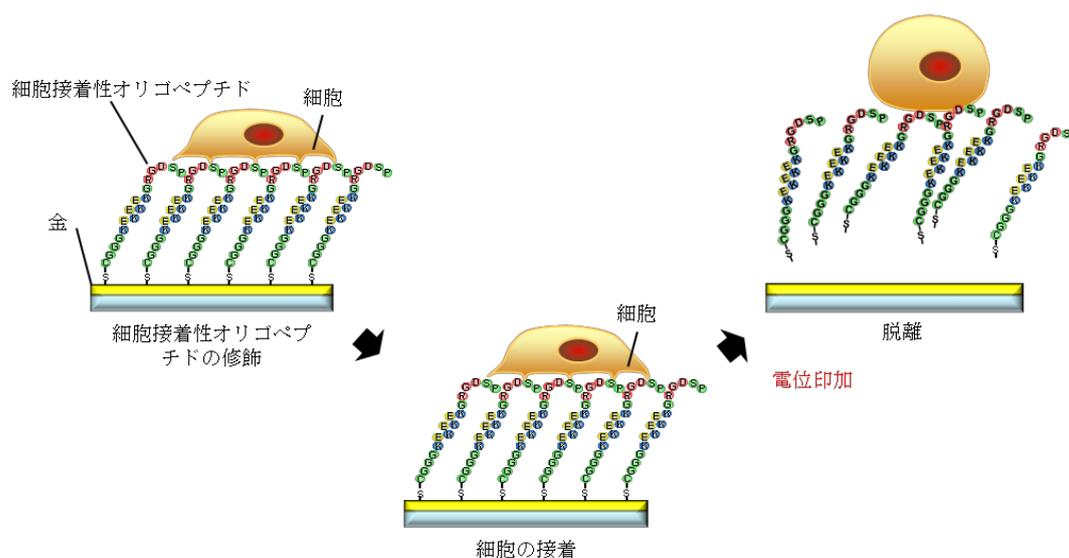


Fig. 4.1 電気化学的細胞脱離の原理

## 4.4 実験

### 4.4.1 試薬・装置

以下に、実験に用いた試薬および装置を示す。特に記述のないものは、全て市販品を使用した。試薬の調製には、MilliQ 水を用いた。

#### 【試薬】

- ・オリゴペプチド  
CPPPKEKEKEKEK, 株式会社スクラム  
CPPPKEKEKEKEKGRGDSP, 株式会社スクラム
- ・MEM- $\alpha$  : gibco, 12561
- ・ヒト線維芽細胞
- ・カバーガラス
- ・マイクロピラー基板

#### 【装置】

- ・AFFINIX QN, initium
- ・電気化学測定装置 : AUTOLAB EN 55022, Eco Chemie
- ・Ag/AgCl 参照電極: #2080A, HORIBA.
- ・金電極: AUE 金電極, BAS
- ・スパッタデポジション装置: CFS-4ES-231, Shibaura Eletec
- ・ポテンショスタット/ガルバノスタット: HA-151, Hokuto denko
- ・位相差顕微鏡 : IX-71, Olympus
- ・走査型電子顕微鏡: Miniscope, 日立ハイテク

### 4.4.2 細胞接着性ペプチドの金表面上への吸着量

#### 実験手順

##### 電極表面の洗浄

1%SDS 溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、濃硫酸：過酸化水素水=3：1 の Piranha 溶液を滴下し、室温で 5 分間放置後、純水で洗浄した。

##### 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が  $\pm 3$  Hz/min 程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

##### オリゴペプチドの修飾

電極表面に 50  $\mu$ M オリゴペプチド溶液をそれぞれ滴下し、4°Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

**4. 4. 3 細胞接着性ペプチドの還元脱離電位の測定****実験手順**金電極の研磨

電極表面を水で洗い、水分を拭き取り、研磨用ダイヤモンドで研磨した。その後、アルミナ研磨パットにより表面が鏡面になるまで充分研磨した。電極表面を蒸留水で洗浄し、乾燥させた。

細胞接着性ペプチドの修飾

金電極を 50  $\mu\text{M}$  細胞接着性ペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

サイクリックボルタンメトリー

細胞接着性オリゴペプチド修飾金電極を作用極、市販の Ag/AgCl 電極を参照極、白金線を対極とし、これらを AUTOLAB に接続した。あらかじめ 20 分間窒素ガスをバブリングした 0.5 M KOH の電解液中で作用極に電位を掃引した。掃引条件は、電位のスイープ範囲 0 ~ -1.0 V (vs. Ag/AgCl)、掃引速度を 20 mV/s とした。

**4. 4. 4 細胞接着性ペプチド修飾表面への細胞接着・電気化学的細胞脱離****実験手順**基板洗浄

カバーガラスを 25 %アンモニア水 : 30 %過酸化水素水 : 純水 = 1 : 1 : 4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。Cr は Au の密着層である。その後引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

細胞接着性オリゴペプチドの修飾

金基板を 50  $\mu\text{M}$  細胞接着性オリゴペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

基板の滅菌

細胞接着性オリゴペプチドを修飾した金基板をクリーンベンチ内で 70%エタノール→滅菌水の順に洗浄して滅菌し、 $\phi$  35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

細胞の播種

ヒト線維芽細胞を 10%FBS 添加培地に  $0.5 \times 10^5$  cells/ml の密度で懸濁し、1 ディッシ

μあたり 2 ml 量、つまり  $1.0 \times 10^5$  cells/ml の密度で細胞を播種した。

#### 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内(37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Air)のもとで 24 時間培養した。

#### 電位の印加

細胞培養基板のパッドとなる部分の細胞および水滴を綿棒で除去し、これを作用極、市販の Ag/AgCl 電極を参照極、白金板を対極とし、三電極系を形成した。これらをポテンシオスタットに接続し、PBS 中で定電位 -1.0 V を一定時間印加した。

#### 細胞数のカウント

電位印加後、基板を別のディッシュに移し、位相差顕微鏡画像を CCD カメラによって撮影した。撮影箇所は基板の中央付近を 3 箇所とした。撮影後、残存細胞数をカウントした。

### 4. 4. 5 マイクロ凹凸構造の電気化学的細胞脱離への応用

#### 4. 4. 5. 1 ナノインプリンティング技術

ナノインプリンティング技術とは、表面にマイクロ・ナノオーダーの凹凸形状をもつ金属モールドを樹脂などに押し付け、形状を転写する微細加工技術である(Fig. 4. 2)<sup>[3]</sup>。既存のリソグラフィ技術と比較し、低コストかつプロセス数も少なく、簡便な装置でマイクロ・ナノオーダーのパターンを基板上に作製可能な技術として、半導体などの電子デバイス、光デバイス、化学・バイオデバイス、MEMS などへの応用が検討されている。今回実験に用いた基板は、ニッケルモールドを用い、スチレン樹脂にマイクロピラーを作製した基板である。

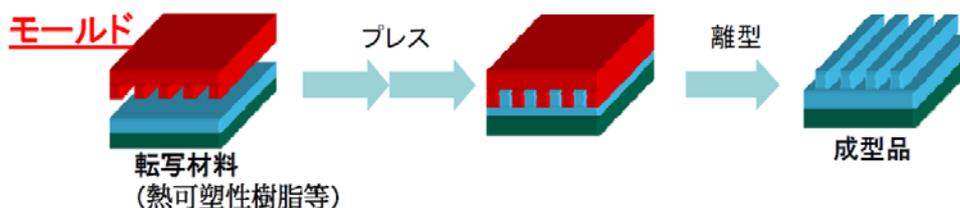


Fig. 4. 2 ナノインプリンティング技術<sup>[3]</sup>

#### 4. 4. 5. 2 マイクロピラー基板上での電気化学的細胞脱離

##### 実験手順

##### Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、総研化学株式会社より提供していただいたマイクロピラー、もしくはナノピラー構造を表面にもつ光硬化性樹脂シートに、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。その後引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

