

博士論文

温度応答性培養基材のための 高分子ブラシ構造の分子設計に関する研究

2014 年度

東京理科大学大学院
基礎工学研究科 材料工学専攻
松坂 直樹

要旨

これまでに、医療・バイオ分野への展開を目的とした生体材料が開発されており、材料表面のぬれ性、電荷、形状、硬さなどの物理化学的性質を制御することで細胞培養技術、医薬・診断薬、生体分子・細胞解析および治療・移植技術、などに応用されてきた。その中でも、さまざまな刺激に応じて分子レベルで性質を変化させる刺激応答性高分子を用いたインテリジェント材料が近年注目されている。刺激応答性高分子は周辺環境の物理化学的刺激(温度、光、pH、生体分子など)に応答し、その性質や形状変化による体内への薬物送達システム、細胞や生理活性物質の分離技術といった応用例が報告がされている。刺激応答性高分子材料は細胞を用いた組織再構築を実現する再生医療への応用も活発に行われている。再生医療は、事故や疾患により生体組織・臓器の機能の障害、不全が生じた場合、細胞を積極的に用いて組織を再構築し、機能回復を図るものであり、生体内や培養系において、体の組織構造を再生させる組織工学(Tissue Engineering)という手法が提唱されている。本手法の一つに、生分解性高分子を組織の性質や形状に合わせて成型した細胞培養の足場として用いる方法があり、生分解性材料が分解する過程で生じる移植部位の炎症反応や、心臓もしくは肝臓といった細胞密度が高く複雑な構造を有する臓器再生は困難、などの問題がいまだに残っている。そこで、Okano らは生分解性高分子による足場を用いず、細胞からなるシート状組織を移植することで組織再生を可能とする「細胞シート工学」を提案した。細胞シート工学では温度応答性高分子を修飾した培養皿により、温度変化で細胞外マトリックス(Extracellular matrix, ECM)を維持した状態で一面に増殖した細胞をシート状組織“細胞シート”として非侵襲的に回収することに成功し、すでに細胞シートを用いた再生医療の臨床研究が始まっている組織・臓器も存在する。

温度応答性細胞培養皿は下限臨界溶液温度(Lower critical solution temperature, LCST)を 32°C に有する温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)を電子線重合することで調製される。しかし、この方法では培養皿上にグラフトされた表面高分子層は架橋構造をもち、PNIPAAm の鎖長・密度の精密制御、高分子鎖の分子設計、温度変化にともなう細胞の接着・増殖および脱着挙動に対してグラフトした PNIPAAm 構造がどのように影響

するかを議論することは困難であった。そのため、基板表面上に高分子鎖がブラシ状にグラフトされた構造を有する PNIPAAm ブラシ表面を作製可能なリビングラジカル重合 (Living radical polymerization, LRP) に本研究は着目した。LRP の一種である表面開始可逆的付加-開裂連鎖移動型ラジカル重合法 (Surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer (SI-RAFT) radical polymerization) を用いて、鎖長、グラフト密度を精密制御した PNIPAAm ブラシ構造表面を作製することで、細胞の接着・脱着挙動に関する基礎的評価が行われてきた。SI-RAFT 重合では、高分子ブラシ構造で基板表面上にグラフトされ、その末端官能基には連鎖移動剤 (Chain transfer agent, CTA) 由来の機能性官能基が存在する。そのため、電子線重合法では作製できない多段階重合によるブロック共重合体ブラシ構造やポリマー鎖末端に機能性官能基を導入などの高分子ブラシの設計が可能となる。以上の背景から、本研究では、種々の高分子ブラシ構造が基板の物性、細胞の接着・増殖挙動、および細胞シート回収に与える影響について検討するために、SI-RAFT 重合を用いて温度応答性培養表面のための高分子ブラシ構造の分子設計について追求した。

第2章では、ガラス基板上に温度応答性ブロック共重合体ブラシ構造を構築することで、PNIPAAm 単層の基板と比較してブロック共重合体構造における異種のポリマー層が細胞の接着・増殖および細胞シート回収に与える影響について検討することを目的とした。高分子ブラシの生長末端には CTA 由来の官能基を有することから、多段階の重合を行い、ブロック共重合体構造の構築が可能である。本研究では、ブロック共重合体ブラシの下層となる第一段階目の重合では疎水性高分子である poly(benzyl methacrylate) (PBzMA) を SI-RAFT 重合によって導入した。次に、上層となる第二段階目の重合で PNIPAAm を同様に重合し、温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面を作製した。各ポリマーのグラフト量を ATR/FT-IR 測定より算出した結果、第一層の PBzMA を重合する際、重合溶液中の BzMA 濃度を 1 mol/L (sBz(S): $0.28 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) または 3 mol/L (sBz(L): $0.50 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) に調節し、グラフト量が異なる PBzMA 基板を作製した。次に、PNIPAAm を CTA のみ固定化した基板と各 sBz に対して重合を行うことで、PNIPAAm 単層の表面 (sIP: $0.81 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) とブロック共重合体ブラシ表面 (sBz(S)-IP: $0.93 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, sBz(L)-IP: $0.90 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) において PNIPAAm のグラフト量が同等であることが示された。また、作製した基板上の

水に対する表面ぬれ性を静的接触角測定で評価したところ、すべての PNIPAAm 修飾表面では 32°C 付近を境に低温側では約 30°、高温側では約 39°となり、グラフトされた PNIPAAm が温度に応じて相転移挙動を示すことが確認された。作製した基板に、ウシ頸動脈由来血管内皮細胞(EC)を 1.0×10^5 cells/cm² の濃度で播種してから 37°C で培養後、sIP および sBz(S)-IP では播種後 5 日以内で EC が基板全体に増殖したが、sBz(L)-IP では播種後 7 日後も EC は基板全体に増殖しなかった。次に、EC が基板全体に増殖した sIP および sBz(S)-IP を 20°C に静置したところ、sBz(S)-IP では静置後約 20 分、sIP では約 60 分で細胞をシート状の組織として回収できることを明らかにした。この剥離速度の促進は PNIPAAm 層の下層に導入した PBzMA 層が起因している。sBz(L)-IP は sBz(S)-IP と比較して細胞の接着・増殖が抑制されていることから、PBzMA 鎖の鎖長の増加にともなう細胞および接着タンパク質と基板との相互作用が低下した。そのため、細胞シート回収において sIP と比較して sBz(S)-IP は PBzMA 層が起因して細胞シートの剥離挙動が加速したと考えられる。以上の結果から、PBzMA 層のグラフト量を調節することで、細胞の接着・増殖性を変えることなく細胞シートの剥離速度を促進させることに成功した。

第 3 章では、疎水性官能基であるドデシル基を有する CTA を用いて SI-RAFT 重合を行い、基板表面の PNIPAAm 鎖の生長末端を疎水性から親水性に置換することで、末端官能基の親・疎水性の変化が PNIPAAm 鎖の特性およびそれにとまなう細胞の接着・脱着挙動に与える影響を検討することを目的とした。PNIPAAm 鎖は水中で LCST を 32°C にもつが、PNIPAAm 鎖の末端官能基の親・疎水性によって LCST は低温または高温側にシフトすることが報告されている。本研究では、疎水性官能基であるドデシル基を有する CTA を用いて NIPAAm の SI-RAFT 重合を行い、末端官能基がドデシル基の PNIPAAm 修飾基板(sIP-D)を作製した。次に還元反応によって末端ドデシル基をチオール基に置換し、親水性官能基であるマレイミド基を導入した PNIPAAm 修飾基板(sIP-M)を作製した。ATR/FT-IR 測定から PNIPAAm のグラフト量は sIP-D(1.02 ± 0.10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)と sIP-M(0.95 ± 0.12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)となり、同等の値を示した。作製した基板に対して、EC を 5.0×10^3 cells/cm² の濃度で播種後、25~37°C の間の所定温度で 24 時間培養を行い、温度依存的な EC 接着挙動を評価した結果、sIP-D では 31°C、sIP-M では 33°C 以上で細胞の接着を確認した。続いて、各基板の水に対するぬ

れ性を静的接触角測定により評価した結果、sIP-Dは30°C、sIP-Mは31°C付近を境にぬれ性の変化を示した。また、リニアなPNIPAAmのLCSTと比較するために、基板上にグラフトしたPNIPAAm鎖と同等の分子量を有する片末端機能型PNIPAAmを合成して、末端基の違いによるPNIPAAm鎖のLCSTを吸収波長600nmの各温度における光透過度変化を行った。その結果、PBS中における温度変化測定においてLCSTは、ドデシル基末端を有するPNIPAAmが29.0°C、マレイミド基末端を有するPNIPAAmが29.6°Cとなった。この結果より、各基板における水に対するぬれ性の差とリニアなPNIPAAmにおけるLCSTの差の違いは基板上のPNIPAAm鎖のグラフト密度が影響していると考えられる。グラフト密度は、PNIPAAm鎖の分子量とグラフト量から算出した結果、0.16 chains/nm²となり、高密度な状態でPNIPAAm鎖がグラフトされている。そのため、sIP-Dでは密度高く修飾されたPNIPAAm鎖の末端ドデシル基同士が疎水性のクラスターを形成することで、PNIPAAm鎖近傍の脱水和・凝集を促進する。その結果、基板上のPNIPAAm鎖のLCSTがさらに低温側にシフトすることになり、リニアなPNIPAAm同士のLCSTの差よりも各基板上におけるぬれ性変化の境目の差が拡大したと考えられる。以上より、末端官能基が疎水性のドデシル基ではLCSTが低温側へ、親水性のマレイミド基では高温側へシフトしたため、細胞の接着可能な開始温度に違いが生じる結果が示された。一方、細胞シートの回収を検討するため、ECが基板全体に増殖した両基板を20°Cに静置したところ、sIP-Dでは静置後約29分、sIP-Mでは約23分で細胞をシート状の組織として回収できることを確認した。これは、PNIPAAm鎖の脱水和・凝集のプロセスでは末端官能基が起点となって相転移挙動が生起され、水和・伸長のプロセスでは末端官能基に関係なくPNIPAAm鎖が無作為に水和・伸長の相転移挙動を示すため、細胞シートの剥離挙動に違いが生じなかったと考えられる。以上の結果から、末端官能基の違いによって基板上のPNIPAAm鎖のLCSTを低温または高温側にシフトさせ、細胞の接着可能な開始温度の制御に成功した。

以上より、第2章では温度応答性ブロック共重合体ブラシ構造による細胞の接着・脱着挙動の制御および細胞シートの剥離速度の加速化、第3章では末端官能基の親・疎水性の違いによるPNIPAAm鎖のLCSTの変化を利用した細胞が接着可能な開始温度の制御に成功した。これらの結果から、SI-RAFT重合を用いてブロック共重合体ブラシ構造や末端官