### SEM 観察

スパッタ後の基板を SEM により観察し、形状の崩れなどがいないか確認した。

### 細胞接着性オリゴペプチドの修飾

金基板を 50  $\mu\text{M}$  の細胞接着性オリゴペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

### 基板の固定

ペプチドを修飾した金基板を、5°C 以上で自己吸着能を示すゴムシートによって  $\phi$  60 mm の滅菌済ディッシュに固定した。

### 基板の滅菌

金基板をクリーンベンチ内で 70%エタノール→滅菌水の順に洗浄して滅菌した。

### 細胞の播種

ヒト線維芽細胞を 10%FBS 添加培地に  $0.5 \times 10^5$  cells/ml の密度で懸濁し、1 ディッシュあたり 2 ml 量、つまり  $1.0 \times 10^5$  cells/ml の密度で細胞を播種した。

### 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内(37°C, 5%  $\text{CO}_2$ -Air)のもとで 24 時間培養した。

### 電位の印加

細胞培養基板のパッドとなる部分の細胞および水滴を綿棒で除去し、これを作用極、市販の Ag/AgCl 電極を参照極、白金板を対極とし、三電極系を形成した。これらをポテンシostatに接続し、PBS 中で定電位-1.0 V を一定時間印加した。

### 細胞数のカウント

電位印加後、基板を別のディッシュに移し、位相差顕微鏡画像を CCD カメラによって撮影した。撮影箇所は基板の任意の位置を 5 箇所とした。撮影後、残存細胞数をカウントした。

#### 4.4.5.3 マイクロピラー基板上での細胞シートのコラーゲンゲルへの転写

##### 実験手順

##### Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、総研化学株式会社より提供していただいたマイクロピラー、構造を表面にもつ光硬化性樹脂シートに、出力 100 W、アルゴン雰囲気 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。その後引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

##### 細胞接着性オリゴペプチドの修飾

基板を 50  $\mu\text{M}$  の細胞接着性オリゴペプチド(CPPPKEKEKEKEKGRGDSP)溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

##### 基板の滅菌

基板をクリーンベンチ内で 70%エタノール→滅菌水の順に洗浄して滅菌した。

##### 細胞の播種

ヒト線維芽細胞を 10%FBS 添加培地に  $5.0 \times 10^5$  cells/ml の密度で懸濁し、1 ディッシュあたり 2 ml 量、つまり  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の密度で細胞を播種した。

#### 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内(37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Air)のもとで培養した。

#### コラーゲングルの作製

3 日間培養後、基板周囲の培養液をキムワイプで拭き取り、この上に PDMS で作製した枠を取り付けた。枠内にコラーゲン溶液を導入し、30 分間インキュベータ(37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Air)内でゲル化させた。

#### 細胞シートの転写

枠が外れないよう、クリップで固定した後、銀-塩化銀電極を参照極、白金板を対極、マイクロピラー基板を作用極として三電極系を形成したビーカー内で、-1.0 V (vs. Ag/AgCl)を 1 分間印加した。電位印加後、コラーゲングルを剥がし、別のディッシュに移し、位相差顕微鏡観察を行った。

## 4.5 結果・考察

### 4.5.1 細胞接着性ペプチドの金表面上への吸着量

細胞非接着性ペプチド、細胞接着性ペプチドの吸着量を Fig. 4. 3 に示す。細胞接着性ペプチドについても、細胞非接着性ペプチドとほぼ同等の吸着量となった。それぞれペプチドが金表面上に四角配置で配置していると仮定すると、分子間距離は細胞非接着性ペプチドについては約 1.3 nm、細胞接着性ペプチドでは約 1.5 nm となり、いずれのペプチドも密な層を形成していることが示された。また、金表面に結合後のペプチド分子の安定化を分子動力学計算によりシミュレーションしたところ、細胞接着性ペプチドは金表面に結合後、青で示される両性イオン部分で密な層を形成し、緑で示される細胞接着配列が表面に露出した形で安定となることが示唆された(Fig. 4. 4)。

RGD ペプチドを介して細胞を直接接着させるための表面として、アルカンチオール SAM の末端に細胞非接着層としてトリエチレングリコールを修飾し、この細胞非接着層上に RGD 配列を配置した表面が設計されている<sup>[4]</sup>。このように化学的に規定された安定な表面を用いて、RGD ペプチドと細胞内のインテグリンとの相互作用が明らかにされている。本研究で設計した細胞接着性ペプチドについても、細胞非接着層を介して RGD ペプチドを配置したものであり、吸着タンパクではなく RGD を介した細胞接着が可能であると考えられる。

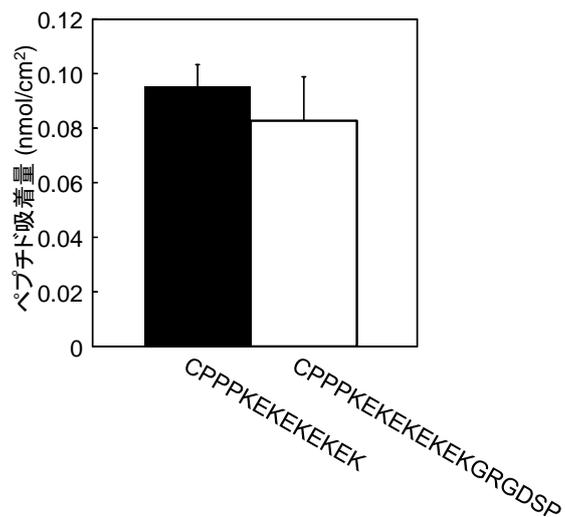


Fig. 4.3 細胞接着性ペプチドの吸着量

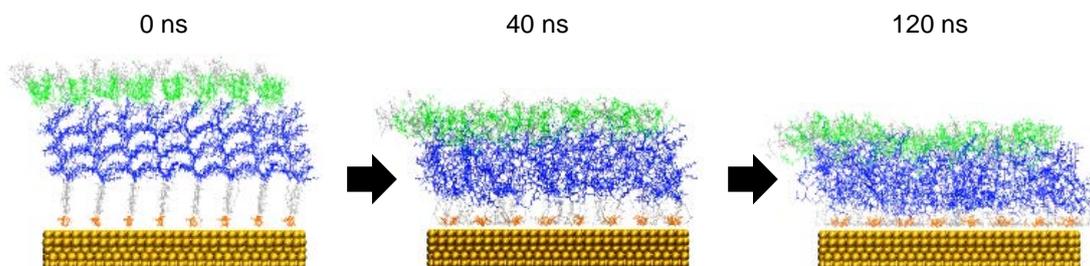


Fig. 4.4 細胞接着性ペプチドの金表面上での安定化  
(青：両性イオン部分 緑：細胞接着部位)

#### 4.5.2 細胞接着性ペプチドの還元脱離電位

細胞接着性ペプチドを用いて、金表面から還元脱離する際に発生する還元電流のピーク電位を、サイクリックボルタンメトリーによって測定した(Fig. 4.5)。赤は1回目のスキャン、黒、青はそれぞれ2,3回目のスキャンを示している。細胞接着性オリゴペプチドの脱離ピーク電位は、 $-0.87\text{ V(vs. Ag/AgCl)}$ であった。このピークは、1回目のスキャンでは明確に現れているが、2回目、3回目のスキャンではピーク高さが減少しており、細胞接着性オリゴペプチドが脱離していることがわかる。従来法であるアルカンチオールSAM、ブリッジ型ペプチドの還元脱離電位はそれぞれ $-0.93\text{ V(vs. Ag/AgCl)}$ 、 $-0.71\text{ V(vs. Ag/AgCl)}$ であり、 $-1.0\text{ V(vs. Ag/AgCl)}$ の電位印加により細胞を脱離させていた<sup>[5, 6]</sup>。また、アルカンチオールSAMの還元脱離電位は電解液のpHによる影響を受けることが報告されており、pHが大きくなるほど脱離電位は負にシフトする<sup>[7]</sup>。サイクリックボルタンメトリー測定は強塩基中で行ったが、細胞脱離実験はpH 7.4のPBS中で行うため、脱離電位も若干シフトすると考えられる。以上の結果より、本研究で設計した細胞接着性オリゴペプチドについても、金表面から脱離させるには $-1.0\text{ V(vs. Ag/AgCl)}$ の電位を印加すれば充分であることがわかった。

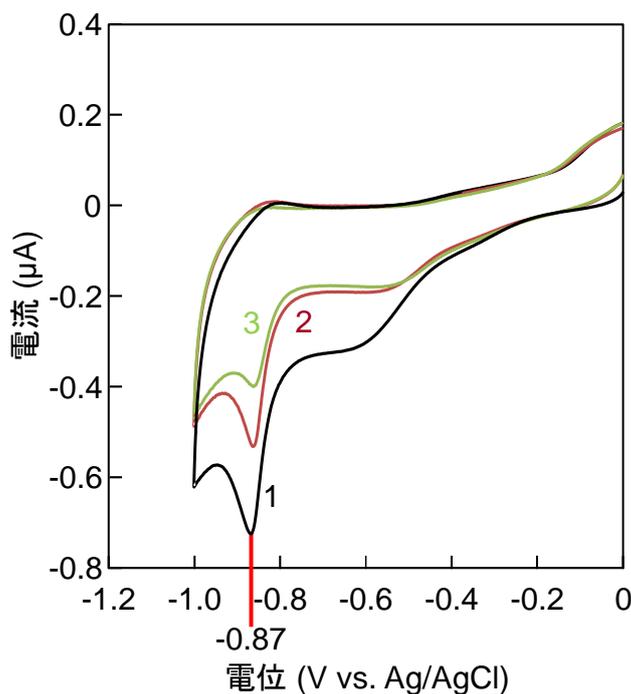


Fig. 4.5 細胞接着性ペプチドの還元脱離電位

## 4.5.3 細胞接着性ペプチド修飾表面への細胞接着・電気化学的細胞脱離

細胞接着性ペプチド、細胞非接着性ペプチドそれぞれを修飾した基板での培養 24 時間後の接着細胞数を Fig. 4.6 に示す。細胞非接着性ペプチド修飾表面への接着細胞数は  $6 \pm 7$  cells/mm<sup>2</sup> であったのに対し、細胞接着性ペプチド修飾表面においては  $125 \pm 8$  cells/mm<sup>2</sup> の細胞が接着したことから、細胞接着性ペプチドの RGD を認識し、細胞が接着可能であることが示された。また、接着細胞数は、従来法であるブリッジ型ペプチドとほぼ同等であり、細胞が良好に接着していることが示された。

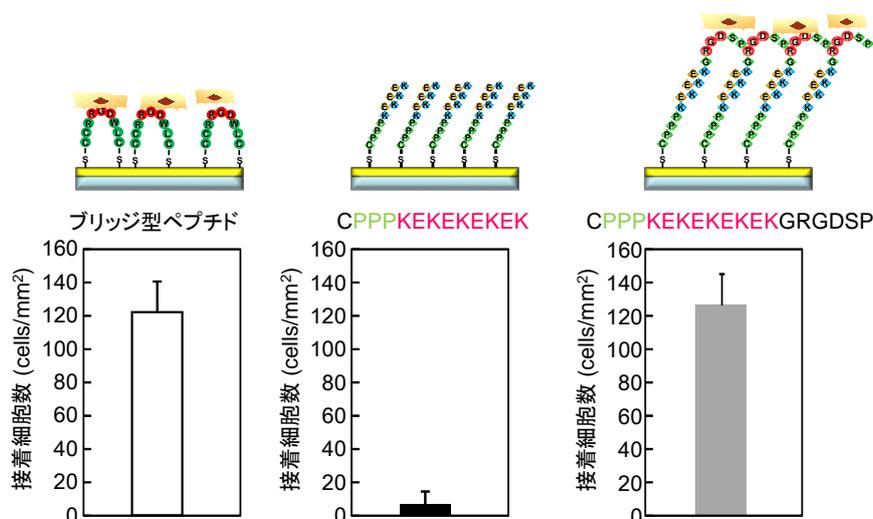


Fig. 4.6 細胞接着性ペプチド修飾表面への細胞接着

続いて、細胞接着性ペプチド修飾基板上に接着した細胞の電気化学的脱離について評価した。Fig. 4.7 に示すように、電位印加に伴い細胞が脱離し、4 分間の電位印加で基板の上すべての細胞が脱離した。この様子を定量的に示した結果が Fig. 4.8 である。ここで、縦軸は電位印加前に基板に接着していた細胞数を 100%としたときの残存細胞率 (%)を示しており、横軸は、電位印加時間を表している。

分子を修飾していない基板においても、一部の細胞が脱離しているが、これには、2つの原因が考えられる。1つは、細胞は吸着タンパクや細胞外マトリックスを介して金基板に接着しており、これらの一部が負電位の印加により除去されたこと、また、もう1つはもともと接着が充分ではない一部の細胞が基板を溶液中に出し入れする際に脱離してしまったことである。従来法であるブリッジ型オリゴペプチドを用いた場合は5分間の電位印加後にも10%ほどの細胞が残存している。一方、今回設計した細胞接着性ペプチドを修飾基板では、4分間の電位印加により基板の上すべての細胞が脱離した。既存の細胞脱離技術と比較すると、温度応答性ポリマーを用いた手法の場合、40~60分程<sup>[8, 9]</sup>、紫外光を用いた手法の場合、3時間程の時間を要する<sup>[10]</sup>ことから、本手法はより迅速な手法であるといえる。