能基の親・疎水性の選択といった、温度応答性培養基材のための高分子ブラシ構造の分子設計を行うことが可能となった。また、それらの高分子ブラシ構造の分子設計が PNIPAAm 鎖のグラフト鎖長・密度以外の細胞の接着・脱着挙動に対する新たな制御因子として、種々の細胞腫や共培養などの培養方法に対応した基板表面のブラシ構造を調製可能な温度応答性表面としての応用が期待される。これにより将来的に、本手法により作製した基板を用いてさまざまな細胞種を細胞シート化する際に、細胞特有の性質により基板上において細胞が接着・増殖しない、増殖してもシート状に回収することが困難な細胞、または、臓器の構造や複数種の細胞を用いてより人体を模倣した細胞シートの作製といった多種多様な細胞種の培養とその機能的な細胞シート作製への応用が考えられる。

Abstract

In recent years, biomaterials are developed for the purposes of expansion to the medical and biotechnology fields. Physical-chemical property with wettability, charge, architecture and hardness of materials surfaces are regulated in biomaterials fields. In addition, these materials are widely applied for cell culture technique, medical devices, diagnostic products, biological analysis and implantation techniques. Among such materials, stimuli-responsive polymers have received of great attention as intelligent materials, those possessing property alterations in response to variety of stimuli at the molecular level. Such unique materials are responding to the surrounding environmental changes (e.g. temperature, light, pH, and biomolecules), and these property alterations and molecular architecture are applied to various biomedical applications such as controlled drug delivery systems, bioseparation and enzyme conjugation. Nowadays, stimuli-responsive polymers are applied to regenerative medicine for producing tissue reassembly with cells. Regenerative medicine is recognized as one of the medical treatments to regenerate tissues and to restore body function of incompetence to nonfunctioning tissues accompanied by accidents or diseases. A type of regenerative medicine research, there is a study on the technology of transplantation of cells cultured on matrices to organs. This technique has been proposed as “tissue engineering”. In this method, the biodegradable polymers are commonly used as a scaffold of the molded cell culture to suite the nature and shape of the tissue. However, biodegradable materials have some problems with regeneration of complex organs and inflammatory reaction of the implantation site due to decomposition process. Therefore, Okano et al. has suggested a new field in regenerative medicine using a unique strategy for establishing a tissue reconstruction technology without any scaffold materials, “cell-sheet engineering”. Cell-sheet engineering using thermoresponsive cell culture dishes are chemically bound poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) with lower critical solution temperature (LCST) at 32°C. By using the PNIPAAm-grafted surfaces, confluent cultured cells can be harvested as an intact tissue-like cellular architecture, “cell sheet” with extracellular matrix (ECM) at the basal side of cells by solely reducing temperature, and then cell sheets-based human clinical

investigations have already started for treatment of several tissues.

Thermoresponsive cell culture surfaces are generally prepared by electron beam (EB)-irradiated graft polymerization of monomer, NIPAAm, and it can be producing nanoscale PNIPAAm layers with a cross-linked structure. However, in this method it is often difficult to precise control of the chain length, density and chemical structure of grafted PNIPAAm. Therefore, I focused on the living radical polymerization (LRP), which can be manufactured PNIPAAm brush surfaces with a defined structure of PNIPAAm. Surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer (SI-RAFT) radical polymerization as one of LRP techniques, was utilized in this thesis, since this polymerization technique has feasible characteristics, such as controlled chain length of formed on the matrix surfaces, high grafting densities, and the chains possessing terminal functional groups arising from the chain transfer agent, which will further be used in additional polymer synthesis, and/or terminal functionality alterations. Thus, in this thesis, PNIPAAm brush surfaces were prepared using SI-RAFT method to produce well-controlled chain lengths, graft density, the terminal functional groups and molecular architectures. In addition, PNIPAAm-brush surfaces have been pursuing the basic assessment of cell adhesion/detachment behavior. SI-RAFT polymerization exhibits end functional groups derived from the chain transfer agent (CTA)-derived terminal groups. Therefore, this method is possible to control the chemical structure such as block copolymer brush structure and/or introduce functional groups at the terminal group on polymer brushes. In this study, molecular design of the polymer brush surface investigated that it is controlled cell adhesion/detachment behavior as the situation demands by SI-RAFT polymerization.

In capture 2, heterogeneous polymer underlayers of block copolymer brush surfaces were intended to examine influencing for both cell adhesion/detachment behavior and cell sheet harvest, compared with homo-PNIPAAm brush surfaces. Thermoresponsive block copolymer brush surfaces were prepared by two-step SI-RAFT polymerization, first-layer hydrophobic poly(benzyl methacrylate) (PBzMA) and second-layer PNIPAAm. The grafted amounts of PBzMA and PNIPAAm were determined by ATR/FT-IR analysis, and PBzMA with monomer concentration 250 mmol and 750 mmol achieved the construction of sBz(S) and sBz(L) with different grafting amount. In addition,

both homo-PNIPAAm brush surfaces (sIP) and block copolymer brush surfaces (sBz(S)-IP and sBz(L)-IP) were exhibited equivalent grafted PNIPAAm. The surface wettability of various polymer-grafted surfaces was characterized by static water contact angle measurements, and then sIP and both sBz-IP suggested temperature dependent changes in contact angles across PNIPAAm's LCST of 32°C. Bovine carotid artery endothelial cells (ECs) were seeded at 1×10^5 cells/cm² on various polymer-grafted surfaces at 37°C, and then were cultured confluent. Adherent cells on both sIP and sBz(S)-IP were proliferously reached to confluent within 5 days. In contrast, sBz(L)-IP was difficult to proliferate to confluent. In addition, cell sheets detached from sBz(S)-IP and sIP within approximately 20 min and 60 min, respectively, by reducing temperature to 20 °C. Compared sBz(S)-IP and sBz(L)-IP, these results indicated that interaction of adhesion cells and proteins were decreased by the increase in the PBzMA chain length. Therefore, the accelerated cell sheet harvest of sBz(S)-IP was probably attributed to introducing cell-repellent PBzMA basal layers in the block copolymer brush structures. In this capture, block copolymer brush surfaces have been successfully achieved accelerating cell sheet harvest without altering cell adhesion and proliferation by controlled amount of grafted PBzMA of under layer.

In capture 3, terminal-functional groups of PNIPAAm-brush surfaces were intended to examine the effect of cell adhesion/detachment behavior. PNIPAAm chains with CTA-derived terminal groups through SI-RAFT polymerization possessed various functional groups by substitution reaction. In a previous study, thermal phase transitions of PNIPAAm were shifted to low and/or high temperature by differing terminal groups with hydrophobic/hydrophilic properties. Therefore, PNIPAAm-brush surfaces with terminal hydrophobic dodecyl groups (sIP-D) were prepared by SI-RAFT polymerization. Secondly, hydrophilic maleimide-terminated PNIPAAm-brush surfaces (sIP-M) were obtained via the terminal reduction and coupling reaction. The grafted amounts of PNIPAAm on each PNIPAAm-grafted surface were exhibited equivalent value by ATR/FT-IR analysis. Temperature dependent surface wettability changes of sIP-D and sIP-M were varied 30 °C and 31 °C by static water contact angle measurements. ECs were seeded at 5×10^3 cells/cm² on each PNIPAAm-brush surface at range of 25 to 37 °C for the influence of terminal functionality on cell

adhesion temperature. After 24h incubation, cell adhesion on sIP-D and sIP-M were initiated culture-temperature above 31 °C and 33 °C. These cellular adhesion behaviors conformed highly to the surface property of PNIPAAm-brush surfaces with terminal hydrophobic/hydrophilic groups, from which was ascertained by the surface wettability investigation. In addition, linear-PNIPAAm was prepared by equal molecular weights to PNIPAAm-brushes for determine phase transition temperature of PNIPAAm. Linear-PNIPAAm was exhibited dodecyl-terminated PNIPAAm at 29.0 °C and maleimide-terminated PNIPAAm at 29.6 °C by heating process of solution turbidity method. These results indicated that difference between surface wettability and turbidity temperature was effect of grafted PNIPAAm density on phase transition temperature. The grafted PNIPAAm density on surfaces was calculated to be approximately 0.16 chains/nm². Hydrophobic dodecyl groups on sIP-D were aggregated as a polymeric micelle by hydrophobic interaction, and then it was considered that LCST was more shifted to the low temperature. In contrast, temperature-dependent cell detachment was hardly effected by terminal groups on PNIPAAm-brush. In this capture, cell adhesion on PNIPAAm brushes at unique temperatures was proficiently controlled in spite of chemical composition of PNIPAAm brushes and molecular weight were equality anticipate for terminal groups.

In conclusion, these results succeeded that these methods has become possible to alter the surface property by molecular design of polymer brush structure with selection of heterogeneous polymer layer and terminal hydrophobic/hydrophilic groups. Therefore, it is expected as a thermoresponsive surface which can be situationally prepared the brush structure. By means of the unique system, construction of PNIPAAm brushes can be applied to corresponding to the various cells and condition, and then subsequently composed high-functional cell sheets.

目次

第1章 序論	1
1.1 生体材料に関する研究	2
1.2 再生医療に関する研究	2
1.3 細胞シート工学	4
1.4 温度応答性高分子 PNIPAAm	5
1.5 温度応答性高分子修飾表面	7
1.5.1 温度応答性培養皿に対する細胞の接着・増殖 / 脱着挙動の解析	7
1.5.2 電子線重合による PNIPAAm 修飾表面の構築	8
1.5.3 温度応答性高分子ブラシ表面の構築	10
1.5.3.1 リビングラジカル重合	10
1.5.3.2 “grafting to”または“grafting from”法による高分子ブラシ表面の作製	12
1.5.3.3 表面開始-原子移動ラジカル重合を用いた PNIPAAm ブラシ修飾表面	13
1.5.3.4 表面開始-可逆的付加-開裂連鎖移動型ラジカル重合を用いた PNIPAAm ブラシ修飾表面	14
1.6 研究概要	15
1.7 参考文献	17
第2章 温度応答性ブロック共重合体ブラシ構造が細胞の接着・脱着挙動に与える影響	22
2.1 緒言	23
2.2 実験方法	24
2.2.1 試薬	24
2.2.2 使用機器	27
2.2.3 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (CPDTB)の合成	28
2.2.3.1 Bis(thiobenzoyl)disulfide の合成	28
2.2.3.2 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate の合成	29
2.2.4 第一級アミノ基導入ガラス基板の調製	30

2.2.5	ガラス表面へのアゾ系重合開始剤の導入	30
2.2.6	SI-RAFT 重合による PBzMA ブラシ表面の作製	31
2.2.7	CPDTB 固定化ガラス基板の作製	31
2.2.8	PBzMA- <i>b</i> -PNIPAAm ブロック共重合体ブラシおよび PNIPAAm ブラシ表面の作製	32
2.3	回収した各ポリマーおよび作製した各基板の物性評価	33
2.3.1	重合溶液系における高分子の数平均分子量と分子量分布の決定	33
2.3.2	X 線光電子分光(XPS)分析による各ポリマー修飾ガラス基板の評価	34
2.3.3	減衰全反射フーリエ変換赤外分光(ATR/FT-IR)測定による高分子修飾量の分析	34
2.3.4	水中気泡法を用いた静的接触角測定による各ポリマー修飾表面のぬれ性変化	36
2.3.5	各ポリマー修飾基板表面への細胞の接着／脱着挙動の観察	36
2.3.5.1	ウシ頸動脈由来血管内皮細胞(BAEC)の培養	36
2.3.5.2	各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の初期接着／脱着挙動の観察	37
2.3.5.3	各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の接着・増殖挙動の観察	37
2.3.5.4	各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収	38
2.4	結果および考察	39
2.4.1	4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate の ¹ H-NMR 測定による評価	39
2.4.2	重合溶液系における高分子特性解析	40
2.4.2.1	高分子ブラシの分子量	40
2.4.2.2	高分子ブラシの分子量分布	40
2.4.3	XPS 分析による各ポリマー修飾ガラス基板の元素組成の決定	41
2.4.4	ATR/FT-IR 測定を用いた各ポリマーの基板上へのグラフト量の決定	43
2.4.5	水中気泡法を用いた静的接触角法による各ポリマー修飾表面のぬれ性変化の測定	44
2.4.6	各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の初期接着／脱着挙動の観察	47

2.4.7	各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の接着・増殖挙動の評価	51
2.4.8	各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収	53
2.5	結言	56
2.6	参考文献	57
第 3 章	温度応答性高分子ブラシ表面における末端官能基の違いが細胞の接着温度領域に与える影響	60
3.1.	緒言	61
3.2.	実験方法	61
3.2.1.	試薬	61
3.2.2.	使用機器	64
3.2.3.	第一級アミノ基導入ガラス基板の調製	65
3.2.4.	ガラス表面への末端ドデシル型連鎖移動剤の導入	66
3.2.4.1.	末端ドデシル型連鎖移動剤の逆末端の活性エステル化	66
3.2.4.2.	CTA 固定化基板の作製	66
3.2.5.	SI-RAFT 重合による PNIPAAm ブラシ表面の作製	67
3.2.6.	末端マレイミド型 PNIPAAm ブラシ表面の作製	67
3.2.7.	ガラスビーズ上からの PNIPAAm 鎖の切り出し	68
3.2.7.1.	APTES 固定化ガラスビーズの作製	68
3.2.7.2.	CTA 固定化ガラスビーズの作製	68
3.2.7.3.	末端ドデシル型 PNIPAAm グラフトガラスビーズの作製	69
3.2.7.4.	末端マレイミド型 PNIPAAm グラフトガラスビーズの作製	69
3.2.7.5.	PNIPAAm グラフトガラスビーズ上からの PNIPAAm 鎖の切り出し	70
3.3.	回収した PNIPAAm および作製した各基板の物性評価	70
3.3.1.	XPS 分析による各 PNIPAAm 修飾ガラス基板の評価	70
3.3.2.	ATR/FT-IR 測定による PNIPAAm 修飾量の分析	71
3.3.3.	回収したガラスビーズ上の PNIPAAm の数平均分子量と分子量分布の評価 および基板表面上への PNIPAAm のグラフト密度の算出	71

3.3.4.	紫外可視分光光度計による各 PNIPAAm の LCST の評価	71
3.3.5.	水中気泡法を用いた静的接触角法による各 PNIPAAm 修飾表面のぬれ性変化の測定	72
3.3.6.	各 PNIPAAm 修飾基板表面への細胞の接着／脱着挙動の観察	72
3.3.6.1.	各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上への細胞の接着挙動の評価	72
3.3.6.2.	各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上へのフィブロネクチンの吸着性の評価	72
3.3.6.3.	各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上からの細胞の脱着挙動の評価	73
3.3.6.4.	各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収	73
3.4.	結果と考察	74
3.4.1.	XPS 分析による各 PNIPAAm 修飾ガラス基板の評価	74
3.4.2.	ATR/FT-IR 測定を用いた PNIPAAm の基板上へのグラフト量の評価	74
3.4.3.	回収したガラスビーズ上の PNIPAAm の数平均分子量と分子量分布の評価および基板表面上への PNIPAAm のグラフト密度の算出	75
3.4.4.	紫外可視分光光度計による各 PNIPAAm の LCST の評価	76
3.4.5.	水中気泡法を用いた静的接触角法測定による各 PNIPAAm 修飾表面のぬれ性変化	77
3.4.6.	各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上への細胞の接着挙動の評価	79
3.4.7.	各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上へのフィブロネクチンの吸着性の評価	80
3.4.8.	各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上からの細胞の脱着挙動の評価	83
3.4.9.	各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収	85
3.5.	結言	86
3.6.	参考文献	86
	第4章 総括	89
	謝辞	92
	論文リスト	93

学会発表リスト	94
受賞リスト	98

第 1 章

序論

1.1 生体材料に関する研究

近年、生体に関連する分子や細胞などの生体を構成する要素に対して適応する、生体に直接接触させて使用するような、医療・バイオ分野への展開を目的としたさまざまな生体材料“バイオマテリアル”が開発されている。そのため、バイオマテリアルはその用途によって生体適合性を求められている。また、種々の条件に適用するために材料表面の物性であるぬれ性、電荷、形状、硬さといった物理化学的性質を使用する環境・条件に合わせて制御することで、細胞培養技術、医薬・診断薬、生体分子・細胞解析および治療・移植技術などに応用されてきた¹⁾⁴⁾。特に細胞培養技術は進歩したことで種々の目的で用いられており、培養した細胞そのものの製品化、細胞やその表面に産出したタンパク質の分析を行うことで新規医薬品に有効な化合物のスクリーニング、などさまざまな分野で用いられている。また、患者本人から採取した細胞を生体外で再生または細胞機能を向上させてから患者本人に戻す治療といった再生医療に関する研究が注目されている。以上のことから、細胞種や培養条件に対応可能な細胞培養表面が必要とされ、細胞の培養および培養した細胞を回収して再生医療やスクリーニングなどに応用することを目的とした手法の開発やそれらを達成するためのバイオマテリアルの創出に関する研究が行われている。

1.2 再生医療に関する研究

現在、種々の事情により内臓器官が機能不全となった疾患を持つ方に対する医療として、臓器移植、人工臓器または再生医療を用いた治療が行われてきている。他人から必要部位の臓器を提供してもらうことで行う臓器移植(脳死では心臓・肝臓・腎臓・膵臓・肺・眼球、心臓死では腎臓・膵臓・眼球が提供)は、疾患部位に対してドナーから正常な臓器を移植するため、機能の早期回復が期待される。しかしながら、移植を受けた患者の免疫拒絶反応や臓器の提供意思を示すドナーの恒常的な不足(平成26年1月～9月までの提供件数:脳死36件・心臓死15件、移植件数:各部位合計177件、平成26年9月までの移植希望登録者数:各部位合計13,549件、日本臓器移植ネットワークホームページ(<http://www.jotnw.or.jp>: 閲覧日2014年9月30日)より)、脳死判定やドナーに対する負担といった倫理的な問題などを抱えている。また、人工臓器を用いた医療では、血管自体の損傷や経路を変更する際に人

工血管を用いて数十年経過後も体内で機能を保持しているもの、一部の臓器においては臓器移植が行われるまでの代替的な医療として人工臓器が用いられている。しかしながら、人工臓器と生体との接触による生体適合性、人工臓器使用者の一般生活における運用方法といった技術的な問題が依然として残されている。一方、機能不全となった臓器を移植や人工臓器などに置き換えるのではなく患者自身の細胞で再構築させるアプローチを試みている再生医療では、事故や疾患によって機能障害・不全を起こした生体組織・臓器に対して、患者自身の細胞を利用することでその組織を再構築し、治療部位の機能回復を目指すものである。

現在行われている再生医療研究の焦点は大きく分けて 2 つに分別される。1 つは治療に使用するための細胞ソースに関する研究、もう一方は治療段階において培養した細胞を患者の治療部位に対してどのように移植を行うかの技術に重点を置いた研究である。

前者の細胞ソースに関する研究は、人口多能性幹細胞(iPS 細胞)や胚性幹細胞(ES 細胞)といった分化多様性の定義とされる三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)や生殖細胞への分化能を保持した状態で培養下において半永久的に自己複製する幹細胞を用いた研究である。また、さまざまな細胞に分化可能な多分化能をあわせもつ幹細胞を細胞源として用いることで、細胞自体を新たに創出した上で治療を行う研究も行っている^{3),5),6)}。

一方で後者の細胞移植に関する研究は、治療を必要とする目的の臓器に対して培養した細胞をどのように移植するかを創出するための研究である。これまで細胞移植を行う際に用いてきた技術の一つとして、細胞懸濁液を治療が必要な組織部位に直接注入する方法がある。しかし、細胞懸濁液を注入する方法では組織への細胞生着率が低いために効果的な治療として用いることが困難である問題が生じており、実際には骨髄移植といった一部の組織においてのみ有効性が示されているのが現状である⁷⁾。

そのため、生着率の低下といった問題を解決する新たな手法として、Langer と Vacanti らが提唱した組織工学(Tissue Engineering)とよばれる生体内または培養系において、治療部位の組織構造を再生させる手法がある⁸⁾。具体的には、生分解性高分子を用いて移植部位となる組織の形状・性質に合わせて成型を行ったものから構成されるスキャホールドを細胞培養の足場とすることで目的の組織構造を再生する。一方で、細胞の足場材料として用

いた生分解性高分子が分解していく過程で生じる移植部位の炎症反応、心臓もしくは肝臓といった複雑な構造と高い細胞密度を有する臓器再生が困難であるといった問題がいまだに残っている。しかしながら本手法を用いることで、すでに膀胱や軟骨といった組織の再生が可能となってきている。

将来的には、細胞ソースと移植技術に関する研究を融合することで、幹細胞から目的の段階まで分化・培養させた細胞を、組織工学を用いて治療部位の組織構造を再度構築する再生医療を実現することが期待されている。

1.3 細胞シート工学

1.2においてこれまでに行われている再生医療に関する研究について述べた。再生医療はさまざまな手法が提唱されているが、Okanoらは生体外物質などを用いた生分解性高分子による足場材料を使用せずに、細胞から構成されるシート状の組織を治療部位に移植することで組織再生を目的とする「細胞シート工学」を提案した^{9), 10)}。この技術では、作製されるシート状組織“細胞シート”は高い細胞密度を有しており、非侵襲的に回収することに成功している(Figure 1.1)。また、回収した細胞シートは標的組織に貼付するだけという簡便な方法で治療部位に移植が可能なることから、より複雑な構造を有する臓器の構築が期待される。具体的には、従来の細胞の回収方法は代表的な細胞培養皿であるポリスチレン製培養皿(tissue culture polystyrene, TCPS)上で培養を行い、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いて処理をすることで、TCPS上に接着した培養細胞を回収する。しかしながら、このような酵素処理を行った場合、細胞表面の細胞膜上に発現している膜受容体や細胞外マトリックス(ECM)が酵素の影響により分解されてしまう。一方、細胞シートを回収するための基板として温度応答性培養皿と呼ばれる基材が用いられている。温度応答性培養皿表面には温度応答性高分子ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAAm)と呼ばれる温度に応答して親・疎水性を変化させる高分子がグラフトされており、酵素処理を用いることなく温度変化だけで培養細胞を回収することが可能である。また、本手法では基材表面の性質の変化によって一面に培養した細胞をシート状の組織として回収するため、接着した細胞と細胞の底面に存在するECMに