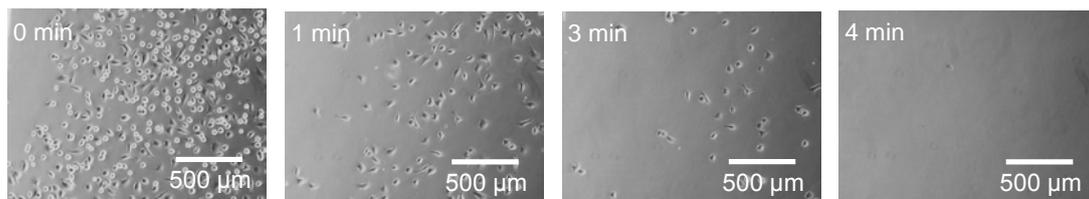


Fig. 4. 7 電気化学的細胞脱離の様子

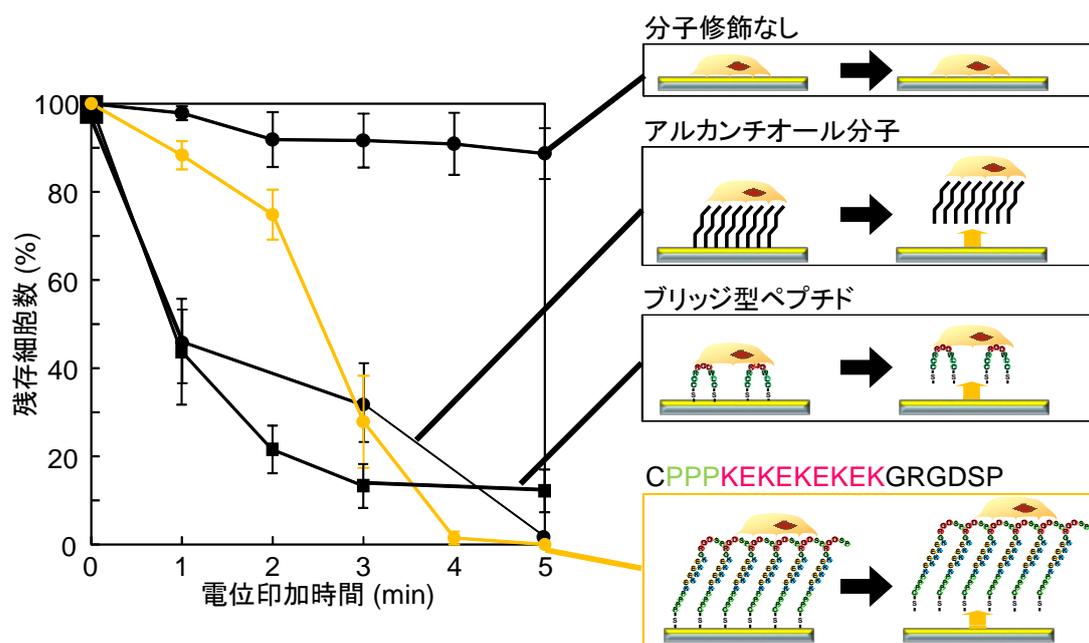


Fig. 4. 8 電気化学的細胞脱離の定量評価

#### 4.5.4 マイクロピラー基板上での電気化学的細胞脱離

これまでに設計した細胞非接着性ペプチドの末端に細胞接着配列を付与した細胞接着性ペプチドによる電気化学的細胞脱離の評価を行った。細胞接着性ペプチドを用いた場合も細胞非接着性ペプチドと同等の吸着量が得られ、細胞が RGD を認識して良好に接着することを示した。更に、電位印加による細胞脱離を評価したところ、4 分間の電位印加により基板上の全ての細胞が脱離した。従来法のブリッジ型ペプチドを用いた際の残存細胞の問題を解決し、より確実な細胞脱離技術が実現された。

一方で、より迅速な細胞脱離を目指す上で障害となるのは、細胞そのものによる電気的抵抗である。これまで、金-チオレート結合の還元脱離に  $-0.87\text{ V}$  (vs.  $\text{Ag/AgCl}$ ) の電位印加が必要であることを実験的に明らかにしているが、細胞のような巨大な物体が接着していると、電極全体への均一な電位印加が妨げられる可能性がある。そこで本節では、綜研化学株式会社より提供していただいた、ナノインプリンティング技術によって作製されたマイクロピラー構造を有する培養基板を用い、細胞周囲からのイオン流入を促進する工夫を施した。

Fig. 4. 9 に、今回使用したマイクロピラー基板の形状値、SEM 画像を示した。マイクロピラー、ナノピラー共に直径、周期は細胞のサイズよりも小さい。SEM 画像より、スパッタの際にピラーが変形するといったことはないことを確認した。Fig. 4. 10 には、細胞接着性ペプチドを修飾したマイクロピラー、およびフラットそれぞれの基板にヒト線維芽細胞を播種し、24 時間培養した結果を示している。マイクロピラー基板上では、フラットな金基板と比較して接着細胞数は少なく、細胞は伸展せず丸まった形状であり、典型的な細胞の最大長さを概算すると、ナノピラー上では約  $25\text{ }\mu\text{m}$ 、マイクロピラー上では約  $35\text{ }\mu\text{m}$ 、フラット基板上では約  $180\text{ }\mu\text{m}$  であった。マイクロピラー基板上では接着可能な面積が限定されるため、細胞は伸展できずに丸まった形態となったと考えられる<sup>[11]</sup>。細胞の接着状態については、アクチンフィラメントや接着斑を染色することにより、より詳細に解析が可能である。また、細胞形態が丸く、接着面積が小さいため、マイクロピラー上の細胞はより脱離しやすくなることが予想される。

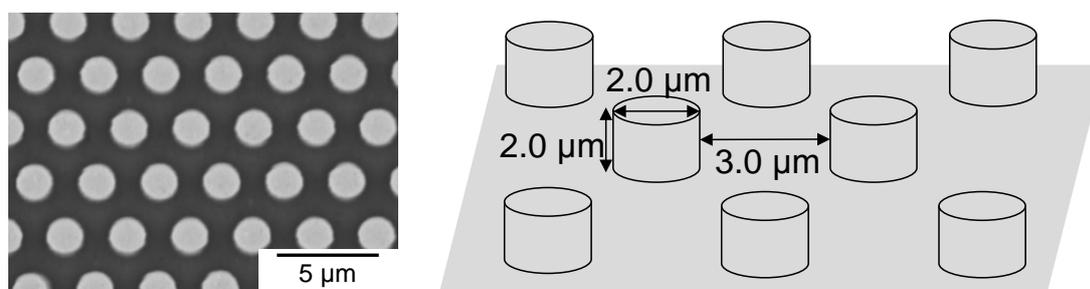


Fig. 4. 9 マイクロピラー基板

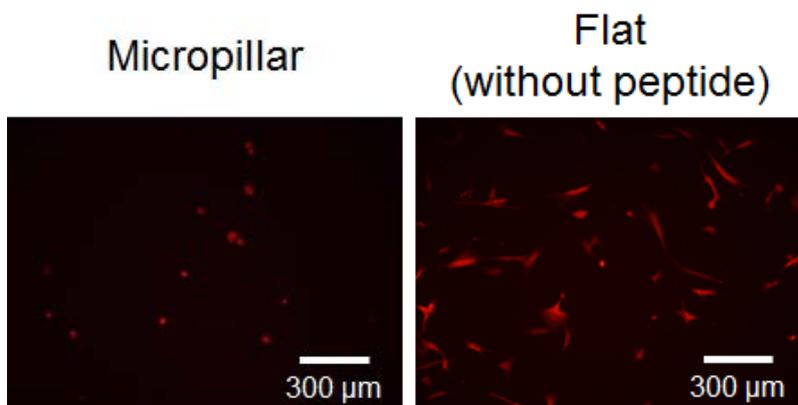


Fig. 4.10 マイクロピラー基板上の細胞

そこで実際に、24 時間培養後の細胞を電位印加により脱離し、評価した。Fig. 4.11 は、電位印加前の接着細胞数を 100%として、電位印加に伴う残存細胞数の割合を示したものである。マイクロピラー基板、フラット基板いずれの場合も、全ての細胞を脱離させるには、3 分程の時間を要した。一方、1 分後での脱離割合を比較すると、フラット基板上では 40%程であったのに対し、マイクロピラー上の細胞では、約 70%の細胞が脱離した。マイクロピラー基板を用いることで、電位がより均一に印加されたと考えられる。