傷害はない¹¹⁾。このように、細胞シート工学は温度応答性培養皿を用いることで、細胞を回収する過程において、トリプシンなど酵素、生分解性高分子による細胞の足場といったスキャホールドを必要としない技術である。現在、温度応答性培養皿は、(株)セルシードによって UpCell™ という商品名で販売されている。

特に近年では、例えば iPS 細胞や ES 細胞といった自己複製能と多分化能をあわせもつ幹細胞のための足場材料、幹細胞の分化誘導をコントロールするための基材および細胞組織の再構築を目的とした細胞シート工学のための基材としての応用が挙げられる。

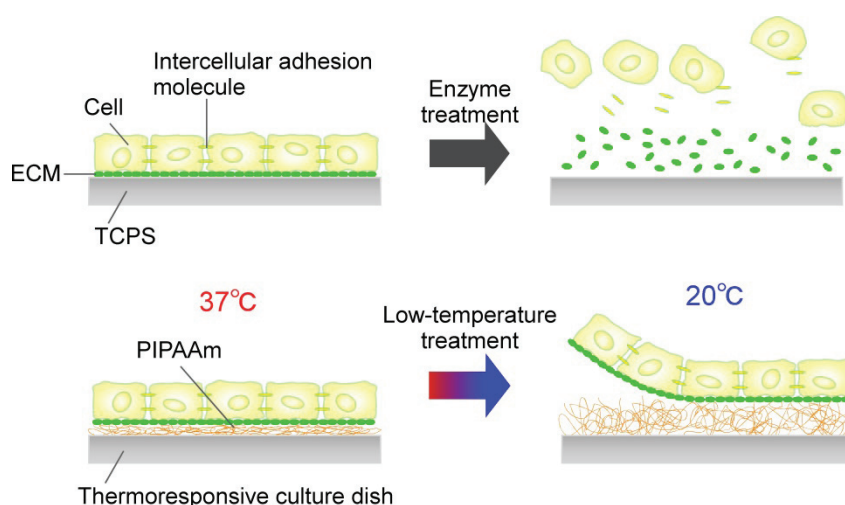


Figure 1.1 Incubated cells are detached from TCPS by different methods. Upside: Culture-cells on TCPS are detached by enzyme treatment. Downside: Adherent cells on thermoresponsive culture dish are harvested by low-temperature treatment.

1.4 温度応答性高分子 PNIPAAm

外部環境に応じて構造を変化させるインテリジェント材料の一つである刺激応答性材料は、界面で起こるさまざまな現象を制御できる可能性が高いと考えられており、次世代型の材料として注目されている。ここで、刺激応答性材料とは温度や pH となどの外部刺激によって、材料の親・疎水性といった性質や形状を変化する、分子を認識することによって機能を発現する材料とされている¹²⁾⁻¹⁴⁾。特に外部環境の変化に応答することでエネルギー的に安定状態となる構造に可逆的に変化する刺激応答性高分子が存在する。刺激応答性高分子の例として、通常、高分子を溶媒へ溶解・分散させる場合、溶質の溶媒に対する溶

解度は温度を上げることで向上する。しかし、ポリ(*N*-アルキル置換アクリルアミド)やメチルセルロース、ポリエーテルなどといった一部の高分子では、温度の低下によって溶解度が増加し、温度の上昇にともない溶解度が減少する可逆的な現象を示すことが知られている。この現象を起こす温度を下限臨界溶液温度(LCST)と呼ぶ¹⁵⁾。

刺激応答性高分子の一つとして、温度応答性高分子 PNIPAAm というポリマーがあり、水中で約 32°C に LCST を示す代表的な温度応答性の高分子である(Figure 1.2)¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。PNIPAAm は細胞シート工学で使用する温度応答性培養皿に用いられており、この高分子は LCST を境として、低温側では高分子鎖が水和・伸長し水溶性を示すのに対して、高温側では脱水和・凝集し水不溶性を示す。これは低温側では、水分子が親水性のアミド基と水和しているだけでなく、水分子同士が水素結合してかご状構造となりイソプロピル基の周囲を覆い、みかけ上親水性となる「疎水性水和」を形成するためである。これにより、ポリマー鎖が水和したことで、水溶性を示す。これに対して、LCST より高温に温度を上昇させると、イソプロピル基の周囲を覆って水和していた水分子のエントロピーが増大することとなり、疎水性水和構造が崩壊する。そのため、主鎖のアルキル鎖とイソプロピル基が疎水性相互作用により、ポリマー鎖が凝集することで水不溶性となる。PNIPAAm は他の温度応答性高分子と比較して、温度応答性、可逆性、再現性、およびきわめて狭い温度範囲(31~33°C 付近)で相転移挙動を示すことから、温度変化で特性を変化させるインテリジェント材料の開発分野で応用されている。

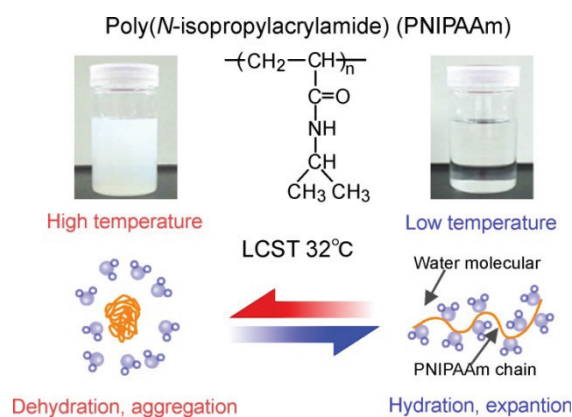


Figure 1.2 Conformational alterations of PNIPAAm and soluble-insoluble changes in an aqueous medium by change of temperature.

1.5 温度応答性高分子修飾表面

1.5.1 温度応答性培養皿に対する細胞の接着・増殖 / 脱着挙動の解析

温度応答性培養皿上の 37°C における細胞の接着・増殖挙動は、TCPS と比較して同等であることが報告されている^{10), 11)}。一方、温度応答性培養皿上で細胞を培養し、LCST 以下の温度にディッシュを静置することで、非侵襲的に基板上に接着した細胞を脱着できる。これは、低温に静置したことで温度応答性培養皿表面に修飾されている PNIPAAm 鎖が水和・伸長したことにもなう性質の変化が起因するものである^{11), 19)-21)}。また、細胞培養基板において細胞の接着性に対して表面ぬれ性が大きく寄与することは知られており、基板表面における細胞の接着・増殖には適度な疎水性が必要である²²⁾。そのため、温度応答性細胞培養皿を 37°C に静置することで基板表面の PNIPAAm 鎖は脱水和・凝集することで疎水性の性質を示すため、細胞は接着・増殖することが可能となる。これに対して培養温度を PNIPAAm の LCST 以下となる 20°C まで低下させると、基板表面の PNIPAAm 鎖が水和することで伸長するため、親水性を示す基板表面上では細胞の接着性が低下する²²⁾。一方、基板表面に対する細胞の相互作用という面では、表面に対して細胞が相互作用しない「非吸着」、表面に対して細胞が物理化学的(疎水性相互作用、クーロン力、ファンデルワールス力など)に接着する「受動的粘着」、細胞が表面の形態変化をともなう「能動的粘着」に分類される(Figure 1.3)。このとき、「能動的粘着」はエネルギー代謝をともなう細胞内シグナル伝達や細胞骨格の再構成などが生じることから、アデノシン三リン酸(ATP)が必要となる。そのため、これまでに示してきた温度応答性培養皿における低温処理にともなう細胞の脱着過程は、能動的な挙動であることが明らかとなっている²²⁻²⁴⁾。

また、温度応答性培養皿を用いた温度変化による細胞の回収方法は、これまでの酵素処理などの方法と比較して優れており、細胞の機能を維持したままであるという知見が得られている。例えば、肝細胞に対して酵素処理を行った場合、肝細胞はタンパク分解酵素に対して感受性が高いとされており、従来の酵素処理では細胞と材料間に形成された ECM、細胞同士の細胞間接着も破壊されてしまうため、非可逆的な細胞障害が起きる。一方で、温度応答性培養皿を用いた肝細胞の回収は、低温処理によって回収するため細胞障害が起こることなく、継代培養を行うことが可能であることが報告され、アルブミン産生能とい

った機能も維持した状態であった⁹⁾。

また、4°C 程度の低温下において1~6時間程度静置した場合、細胞に対するアポトーシスの誘導がされることが知られている。しかしながら、温度応答性培養皿上の細胞に対する低温処理を用いた細胞回収法では、20°C の培養装置内で数分から長い場合でも1~2時間程度の静置のため、アポトーシスは生じないということが確認されている²⁵⁾。

よって、温度応答性培養皿を用いた細胞培養は TCPS と同等であり、低温処理によって細胞を回収することで、生物学的機能を維持したままであるといえる。

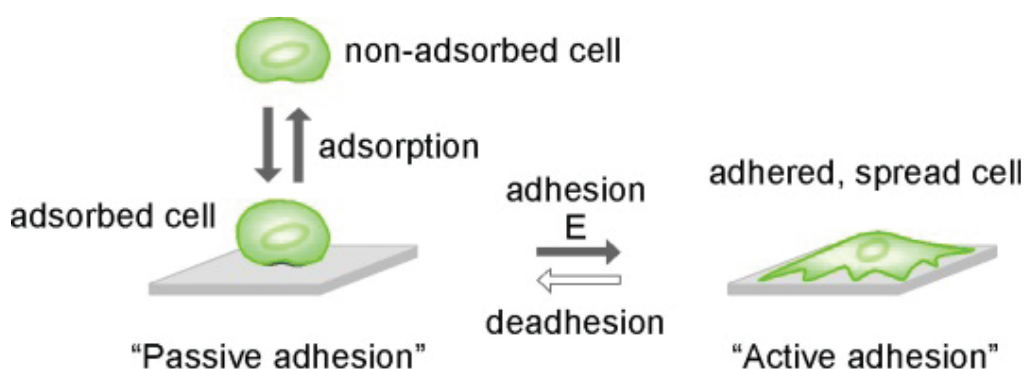


Figure 1.3 Schematic illustrations for possible interactions of cell-culture surfaces with cells²¹⁾. Their proposed reverse process “deadhesion”.