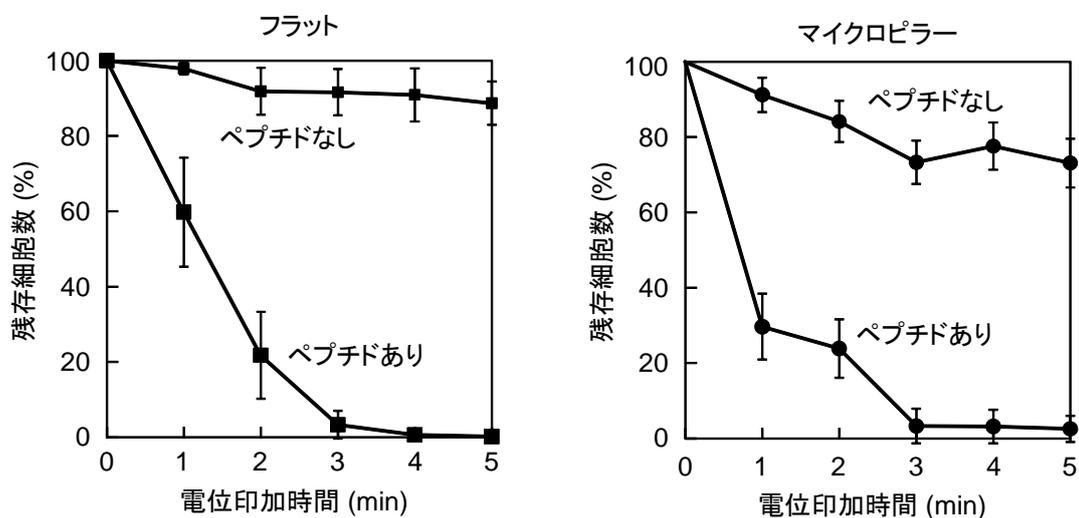


Fig. 4.11 マイクロピラー基板上的での電気化学的細胞脱離

#### 4.5.5 マイクロピラー基板上的の細胞シートのコラーゲンゲルへの転写

これまでの検討により、電位印加により、分散した状態の細胞を脱離可能であることを示してきた。一方で、細胞間接着を保ったシート状態のまま回収することができれば、本技術を再生医療へと応用可能であると考えられる。そこで本節では、細胞シートのコラーゲンゲルへの転写を行い、マイクロピラー基板の有用性を評価した。電位印加によるペプチド脱離、マイクロピラー基板の効果に加え、細胞シートを細胞外マトリックスの一種であるコラーゲンゲルで覆うことにより、細胞シートがコラーゲンゲル側により強く接着し、迅速に転写が可能であると考えられる。実際、ガラス基板上に接着した細胞をコラーゲンゲルで覆い、1日培養した後にガラス基板を取り除くことで細胞をコラーゲンゲルへと転写可能であることが報告されている<sup>[12]</sup>。

まず、マイクロピラー基板上的の細胞増殖を評価した。金をスパッタし、細胞接着性ペプチドを修飾したマイクロピラー基板上的の結果が Fig. 4.12 である。マイクロピラー上での線維芽細胞の増殖について、ピラー間隔が  $2\ \mu\text{m}$  以下の場合にはフラット基板と同等の増殖を示すが、 $4\ \mu\text{m}$  以上の場合には接着面積が低下し、増殖率が低下する報告がされている<sup>[13]</sup>。今回使用したピラー間隔  $3\ \mu\text{m}$  の場合、フラット基板と比較して増殖率は若干低下するが、徐々に増殖していく様子が観察された。

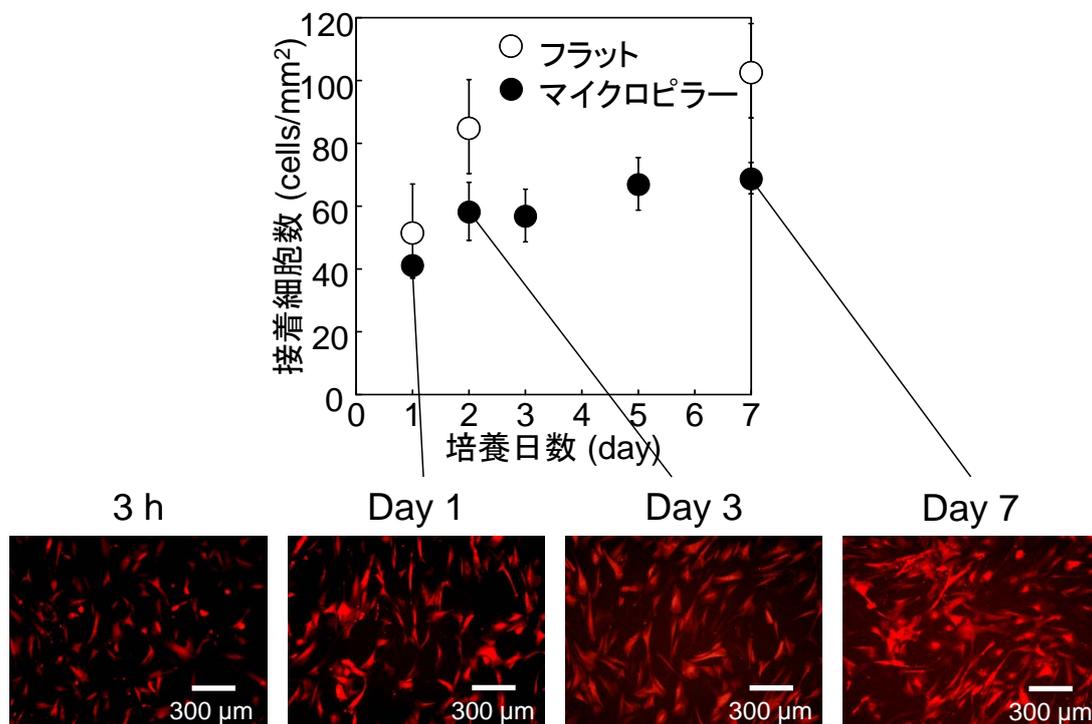


Fig. 4.12 マイクロピラー基板上的の細胞増殖

更に細胞シートを形成させるため、より細胞密度の濃い条件で培養を行い、細胞シートの形成、コラーゲンゲルへの転写を行った。まず、金スパッタ、ペプチド修飾前のスチレン表面のマイクロピラー基板では、接着細胞数は少なく、培養を続けても細胞シートが形成されることはなかった(Fig. 4. 13)。スチレンは疎水性が高く細胞の接着しにくい表面であり<sup>[14]</sup>、また、マイクロピラーにより細胞接着面積が限定されるため、細胞接着、増殖率の低い表面であったと考えられる。

一方、スチレン表面のマイクロピラー基板に金スパッタ、ペプチド修飾を行ったところ、培養1日後には細胞シートが形成された。ペプチド修飾により表面に RGD が提示され、細胞が良好に接着可能な表面が作製された。培養を続けると、配向性のある細胞シートとなり、3日培養後、コラーゲンゲルへと転写を行ったところ、1分間の電位印加により、基板上の細胞がコラーゲンゲルへと転写された(Fig. 4. 14)。電位印加による細胞接着性ペプチド脱離の効果に加え、コラーゲンゲルを用いることで細胞シートがコラーゲンゲル側により強く接着し、迅速な細胞シート脱離が実現されたと考えられる。