1.5.2 電子線重合による PNIPAAm 修飾表面の構築

市販されている温度応答性培養皿の作製方法として電子線重合を用いた方法がある。具体的には、IPAAm モノマー溶液を市販されている TCPS 上に展開し、電子線照射を行うことで培養皿表面が活性化される。そうすることで、ポリスチレン主鎖から発生するラジカルを開始点とした IPAAm のグラフト重合により、PNIPAAm が共有結合的に三次元的な架橋構造で表面に修飾された温度応答性培養皿が構築される^{10), 11)}。

Akiyama らは電子線重合法を用いて、PNIPAAm を市販の TCPS 上に被覆させることで、三次元架橋構造を有する温度応答性培養皿を作製した²⁶⁾。修飾された PNIPAAm は、層厚み 15.5 nm (PNIPAAm-1.4)、29.3 nm (PNIPAAm-2.9)の PNIPAAm 薄膜表面、および、5 μm の厚みを有する PNIPAAm ゲルが固定された表面(PNIPAAm-50)となった。これらの基板に対

して接触角測定を用いた温度変化に対するぬれ性の変化、温度変化による細胞の接着・脱着の挙動について議論した。表面の静的接触角測定より、PNIPAAm-1.4 < PNIPAAm-2.9 < PNIPAAm-50 となり、膜厚が厚くなるにつれて親水性が高くなることが明らかとなった。この結果から PNIPAAm 層厚みを制御することで表面ぬれ性の変化が観察され、表面上における細胞の接着・脱着の挙動に対して影響を与えることが示された。各基板に対して細胞の接着挙動について検討した結果、PNIPAAm 層の厚みが 20 nm 程度となっている PNIPAAm-1.4 の場合にのみ観察され、PNIPAAm-2.9、PNIPAAm-50 では細胞の接着は認められなかった(Figure 1.4)。

これらの結果より、細胞の接着・脱着挙動に対して温度応答性培養皿には最適な PNIPAAm 層の厚みが存在することが示唆された。これは PNIPAAm を修飾したポリスチレンは疎水性が高く、その基材表面近傍とバルク水に近い部分では LCST 以下において低温時の PNIPAAm 鎖の水和状態が異なる状態で存在するためであると考えられる。すなわち下地となっているポリスチレン基板は高い疎水性を示し、グラフトされた PNIPAAm 鎖と疎水性相互作用をする。その際に、グラフト厚みが増加することで PNIPAAm の上層の部位は基板との距離が離れるため、ポリスチレン基板が示す高い疎水性の影響が小さくなることが考えられている。その結果、PNIPAAm 層の膜厚が大きいものほど基板との距離が大きくなることから最表面の PNIPAAm 鎖の自由度が増大するため、十分な水和状態となることで基板表面の親水性が高くなったものと考察されている。そのため、細胞の接着挙動において PNIPAAm-2.9、PNIPAAm-50 では上層の PNIPAAm 鎖が水和状態となり、細胞が基板上に接着しなかった。現在では、基板上にグラフトする PNIPAAm の鎖長制御は、温度変化にともなう表面上における細胞の接着・脱着挙動の重要な因子であると考えられている。

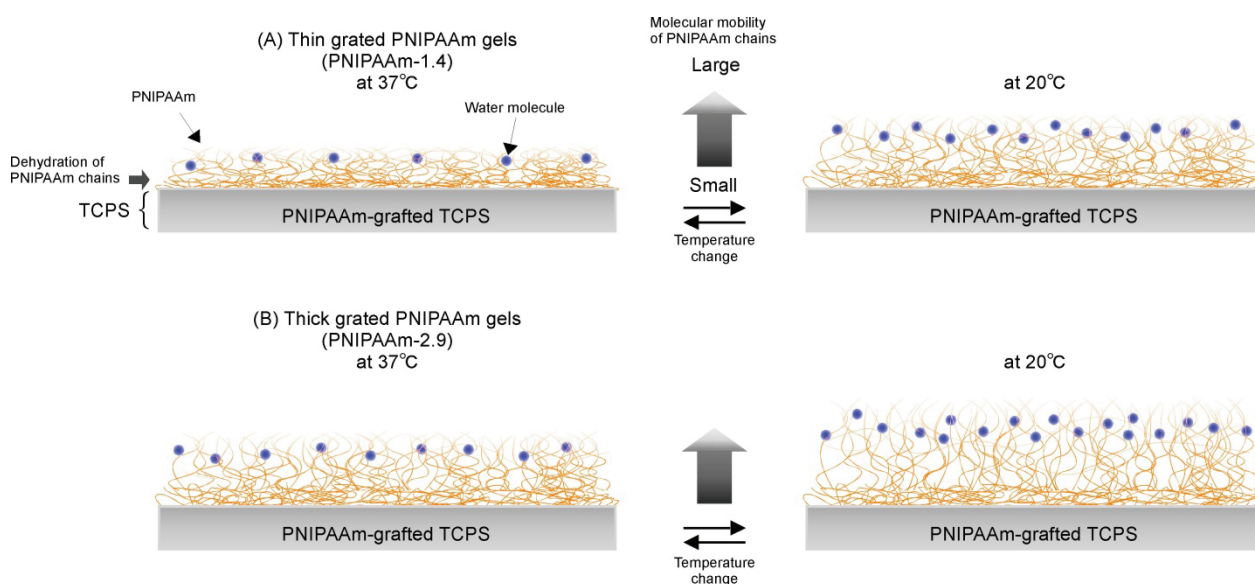


Figure. 1.4 Schematic illustration of the effect of molecular mobility of grafted PNIPAAm gels on hydration of the polymer chains, when the PNIPAAms are (A) thin and (B) thick at 37°C (left side) and 20°C (right side), respectively. Hydrophobic TCPS interfaces stimulating aggregation and dehydration were indicated as orange region. Molecular motion of the grafted PNIPAAm gels becomes larger in accordance to the distance away from TCPS interfaces ²⁶⁾.

1.5.3 温度応答性高分子ブラシ表面の構築

1.5.3.1 リビングラジカル重合

リビングラジカル重合(LRP)において原子移動ラジカル重合(atom transfer radical polymerization, ATRP)²⁷⁻²⁸⁾や可逆的付加-開裂連鎖移動型(Reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT)ラジカル重合²⁸⁻³²⁾などは、従来のラジカル重合における分子量制御が困難であるといった問題点を克服する重合法として用いられており、近年のバイオマテリアル分野やナノテクノロジー分野など多くの分野において応用されている。

ATRP におけるラジカル生成は、ハロゲン原子および遷移金属コンプレックス(M_i^n-Y / Ligand)によって可逆的に引き起こされる一電子酸化反応である。それによって従来のラジカル重合と同様にラジカルを介したモノマー付加によってポリマー鎖の生長反応が起こる。

ATRP において、生長末端ラジカルとハロゲン原子が再結合することでラジカルが一時的に不活性化した場合、停止反応が起こる。この可逆的なラジカル不活性を反応系において支配的に制御することによって停止反応に対する寄与を低下させることが可能となる。そのため、ATRP は可逆的となるラジカル不活性化反応において、見かけのポリマー生長反応速度が遅くなるため、反応溶液中のポリマー鎖の生長がほぼ均一となる。

本研究で使用する RAFT 重合は、ジチオエステルあるいはトリチオカーボネート構造をもつ連鎖移動剤(Chain transfer agent, CTA)を反応溶液中に添加することで、分子量制御された合成高分子を調製することが可能となる(Figure 1.5)。

- ① 開始剤から発生するラジカル($I\cdot$)はモノマーと反応し、ラジカルを生長末端に有することでポリマー($P_n\cdot$)の伸長反応が進行する。
- ② 伸長反応中における CTA[$S=C(Z)S-R$]は、ラジカル($P_n\cdot$)を有するポリマーと反応することで[$P_n-S-C(Z)S-R$]となり、それと同時に新たなラジカル種($R\cdot$)を遊離する。その結果、CTA と反応したポリマー[$S=C(Z)S-P_n$]は安定した構造となり、ポリマーの伸長反応は一時的に停止する。
- ③ (2)でポリマーから遊離したラジカル種($R\cdot$)は、別のモノマーと反応することで新たな伸長反応を開始する($P_m\cdot$)。
- ④ (2)~(3)に示すような伸長ポリマー間($P_n\cdot$ および $P_m\cdot$)においてラジカル移動が平衡反応として常に進行する。この平衡状態によって、重合における停止反応は極めて少なく、ポリマーは安定して生長する。その結果、ポリマーの分子量が制御されることで分子量分布の狭いポリマー鎖を得ることが可能となる。

また、RAFT 重合で合成した高分子の生長末端には CTA 由来の官能基が存在することから、高分子を CTA と見立てたマクロ CTA として用いることで、異なるモノマーを破囊させることでブロックコポリマーを容易に合成することが可能である。さらに、末端官能基を除去する、または性質が異なる他の官能基に置換することも容易とされ、種々の高分子を得ることができる。

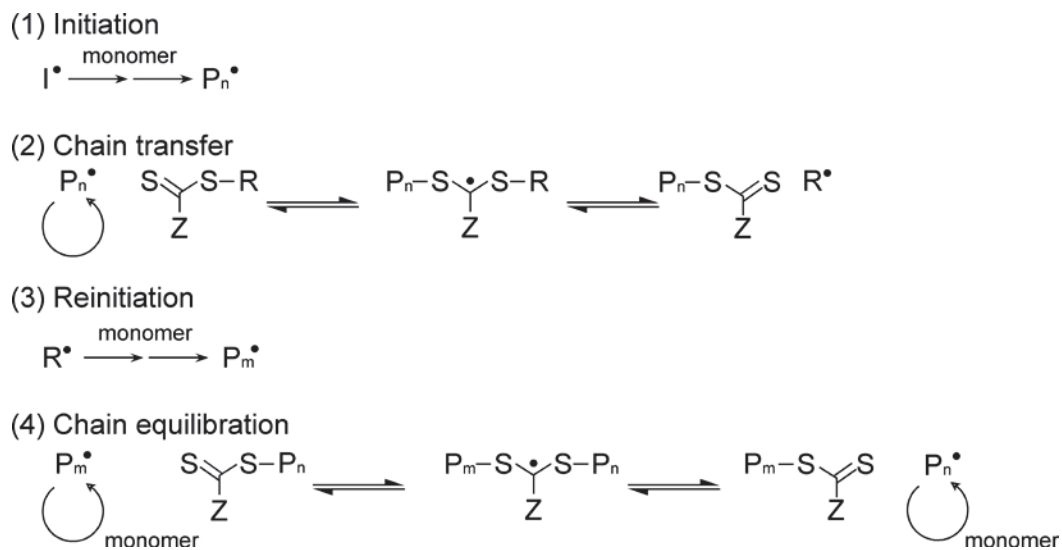


Figure 1.5 RAFT polymerization mechanism²⁸⁻³⁰.

1.5.3.2 “grafting to”または“grafting from”法による高分子ブラシ表面の作製

バイオマテリアルの界面において刺激応答性高分子の存在は大きく、特に表面上にポリマー鎖として導入した材料と生体組織との界面は刺激応答による on-off スwitchングによって機能を発揮する。この基板表面上にポリマー鎖を導入する上で、形成方法はグラフト密度に影響を与える。形成方法の一つに化学的に導入する方法があり、共有結合的に既成の高分子と表面の官能基との反応による “grafting to” 法と、表面に化学的に固定された重合開始剤からの重合反応による “grafting from” 法(表面開始グラフト重合)がある³³)。共有結合を介して製作した化学膜は、溶剤中やガラス転移温度以上でも安定である。

“grafting to” 法と “grafting from” 法を比較した場合、修飾される高分子のグラフト密度が大きく異なる。“grafting to” 法の場合、事前に既知の構成成分の高分子を表面に導入することができる(Figure 1.6)。しかし、反応が進むに連れて材料表面の修飾される高分子濃度が上昇することから、既に固定された高分子鎖の排除体積効果に基づく立体障害により、新たな高分子が表面官能基まで到達できなくなり、高い密度で高分子を修飾することはきわめて困難となる。この現象は修飾する高分子の分子鎖長が長くなるに連れて、顕著となる。これに対して、“grafting from” 法による高分子修飾表面では、材料表面に重合開始剤

を化学結合的に固定することから、開始剤が高分子の重合の開始点となるため、重合初期において高分子鎖間の立体障害が起こらず、高密度な高分子の修飾が可能となり、導入された高分子鎖のキャラクタリゼーションには煩雑な操作がともなう。

“grafting to”法により作製した場合、高分子鎖の修飾密度は低くなるため、両溶媒中でマッシュルーム形態(<0.01 chains/nm²)となることが知られている。一方、“grafting from”法で作製した場合、修飾される高分子鎖のグラフト密度は高くなるため、隣接する高分子鎖同士の相互作用を最小限にするために高分子のエントロピーが減少して形態が制限され、高分子鎖は表面から垂直方向に延伸された形態をとる。このような高伸長した形態を示す高分子修飾表面は“ポリマーブラシ” (>0.1 chains/nm²)と呼ばれる³⁴⁾。

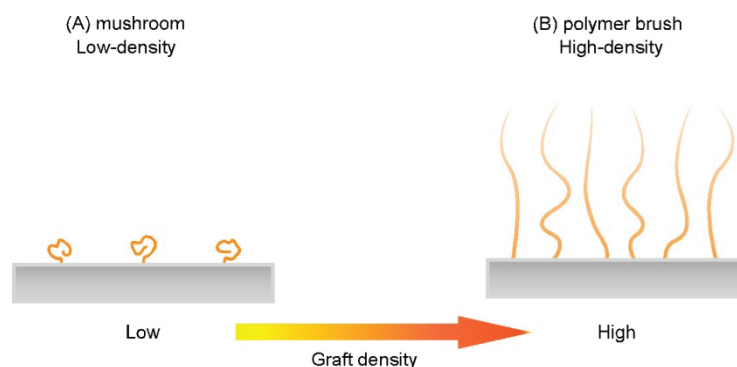


Figure 1.6 Schematic illustration of grafted polymer density and polymer chains³³⁾. Left: <0.1 chains/nm², right: >0.1 chains/nm².

1.5.3.3 表面開始-原子移動ラジカル重合を用いた PNIPAAm ブラシ修飾表面

Idota らは LRP のひとつである SI-ATRP 法によって重合を行い、PNIPAAm をガラス基板表面上に固定化した基板を作製している³⁵⁾。本手法は、反応時間により基板上にグラフトされる PNIPAAm の鎖長を制御することが可能であり、異なるグラフト鎖長に依存した表面ぬれ性が変化することを報告している。

一方、Nagase および Watanabe らはガラス基板表面への重合開始剤の導入時に、重合開始剤と非重合開始剤を 100 : 0、25 : 75 として導入する割合を変化させることで、異なる修飾密度を有する PNIPAAm ブラシ表面を ATRP によって作製している³⁶⁾。さらに、重合溶液中の NIPAAm 濃度を 0.25 mol/L または 0.50 mol/L とすることで、異なる開始剤の修飾密度

を有する基板において、それぞれ NIPAAm の濃度によって PNIPAAm のグラフト量の異なる基板を作製できることを示した。作製した各基板上で細胞を培養すると、0.25 mol/L で作製した各基板では開始剤の修飾密度に関わらずほぼ同等の細胞が接着したが、0.50 mol/L で開始剤の割合を 100 として作製した基板では全く細胞が接着しなかった。これは 0.50 mol/L で作製した PNIPAAm ブラシ表面と重合開始剤のみが修飾された基板を比較して表面ぬれ性が、37°C では $\cos\theta$: 0.12 \pm 0.02 だったのが、重合後では $\cos\theta$: 0.49 \pm 0.07 になっており、また 0.25 mol/L で重合したものと比較して修飾している PNIPAAm の鎖長が長くなっていると考えられるため、NIPAAm 濃度 0.50 mol/L および開始剤割合 100 の基板では細胞の接着が抑制されたと考察している。以上の結果から、PNIPAAm ブラシ表面において、細胞の接着性は PNIPAAm のグラフト量および表面ぬれ性が重要な因子であると考えられる。

1.5.3.4 表面開始-可逆的付加-開裂連鎖移動型ラジカル重合を用いた PNIPAAm ブラシ修飾表面

LRP の一つである RAFT 重合は、重合操作が簡便であり、また、さまざまなモノマーや重合条件を適用可能なため注目されている。RAFT 重合では CTA としてジチオエステル²⁸⁾、³¹⁾あるいはトリチオカーボネート化合物³¹⁾が用いられ、ラジカル種が連鎖移動反応によって可逆的に付加-開裂を繰り返すことから、見かけ上重合がリビング的に進行することになる。その結果、合成される高分子鎖の分子量が制御されることになる。その他の RAFT 重合の利点として、重合される高分子鎖の生長末端には CTA 由来の官能基が導入される。その結果、RAFT 重合によって作製したポリマーはマクロ CTA として機能することで、多段階重合を行うことで容易にブロックコポリマーを調製することが可能である³⁷⁾。また、CTA 由来の末端官能基は、還元反応を通して容易に反応性の高いチオール基に置換できる。そのため、チオール基を介することで種々の機能性官能基の導入が可能である³⁸⁾。

Takahashi らは LRP の一つである SI-RAFT 重合を用いて、ガラス基板表面上に対して PNIPAAm を固定化した基板を作製している³⁹⁾。本手法では重合を行う際に、反応溶液中に導入する CTA 濃度を 0.25、0.50、1.0 mM と変化させることで、基板表面に修飾される

PNIPAAm のグラフト量が CTA 濃度の減少に応じて増加することが示された。また、基板表面に対するシラン処理において、開始剤固定化密度を制御するために、アミノ基含有シラン剤とアミノ基を有さない不活性のシラン剤の割合を調節して反応することで、アゾ系重合開始剤とシラン処理基板の反応においてその固定化密度を制御した。この手法によって、グラフトされる PNIPAAm 鎖の修飾密度は導入したシラン剤の割合によって変化することが示されており、作製した各基板上における細胞の接着・脱着挙動について検討している。アミノ基含有シラン剤の割合を 100%としてシラン処理した基板を用いて開始剤を固定化した基板に対し、CTA 濃度を 0.25 mM として重合したものは最も細胞の接着性が抑制されたが、細胞の脱着性は最も優れていた。また、異なる PNIPAAm のグラフト密度を有する基板を比較した場合、すべての CTA 濃度においてグラフト密度が上昇するにつれて細胞の接着性が抑制される傾向にあるが、一方で脱着性は促進する傾向が得られた。この結果は、細胞シート回収においても PNIPAAm の鎖長およびグラフト密度が上昇するに連れて剥離速度が促進され、PNIPAAm のグラフト量とグラフト密度が細胞の接着および脱着性に対して重要な因子となる。

以上の結果から SI-RAFT 重合によって作製した PNIPAAm ブラシ表面において、細胞シートの回収が可能であることが示された。

1.6 研究概要

「細胞シート工学」は、細胞を非侵襲的にシート状の組織“細胞シート”として回収することが可能であり、日本発の再生医療支援技術として注目されている。細胞シートによる再生医療は、移植後の拒絶反応や移植における臓器ドナー不足などの諸問題を解消可能な治療法として期待されている。細胞シートの作製において、温度応答性高分子 PNIPAAm を修飾した温度応答性培養皿は電子線照射法を用いて超薄膜状に PNIPAAm を表面上に化学固定する。しかしながら、電子線照射による作製法では PNIPAAm を基板上にグラフトすることは簡便であるが、架橋構造で PNIPAAm が重合されることから、化学構造を精密に制御することは困難である。そのため、基板上における細胞の接着・脱着挙動に対して PNIPAAm 鎖の分子構造が与える影響は明確ではないことから、細胞種によっては細胞の接

着・増殖・脱着が困難などの解決すべき点がある。そのため分子構造が細胞の接着・脱着挙動に与える影響を明確にすることができれば、細胞シートを用いた再生医療に対して大きく貢献できると考えられる。

本研究では、表面開始可逆的付加-開裂連鎖移動型 (Surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT) ラジカル重合を用いてガラス基板表面上にグラフトした高分子鎖の生長末端に存在する連鎖移動剤(CTA)由来の末端官能基によってブロック共重合体ブラシ構造、親・疎水性の官能基の導入といった末端官能基を利用した温度応答性培養表面の高分子ブラシ構造の分子設計について検討することを目的とした。また、各章において作製した基板に対して一つの細胞種を用いて細胞の接着・脱着挙動および細胞シートの回収に関する実験を行い、PNIPAAm 鎖の分子構造が与える影響を明確にすることで、PNIPAAm グラフト表面の機能化を目指した。

第 2 章ではガラス基板表面上に温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面を構築し、PNIPAAm 単層の基板と比較することで、異種のポリマー層が基板の物性および細胞の接着・脱着挙動に与える効果についての検討を目的とした。具体的には重合一段回目において下層に疎水性高分子 poly(benzyl methacrylate) (PBzMA)を導入し、重合二段階目で上層に温度応答性高分子 PNIPAAm を導入する。このとき、ガラス基板上にグラフトした PBzMA 鎖の生長末端には、CTA 由来の末端官能基が存在しており、再度重合を行うことで PNIPAAm を PBzMA の末端からグラフトすることができる。そうすることで、作製した各基板に対して物性評価を行い、細胞の接着・脱着挙動および細胞シートの回収を行うことで、PNIPAAm 単層の基板と比較して下層に導入した PBzMA 層が与える影響について検討した。

第 3 章では PNIPAAm 鎖の末端に導入される CTA 由来の末端官能基の親・疎水性を変化させることで、末端官能基の親・疎水性の違いが基板の物性および細胞の接着・脱着挙動に与える影響について検討することを目的とした。具体的には、末端官能基の親・疎水性の違いは PNIPAAm の LCST に影響を与えることが報告されており、疎水性官能基では PNIPAAm 鎖の LCST が低温側に、親水性官能基では高温側にシフトする⁴⁰⁾⁴⁵⁾。また、基板上にグラフトされた PNIPAAm 鎖は基板表面上に片末端が固定化されていることから、