今回、マイクロピラー基板上において細胞が一方向に配向した細胞シートが形成された。例えば、骨格筋組織では、筋繊維が同一方向に配向したかたちで束となり、筋肉としても力学的な機能を発揮しているが、マイクロピラー基板によって細胞の配向性を制御した細胞シートを回収し、重ねることで機能的な組織を構築可能であると考えられる。

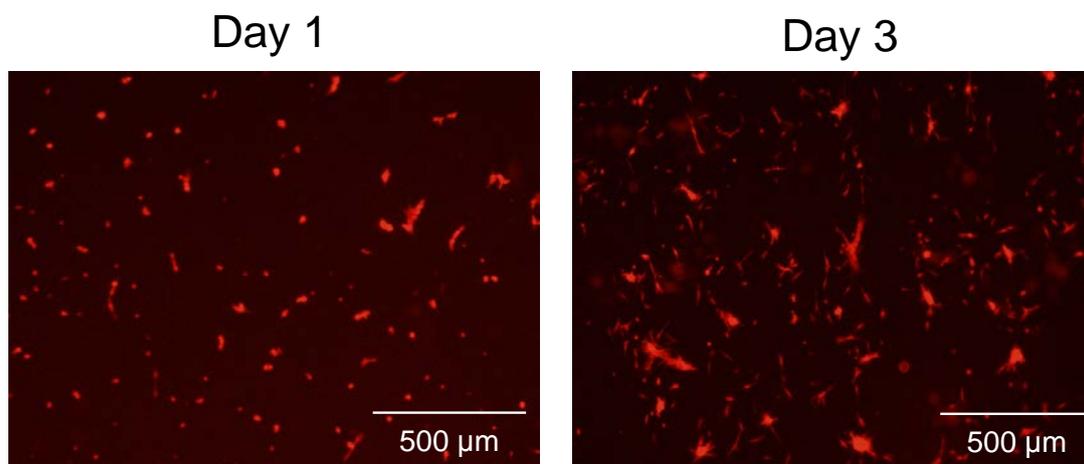


Fig. 4. 13 スチレンマイクロピラー基板上の細胞

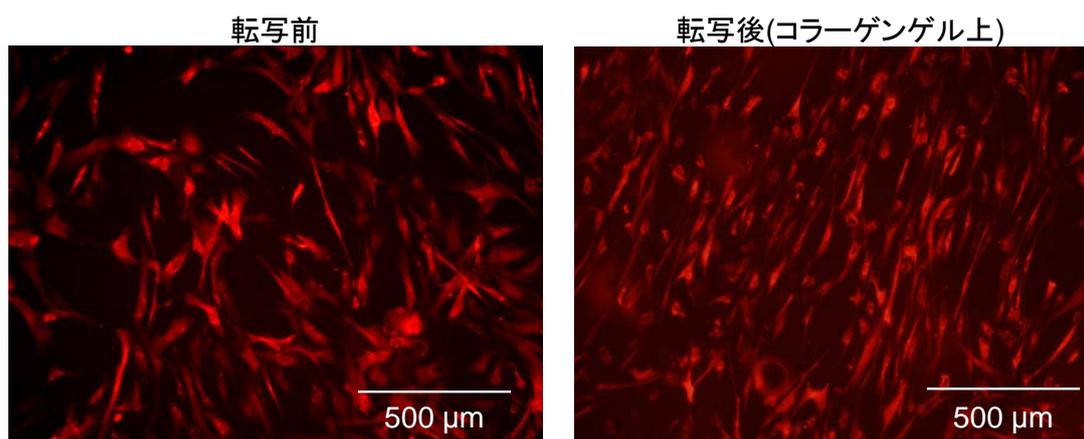


Fig. 4. 14 細胞シートのコラーゲンゲルへの転写

#### 4.6 本章のまとめ

本章では、新たに設計した細胞非接着性ペプチドの末端に細胞接着配 RGD を付与した細胞接着性ペプチドを用いて、電気化学的細胞脱離の評価を行った。細胞接着性ペプチドを修飾した表面上で細胞を培養し、金表面に負電位を印加したところ、基板上に接着した全ての細胞が脱離可能であった。また、細胞自体の電氣的抵抗を考慮し、電気化学的細胞脱離をマイクロピラー基板へと応用し、細胞シートを迅速かつ確実にコラーゲンゲルへと転写可能であることを示した。

## 参考文献

- [1] 田畑康彦 編著、再生医療のためのバイオマテリアル、コロナ社 (2007)
- [2] 岩田博夫、バイオマテリアル、共立出版 (2005)
- [3] 綜研化学株式会社 [https://www.soken-ce.co.jp/product/nano\\_imprint/](https://www.soken-ce.co.jp/product/nano_imprint/)
- [4] Roberts C, Chen CS, Mrksich M, Martichonok V, Ingber DE, Whitesides GM. Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)<sub>3</sub>OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120:6548-55.
- [5] Inaba R, Khademhosseini A, Suzuki H, Fukuda J. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers for engineering cellular tissues. *Biomaterials*. 2009;30:3573-9.
- [6] Seto Y, Inaba R, Okuyama T, Sassa F, Suzuki H, Fukuda J. Engineering of capillary-like structures in tissue constructs by electrochemical detachment of cells. *Biomaterials*. 2010;31:2209-15.
- [7] Munakata H, Oyamatsu D, Kuwabata S. Effects of omega-functional groups on pH-dependent reductive desorption of alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2004;20:10123-8.
- [8] 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*. 2000;50:82-9.
- [9] 酒井康行、民谷栄一監修、動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス、シーエムシー出版 (2007)
- [10] Auernheimer J, Dahmen C, Hersel U, Bausch A, Kessler H. Photoswitched cell adhesion on surfaces with RGD peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127:16107-10.
- [11] 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 Part 2-Letters & Express Letters*. 2005;44:L1184-L6.
- [12] Lahann J, Mitragotri S, Tran TN, Kaido H, Sundaram J, Choi IS, et al. A reversibly switching surface. *Science*. 2003;299:371-4.
- [13] Kolind K, Dolatshahi-Pirouz A, Lovmand J, Pedersen FS, Foss M, Besenbacher F. A combinatorial screening of human fibroblast responses on micro-structured surfaces. *Biomaterials*. 2010;31:9182-91.
- [14] Curtis ASG, Forrester JV, McInnes C, Lawrie F. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *Journal of Cell Biology*. 1983;97:1500-6.