多点で固定化されている架橋構造の PNIPAAm よりも自由度が高いため、相転移温度は水溶液中の PNIPAAm の LCST に対応していることが報告されている³⁵⁾。そのため、本研究ではこの末端官能基の親・疎水性の違いが基板表面上の PNIPAAm の LCST に与える影響について、基板表面の物性評価や末端官能基の違いが温度変化にともなう細胞の接着・脱着挙動に与える影響について評価・検討を行った。

以上より、導入する異種のポリマー層および PNIPAAm 鎖における末端官能基の親・疎水性の選択といった高分子ブラシ構造の分子設計を行うことで、選択した構造によって得られる基板の特性も選択の幅が広がったことから、基板上の分子設計に対してグラフトされるポリマー鎖の鎖長や密度の制御に加えて新たな設計の指針を見い出した。

1.7 参考文献

- 1) 岩田博夫 (2005). バイオマテリアル 共立出版 (東京) pp.1-45.
- 2) 石原一彦, 畑中研一, 山岡哲二, 大矢裕一 (2003). バイオマテリアルサイエンス 東京化学同人 (東京) pp. 80-197.
- 3) 日本バイオマテリアル学会 (2010). バイオマテリアルの基礎 日本医学館 (東京) pp.6-10, 60-63, 104-248.
- 4) Smela, E., 2003. Conjugated polymer actuators for biomedical applications, *Adv. Mater.*, **15**, 481-494.
- 5) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohunuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861-872.
- 6) Thomason, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145-1147.
- 7) Bellum, A. L., Epstein, J. B., Rose-Ped, A., Martin, P., Fuchs, J. H., 2000. Patient reports of complications of bone marrow transplantation, *Supportive Care in Cancer*, **8**, 33-39.
- 8) Langer, R., Vacanti, P. J., 1993. Tissue engineering, *Science*, **260**, 920-926.

- 9) Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., Sakurai, Y., 1990. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **11**, 571-576.
- 10) Okano, T., Yamada, N., Sakai, H., Sakurai, Y., 1993. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide), *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243-1251.
- 11) Kikuchi, A., Okuhara, M., Karikusa, F., Sakurai, Y., Okano, T., 1998. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted surfaces, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 1331-1348.
- 12) Cole, A. M., Voelcker, H. N., Thissen, H., Griesser, J. H., 2009. Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions. *Biomaterials*, **30**, 1827-1850.
- 13) Becker, K., Hallgren, E., Carredano, E., Palmgren, R., Bülow, L., 2009. Characterization of multimodal hydrophobic interaction chromatography media useful for isolation of green fluorescent proteins with small structural differences. *J. Mol. Recognit.* **22**, 104-109.
- 14) Katz, S. J., Burdick, A. J., 2010. Light-responsive biomaterials: development and applications. *Macromol. Biosci.*, **10**, 339-348.
- 15) Taylor, L. D., Cerankowski, L. D., 1975. Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions-a study of lower consolute behavior, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **13**, 2551-2570.
- 16) Heskins, M., Guillet, J. E., James, E., 1968. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide), *J. Macromol. Sci. Chem. A*, **2**, 1441-1445.
- 17) Bae, Y. H., Okano, T., Kim, S.W., 1990. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(*N,N*-alkyl substituted acrylamide) in water, *J. Polym. Sci. Part B, Polym. Phys.*, **28**, 923-936.
- 18) Okano, T., 1998. *Biorelated Polymers and Gels*, Academic Press (Place), pp. 1-23.
- 19) Kushida, A., Yamato, M., Konno, C., Kikuchi, A., Sakurai, Y., Okano, T., 1999. Decrease in

- culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 355-362.
- 20) Takei, Y. G., Aoki, T., Sanui, K., Ogata, N., Sakurai, Y., Okano, T., 1994. Dynamic contact angle measurement of temperature-responsive surface properties for poly(*N*-isopropylacrylamide) grafted surfaces, *Macromolecules*, **27**, 6163-6166.
- 21) Kikuchi, A., Okano, T., 2005. Nanostructure designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs, *J. Control. Rel.*, **101**, 69-84.
- 22) Tamada, Y., Ikada, Y., 1994. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 783-789.
- 23) Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H., Sakurai, Y., 1995, Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials*, **16**, 297-303.
- 24) Yamato, M., Okuhara, M., Karikusa, F., Kikuchi, A., Sakurai, Y., Okano, T., 1999. Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a temperatureresponsive polymer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 44-52.
- 25) Kushida, A., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T., 2001. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: The noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 37-46.
- 26) Akiyama, Y., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T., 2004. Ultrathin poly(*N*-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control, *Langmuir*, **20**, 5506-5511.
- 27) Matyjaszewski, K., Xia, J., 2001. Atom transfer radical polymerization, *Chem. Rev.*, **101**, 2921-2990.
- 28) Matyjaszewski, K., 2000. *Controlled / Living Radical Polymerization Progress in ATRP, NMP, and RAFT*, *ACS Symposium Series* (Washington, D. C.), **768**, pp. 278-311.
- 29) Mayadunne, A. T. R., Rizzardo, E., Chiefari, J., Chong, K. Y., Moad, G., Thang, H. S., 1999.

- Living radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT polymerization) using dithiocarbamates as chain transfer agents, *Macromolecules*, **32**, 6977-6980.
- 30) Yusa, S., Shimada, Y., Mitsukami, Y., Yamamoto, T., Morishima, Y., 2003. pH-Responsive micellization of amphiphilic diblock copolymers synthesized via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, *Macromolecules*, **36**, 4208-4215.
- 31) Boyer, C., Bulmus, V., Davis, P. T., Ladmiral, V., Liu, J., Perrier, S., 2009. Bioapplications of RAFT Polymerization, *Chem. Rev.*, 109, 5402-5436.
- 32) Chong, Y. K., Le, T., Rizzardo, E., Thang, S. H., 1999. A more versatile route to block copolymers and other polymers of complex architecture by living radical polymerization: the RAFT process, *Macromolecules*, **32**, 2071-2074.
- 33) Advincula, C. R., Brittain, J. W., Caster, C. K., R uhe, 2004. J., *Polymer Brushes*, Wiley-VCH (Place), pp. 1-48.
- 34) Yamamoto, S., Ejaz, M., Tsujii, Y., Matsumoto, M., Fukuda, T., 2000. Surface interaction forces of well-defined, high-density polymer brushes studied by atomic microscopy. 2. Effect of graft density, *Macromolecules*, **33**, 5608-5612.
- 35) Idota, N., Kikuchi, A., Kobayashi, J., Akiyama, Y., Sakai, K., Okano, T., 2006. Thermal modulated interaction of aqueous steroids using polymer-grafted capillaries, *Langmuir*, **22**, 425-430.
- 36) Nagase, K., Watanabe, M., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T., 2011. Thermo-responsive Polymer brushes as intelligent biointerfaces: preparation via ATRP and characterization, *Macromol. Biosci.*, **11**, 400-409.
- 37) Chong, K. Y., Le, T. P. T., Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S., 1999. A more versatile route to block copolymers and other polymers of complex architecture by living radical polymerization: The RAFT process, *Macromolecules*, **32**, 2071-2074.
- 38) Nakayama, M., Okano, T., 2005. Polymer terminal group effects on properties of thermoresponsive polymeric micelles with controlled outer-shell chain lengths,

Biomacromolecules, **6**, 2320-2327.

- 39) Takahashi, H., Nakayama, M., Yamato, M., Okano, T., 2010. Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest, *Biomacromolecules*, **11**, 1991-1999.
- 40) Xia, Y., Burke, A. D. N., Stöver, D. H. H. 2006. End Group Effect on the Thermal Response of Narrow-Disperse Poly(*N*-isopropylacrylamide) Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization, *Macromolecules*, **39**, 2275-2283.
- 41) Duan, Q., Miura, Y., Narumi, A., Shen, X., Sato, S., Satoh, T., Kakuchi, T. 2005. Synthesis and Thermoresponsive Property of End-Functionalized Poly(*N*-isopropylacrylamide) with Pyrenyl Group, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **44**, 1117-1124.
- 42) Kujawa, P., Segui, F., Shaban, S., Diab, C., Okada, Y., Tanaka, F., Winnik, M. F. 2006. Impact of End-Group Association and Main-Chain Hydration on the Thermosensitive Properties of Hydrophobically Modified Telechelic Poly(*N*-isopropylacrylamide) in Water, *Macromolecules*, **39**, 341-348.
- 43) Kujawa, P., Tanaka, F., Winnik, M. F. 2006. Temperature-Dependent Properties of Telechelic Hydrophobically Modified Poly(*N*-isopropylacrylamide) in Water: Evidence from Light Scattering and Fluorescence Spectroscopy for the Formation of Stable Mesoglobules at Elevated Temperatures, *Macromolecules*, **39**, 3048-3055.
- 44) Chung, J. E., Yokoyama, M., Suzuki, K., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T. 1997. Reversibly thermo-responsive alkyl-terminated poly(*N*-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **9**, 37-48.
- 45) Furyk, S., Zhang, Y., Ortiz-acosta, D., Cremer, S. P., Bergbreiter, E. D. 2006. Effects of End Group Polarity and Molecular Weight on the Lower Critical Solution Temperature of Poly(*N*-isopropylacrylamide), *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **44**, 1492-1501.