## 第5章

### 総括

本論文の構成

#### 第1章

序論

#### 第2章

自己組織化ペプチドを用いた細胞接着制御

#### 第3章

細胞非接着性ペプチドの設計

#### 第4章

細胞接着性ペプチドを用いた電気化学的細胞脱離  
マイクロ凹凸構造への応用

#### 第5章

総括

第1章では、本研究の背景として、従来の臓器移植や人工臓器に変わる新しい治療法としての再生医療について、その社会的意義と注目される組織工学的アプローチについて述べた。組織工学的アプローチとして、生体足場材料を利用し、皮膚や骨などの生体内でも比較的単純な組織が構築可能となってきたものの、心筋や肝組織などのような組織特有の特性が重要となる多くの組織や臓器の構築は困難である状況を示した。そこで、生体足場材料ではなく、細胞のみからなる生体類似組織を生体外で構築するという手法が有用であり、これを実現するために不可欠な組織回収技術について過去の研究例を挙げた。研究例として挙げた手法の1つである電気化学的な細胞回収法には、安全性や残存細胞といった問題点があり、これらを克服し、安全かつ確実な細胞脱離技術の開発を本研究の目的として明示した。

これを達成するため、本研究で使用した細胞接着性、細胞非接着性の2種類のオリゴペプチドの設計について述べた。

第2章では、設計した細胞非接着性オリゴペプチド(配列: CGGGKEKEKEK)の修飾により、代表的な糖タンパクであるフィブロネクチンやフィブリノーゲンの吸着が未修飾表面と比較して90%程度まで抑制できることを示した。更に、2種類のオリゴペプチドを混合して修飾した表面において、細胞接着性オリゴペプチドの割合が0.1%以上の表面では細胞が良好に接着、伸展し、増殖するのに対し、0.01%以下の表面においては細胞の初期接着は抑制され、増殖率も低いことを示した。細胞接着性ペプチド(配列: CGGGKEKEKEKGRGDSP)修飾表面で細胞を培養し、金表面に負電位を印加すること

で基板上的のマウス線維芽細胞を脱離可能であること、また、ヒト間葉系幹細胞シートの回収が可能であることを示した。

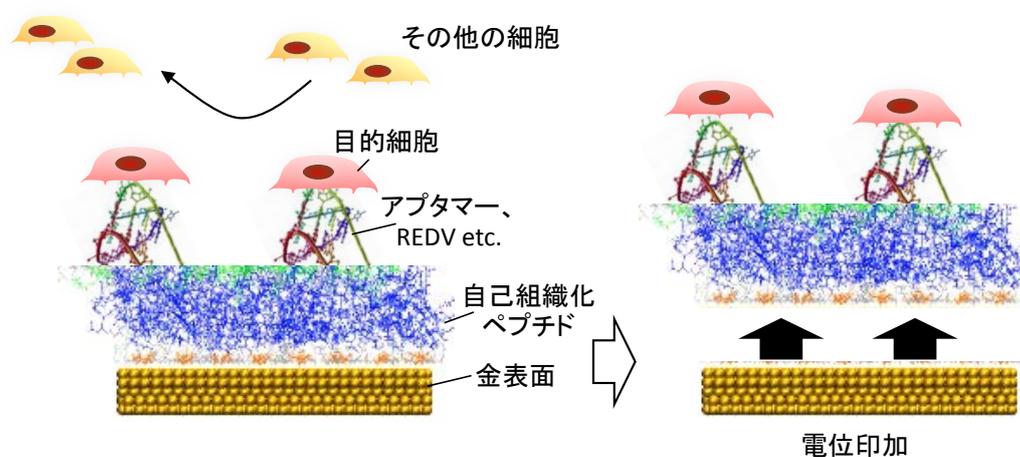
第3章では、より確実な細胞脱離技術の確立を目指し、自己組織化ペプチドの配列をより詳細に検討した。自己組織化ペプチドを金表面に結合するためのアンカー、表面との相互作用を遠ざけるためのリンカー、自己組織化に関わる両性イオン部分に分けてデザインし、リンカー、両性イオン配列の種々の組み合わせからタンパク質の非特異吸着を抑制可能なペプチド配列として、CPPPKKEKEKEKEK を新たに見出した。この細胞非接着性ペプチドの修飾により、タンパク質の非特異吸着、細胞接着を抑制可能であり、電気化学的細胞脱離に有用である可能性を示した。

第4章では、3章で設計した細胞非接着性ペプチドの末端に細胞接着配列 RGD を付与した細胞接着性ペプチド(配列: CPPPKKEKEKEKEKGRGDSP)を用いて電気化学的細胞脱離の評価を行い、この細胞接着性ペプチドを修飾した基板上で培養したヒト線維芽細胞を金表面への負電位の印加により脱離させられることを示した。

更に、表面の凹凸構造を加えることでヒト線維芽細胞をコラーゲンゲルへ確実かつ迅速に転写可能であることを示した。

本研究では、自己組織化ペプチドの設計を行うことでタンパク質の非特異吸着を抑制しつつ細胞が接着可能なペプチド設計、および基板表面の物理的な凹凸構造を組み合わせることで、確実かつ迅速な細胞脱離技術を確立した。

今後、細胞特異的に接着可能なアプタマー、内皮細胞接着配列として知られる REDV 配列などを細胞接着部位として用いることで、細胞選択的な脱離技術への応用も可能であると考えている。



細胞選択的脱離技術

## 研究業績一覧

## 公表論文

- [1] S. Numthum, T. Kakegawa, T. Anada, A. Khademhosseini, H. Suzuki, J. Fukuda, Synergistic effects of micro/nano modifications on electrodes for microfluidic electrochemical ELISA, *Sensors and Actuators B (IF=3.56)*, 156, pp. 637-44 (2011)
- [2] N. Sadr, M. Zhu, T. Osaki, T. Kakegawa, Y. Yang, M. Moretti, J. Fukuda, A. Khademhosseini, SAM-based cell transfer to photopatterned hydrogels for microengineering vascular-like structures, *Biomaterials (IF=7.88)*, 32, pp. 7479-90 (2011)
- [3] N. Mochizuki, T. Kakegawa, T. Osaki, N. Sadr, N. Kachouie, H. Suzuki, J. Fukuda, Tissue engineering based on electrochemical desorption of an RGD-containing oligopeptide, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine(IF=3.53)*, 7(3), pp. 236-43 (2012)
- [4] T. Kakegawa, N. Mochizuki, N. Sadr, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell-Adhesive and Cell-repulsive Zwitterionic Oligopeptides for Micropatterning and Rapid Electrochemical Detachment of Cells, *Tissue Engineering: Part A (IF=4.64)*, 19(1-2), pp. 290-8 (2012)
- [5] T. Kageyama, T. Kakegawa, T. Osaki, J. Enomoto, T. Ito, T. Nittami, J. Fukuda, Rapid engineering of cell-lined vascular-like structures in in situ crosslinkable hydrogels, *Biofabrication(IF=3.71)*, 6(2), 025006 (2014)

## 学会発表

[国際学会]

口頭

- [1] T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell Detachment Along with Electrical Cleavage of a Zwitterionic Oligopeptide Layer. TERMIS-AP Meeting, Sydney, Australia, Sep. 2010
- [2] T. Osaki, T. Kakegawa, N. Sadr, A. Khademhosseini, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrical Cell Transfer for Engineering Capillary-Like Structures in Photocrosslinkable Hydrogels. TERMIS-AP 2011, Singapore, Aug. 2011
- [3] T. Osaki, T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrical Detachment of Cells for Engineering Capillary-Like Structures in a Photocrosslinkable Hydrogel. International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Boston, USA, Sep. 2011
- [4] T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Cell Detachment Along with Electrical Cleavage of a Zwitterionic Oligopeptide Layer. Biofabrication 2011, Toyama, Japan, Oct. 2011
- [5] T. Kakegawa, H. Suzuki, J. Fukuda, Surface Engineering for Dynamic Cell Detachment Along with Electrochemical Desorption of a Zwitterionic Oligopeptide Layer. MRS Fall

Meeting, Boston, USA, Nov. 2011

- [6] T. Osaki, T. Kakegawa, J. Fukuda, Rapid assembly of perfusable microvascular-like structures by electrochemical cell transfer, TERMIS-AM, Atlanta, USA, Nov. 2013
- [7] T. Kakegawa, A. Gautiarti, T. Osaki, T. Kageyama, F. Rigoldi, A. Manenti, J. Fukuda, Design of Self-Assembled Oligopeptide for Electrochemical Cell Detachment. TERMIS-AP 2014, Daegu, Korea, Sep. 2014

ポスター

- [1] T. Kakegawa, A. Gautieri, N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Zwitterionic Oligopeptides for Cell Micropatterning and Electrochemical Rapid Cell Detachment. 3<sup>rd</sup> TERMIS World Congress, Vienna, Austria, Sep. 2012  
TERMIS Poster Finalist Award、Travel Award 受賞
- [2] T. Kakegawa, A. Gautieri, N. Mochizuki, H. Suzuki, J. Fukuda, Electrochemical Cell Detachment using Zwitterionic Oligopeptides. Biofabrication 2012, Manchester, UK, Oct. 2012
- [3] T. Kakegawa, A. Gautieri, F. Rigoldi, A. Manenti, J. Fukuda, Self-Assembled Oligopeptides for Electrochemical Cell Detachment. 2013 TERMIS-eu, Istanbul, Turkey, Jun. 2013
- [4] T. Kageyama, T. Kakegawa, T. Osaki, T. Ito, T. Nittami, J. Fukuda, IN SITU CROSSLINKABLE HYDROGEL FOR RAPID ENGINEERING OF VASCULAR-LIKE STRUCTURES BY USING ELECTROCHEMICAL DETACHMENT OF CELLS. Micro TAS, Freiburg, Germany, Oct. 2013

[国内学会]

口頭

- [1] 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、自己組織化オリゴペプチドを用いた細胞接着制御、化学工学会第42回秋季大会、2010年9月、同志社大学
- [2] 福田淳二、大崎達哉、掛川貴弘、電気化学細胞脱離を利用した血管様構造の作成技術、第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、京王プラザホテル（新宿）
- [3] 福田淳二、掛川貴弘、望月直人、大崎達哉、鈴木博章、自己組織化単分子膜の還元脱離を利用した細胞組織体の構築、電気化学学会第78回大会、2011年3月、横浜国立大学
- [4] 福田淳二、望月直人、掛川貴弘、鈴木博章、自己組織化単分子膜の電気化学還元脱離を用いた細胞脱離技術、第33回日本バイオマテリアル学会大会、2011年11月、京都府民総合交流プラザ

- [5] 福田淳二、掛川貴弘、望月直人、大崎達哉、鈴木博章、両性イオンペプチド分子層の還元脱離を利用した細胞組織の構築、電気化学会第79回大会、2012年3月、アクトシティ浜松
- [6] 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、自己組織化オリゴペプチドを用いた細胞脱離、第11回日本再生医療学会総会、2012年6月、パシフィコ横浜
- [7] 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、細胞脱離のための自己組織化オリゴペプチドの設計、生物工学会第4回若手研究シンポジウム、2012年7月、モンタナリゾート岩沼
- [8] 福田淳二、掛川貴弘、Alfonso Gautieri、自己組織化ペプチドを用いた培養皿表面の設計、化学工学会 第45回秋季大会、2013年9月、岡山大学

ポスター

- [1] 掛川貴弘、鈴木博章、福田淳二、自己組織化オリゴペプチドを用いた細胞脱離、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月、つくば国際会議場
- [2] 掛川貴弘、Alfonso Gautieri、鈴木博章、福田淳二、電気化学的細胞脱離のための自己組織化オリゴペプチドの設計、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、2012年11月、仙台国際センター
- [3] 掛川貴弘、Alfonso Gautieri、福田淳二、電気化学的細胞脱離のための自己組織化オリゴペプチドの設計、化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回研究会、2013年5月、東北大学
- [4] 掛川貴弘、Alfonso Gautieri、福田淳二、電気化学的細胞脱離のための自己組織化オリゴペプチドの設計、化学工学会 第45回秋季大会、2013年9月、岡山大学
- [5] 掛川貴弘、Alfonso Gautieri、大崎達哉、福田淳二、電気化学的細胞脱離のための自己組織化オリゴペプチドの設計、シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来、2013年11月、東京大学
- [6] 景山達斗、掛川貴弘、大崎達哉、伊藤大知、福田淳二、三次元臓器モールドイングに向けた *in situ* ゲル化マテリアル、日本バイオマテリアル学会、2013年11月、タワーホール船堀
- [7] 掛川貴弘、Alfonso Gautieri、福田淳二、自己組織化オリゴペプチドを用いた細胞接着制御、第66回生物工学会大会、2014年9月、札幌コンベンションセンター

執筆

- [1] 福田淳二、掛川貴弘、細胞培養マイクロデバイス、生物工学会誌、92(1), pp. 13-9 (2014)

- [2] 福田淳二、掛川貴弘、細胞培養マイクロデバイスの研究 マイクロスケールでの細胞培養・解析技術、化学と生物、52(6), pp. 356-8(2014)
- [3] 景山達斗、掛川貴弘、福田淳二、トップダウン組織工学、マイクロバイオ技術の潮流・実利用・展望、生物工学会誌、92(4), pp. 166-70(2014)
- [4] J. Enomoto, T. Kakegawa, T. Osaki, T. Kageyama, J. Fukuda, Cell detachment for engineering three-dimensional tissues, *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems*, in press

特許

- [1] 福田淳二、鈴木博章、望月直人、掛川貴弘、特願 2010-203741 「培養方法及び培養装置」
- [2] J. Fukuda, H. Suzuki, N. Mochizuki, T. Kakegawa, Applicants: University of Tsukuba, Cell culture method and device, International Application No.: PCT/JP2011/070533, International Filing Date: 8.9.2011 ; 特願 2012-5330

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、数多くの方々にご協力をいただきました。ここに深く感謝いたします。

指導教員の筑波大学数理物質科学研究科、鈴木博章教授におかれましては、研究活動全般にわたり、懇切丁寧なご指導を賜りました。特別研究派遣学生として拠点を移動後におきましても終始ご指導、ご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

横浜国立大学工学研究院、福田淳二准教授におかれましては、実験技術、論文執筆を含めたプレゼンテーション技術から、研究室生活、全てにおいてご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

筑波大学数理物質科学研究科、横川雅俊助教におかれましては、生化学の知識、発表資料の作成など数多くのご助言を賜りました。心より感謝申し上げます。

筑波大学数理物質科学研究科長崎幸夫教授、物質・材料研究機構陳国平主任研究者、筑波大学数理物質科学研究科山本洋平准教授におかれましては、ご多忙の中本論文審査をお受けくださり、ご指導、ご助言を賜りました。深く感謝申し上げます。

イタリア Politecnico di Milano Alfonso Gautieri 博士におかれましては、ペプチドシミュレーションに関して多大なるご支援をいただきました。深く感謝申し上げます。

綜研化学株式会社吉原功様、三澤毅秀様、須藤康夫様におかれましては、マイクロピラー基板に関して多大なご支援をいただきました。深く感謝申し上げます。

有意義な研究生生活を送らせていただきました筑波大学数理物質科学研究科鈴木研究室、横浜国立大学工学府福田研究室の先輩方、在学生の皆様に心より御礼申し上げます。中でも細胞グループとして共に研究を進めてきた大崎達哉さん、景山達斗さん、榎本詢子さんには感謝の言葉もありません。

最後に、研究に専念できる環境を与えていただいた家族に感謝いたします。

平成 27 年 2 月  
掛川 貴弘