第2章

温度応答性ブロック共重合体ブラシ構造が
細胞の接着・脱着挙動に与える影響

2.1 緒言

近年、温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) を約 20 nm という超薄膜状態で基板表面に共有結合的に固定化した温度応答性細胞培養皿が開発され、下限臨界溶液温度(LCST)32°C を境として温度変化によって表面の親・疎水性を制御する技術が確立した¹⁾。この表面上で細胞をコンフルエントになるまで培養後、LCST 以下の低温に静置するだけで細胞外マトリクス(ECM)を維持した状態で一面に増殖した細胞を単層組織である“細胞シート”として非侵襲的に回収することに成功している¹⁾。しかし、この方法では培養皿上にグラフトされた表面高分子層における PNIPAAm の鎖長・密度・化学構造を精密に制御する、温度変化にともなう細胞の接着・増殖および脱着挙動に対して架橋構造という複雑な構造でグラフトされた PNIPAAm がどのように影響するかを議論することは困難であった。そこで本章で基板の作製方法として、表面開始可逆的付加-開裂連鎖移動型 (Surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer: SI-RAFT) ラジカル重合という手法に着目した²⁾。本手法では開始剤を基板上に固定化することでラジカル開始点として用い、基材上にポリマーが共有結合的に結合するため、ポリマーをブラシ状の構造で高密度に修飾することができる²⁾。また、作製した基板の高分子ブラシ末端には連鎖移動剤 (CTA)由来の末端官能基を有することから、一つの基板に対して多段階の重合を行うことで、PNIPAAm 以外の高分子層を有するブロック共重合体ブラシ構造を作製することが可能であると考えられる。そのため、PNIPAAm ブラシ表面ではポリマー鎖の鎖長とその修飾密度が細胞の接着・脱着挙動に影響を与える因子だったが、ブロック共重合体ブラシ構造にすることで鎖長や密度の他に PNIPAAm 層以外の異種の高分子層が細胞の接着・脱着挙動に影響を及ぼす制御因子として用いることが期待される。

第2章では、ガラス基板上に温度応答性ブロック共重合体ブラシ構造を構築することで、異種のポリマー層が細胞の接着・増殖および細胞シート回収に与える影響について検討することを目的とした。具体的には、ジチオエステルを有する CTA を用いて、下層となる重合一段階目の重合で疎水性高分子 poly(benzyl methacrylate) (PBzMA)、上層となる第二段階目の重合では温度応答性高分子 PNIPAAm を導入した。このとき、細胞は親水性の表面において接着性が低下するが、強い疎水性の表面においても接着性が低下することが報告さ

れている³⁾。そのため、PBzMA を導入した表面では細胞の脱着挙動に影響を与えられると考えられる。このとき、BzMA のモノマー濃度を調節することで、PBzMA のグラフト量の違いが与える影響について検討した。作製した基板に対して、ATR/FT-IR 測定、XPS 測定、静的接触角測定を用いて分析することで、各基板の特性評価を行った。また、細胞の接着・脱着挙動について評価するために、PBzMA のグラフト量が異なる温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面上においてウシ頸動脈由来血管内皮細胞(BAEC)の培養および再生医療に用いるための細胞シート作製を行った。本章で作製した各温度応答性高分子ブラシ表面に加え、PBzMA のグラフト量が異なる PBzMA 修飾ガラス表面、コントロールとしてポリマーがグラフトされていない sDTB に BAEC を播種し、細胞の接着・増殖挙動および脱着挙動、また細胞シートの回収について評価した。

2.2 実験方法

以下に示す試薬を用いた合成に関する実験は、ドラフト内で行った。

2.2.1 試薬

本章で使用した試薬を以下に示す。

(1) *N*-イソプロピルアクリルアミド(*N*-isopropylacrylamide, NIPAAm)

興人(東京)より提供されたものを 40 °C でヘキサンに 10 wt%の濃度で溶解後、室温にて再結晶し、減圧乾燥したものをそのまま使用した。

(2) メタクリル酸ベンジル(benzyl methacrylate, BzMA)

和光純薬工業(大阪)から購入したものを減圧蒸留し、約 4.0×10^{-1} kPa、bp: 75 °C の留分を回収して使用した。

(3) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane)

東京化成工業(東京)から購入したものをそのまま使用した。

(4) 4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)(4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid))

和光純薬工業(大阪)から購入したものをそのまま使用した。

(5) 1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン

(1- Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline)

東京化成工業(東京) から購入したものをそのまま使用した。

(6) メタノール(methanol)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(7) *n*-ヘキサン(*n*-hexane)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(8) アセトン(acetone)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(9) *N,N*-ジメチルホルムアミド(脱水) (*N,N*-dimethylformamide, Dehydrated)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(10) 1,4-ジオキサン(1,4-dioxane)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(11) トルエン(脱水) (Toluene, Dehydrated)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(12) 2-プロパノール(2-propanol)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(13) フェニルマグネシウムブロミド(2M in THF) (phenylmagnesium bromide 2M in THF)

東京化成工業(東京) から購入したものをそのまま使用した。

(14) ヘキサシアノ鉄(III)カリウム(potassium hexacyanoferrate)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(15) 二硫化炭素(carbon disulfide)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。揮発性が高く毒性が強いため、火気厳禁としたドラフト内で開放し、目的に応じた方法で使用した。。

(16) 塩酸(hydrochloric acid)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(17) 水酸化ナトリウム(sodium hydroxide)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(18) ジエチルエーテル(diethyl ether)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(19) 酢酸エチル(ethyl acetate)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(20) 無水硫酸マグネシウム(magnesium sulfate anhydrous)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(21) 塩化リチウム(lithium chloride)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(22) 重クロロホルム(chloroform-*d*, CDCl₃)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(23) ダルベッコリン酸緩衝溶液(Dulbecco's phosphate buffered saline, PBS)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した PBS(液体)を滅菌水で 10 倍に希釈したものを使用した。

(24) トリプシン-EDTA 溶液(trypsin-EDTA solution: 0.1 % trypsin-1.1mM EDTA)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したものを PBS を用いて、10 倍に希釈することで使用した。

(25) ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したものをそのまま使用した。

(26) ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(penicillin-streptomycin solution, AB: 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したものをそのまま使用した。

(27) ウシ胎児血清(fetal bovine serum, FBS)

Bioserum (広島) から購入したものをそのまま使用した。

(28) ウシ頸動脈由来血管内皮細胞(bovine carotid endothelial cells, EC, JCRB0099)

ヒューマンサイエンス研究資源バンク(大阪) から購入したものをそのまま使用した。培養回数が 20~25 回の継代数の細胞を用いた。

(29) ポリスチレン製細胞培養皿(tissue culture dish, polystyrene, Falcon 353003, 100 x 20 mm,

TCPS)

BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入したものをそのまま使用した。

(30) ペトリディッシュ(Petri dish, Falcon 351008, 35 x 10 mm)

BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入したものをそのまま使用した。

(31) ワコーゲル[®]C-200(WAKO-gel[®] C-200)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(32) カバーガラス(glass coverslip, 24×50 mm, 0.2 mm in thickness)

松浪硝子工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

2.2.2 使用機器

(1) 低温プラズマ放電装置(plasma dry cleaner, PX-1000), サムコ(京都)

使用条件: 酸素分圧: 0.1 mmHg, 照射強度: 400 W, 照射時間: 180 秒

(2) 核磁気共鳴装置(nuclear magnetic resonance, NMR, Unity INOVA 400), Varian (Palo Alto, CA, USA)

使用条件: ¹H-NMR スペクトル, 使用溶媒: 重クロロホルム(chloroform-*d*, CDCl₃)

(3) 高速ゲル浸透クロマトグラフィー装置(gel permeation chromatography, HLC-8320GPC), 東ソー株式会社(東京)

使用条件: カラム: TSKgel Super AW2500, TSKgel Super AW3000, TSKgel Super AW4000, 流速: 0.6 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: DMF(50 mM LiCl 含む), 標準試料: poly(ethylene glycol (PEG), polystyrene (PSt), (両標準試料共に分子量既知, 分子量分布: 1.05 以下)

(4) 全反射型フーリエ変換赤外分光装置(attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, ATR/FT-IR, Nicolet 6700), サーモフィッシャーサイエンティフィック(神奈川県)

使用条件: スキャン回数: 128 回, 分解能: 4, 光入射角度: 60°, 波数: 4000~650 cm⁻¹, 検出器: MCT/A, ビームスプリッタ: KBr, 光源: IR, 使用窓材: Ge

(5) X線光電子分光分析装置(x-ray photoelectron spectroscopy, K-Alpha), サーモフィッシャーサイエンティフィック(神奈川県)

使用条件: 励起 X 線 monochromatic Al $K_{\alpha 1,2}$ 線(1486.6 eV), 光電子脱出角度(Take-off angle): 15°, X 線径: 100 μm , 測定範囲(結合エネルギー): 1400~0 eV

(6) 接触角測定装置(contact angle meter, DSA100S), KRUSS(Germany)

使用条件: 水中気泡法による静的接触角測定法, 気泡容量: 5 μL

(7) 遠心分離機(5910), 久保田商事(大阪)

使用条件: 温度: 4°C, 回転数: 800 rpm

(8) クリーンベンチ(MCV-131BNF), 三洋電機(大阪)

(9) インキュベーター(BNR-110M), Espec corp(東京)

(10) 顕微鏡(蛍光・位相差) (ECLIPSE TE2000-U), ソフトウェア : AxioVision 4.6 software, ニコン(東京)

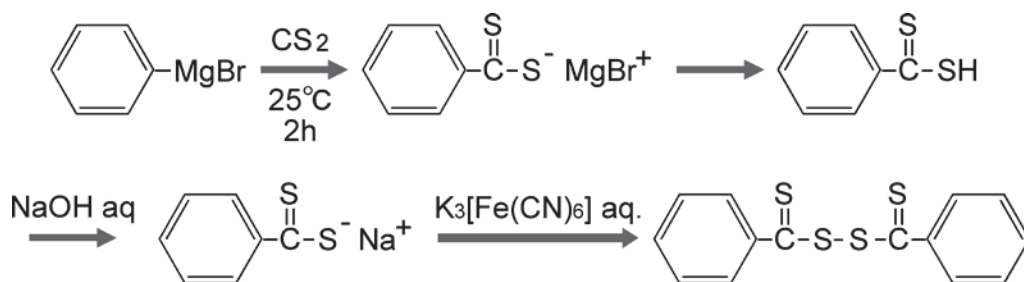
使用条件: 対物レンズ: 100×, 200×, 400×, 接眼レンズ: CFI 10×/22

(11) デジタルカメラ(Lumix DMC-FX66), パナソニック(東京)

2.2.3 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (CPDTB)の合成

2.2.3.1 Bis(thiobenzoyl)disulfide の合成

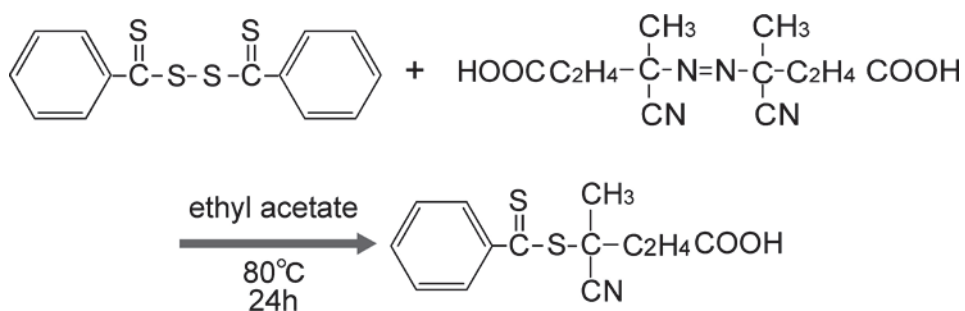
窒素ガスを 500 mL 三口フラスコ内に封入し、2M phenylmagnesium bromide (THF 溶液) (0.5 mol, 250 mL)を添加後、氷浴に設置した。氷浴下で攪拌しながら、carbon disulfide (0.6 mol, 45 mL)を等圧滴下ロートに加えて上部から三口フラスコ内にゆっくりと滴下した。滴下完了後に室温で 2 時間攪拌し、反応溶液をエバポレータで減圧濃縮した。フラスコを再度氷浴に設置し、水および diethyl ether をそれぞれ 100 mL ずつ加えた後、さらに 1 M HCl を 200 mL 加えることで、濃縮物を完全に溶解した。反応溶液を 1000 mL 分液ロートに移してから抽出操作を行い、下層の水相をビーカーに分取することで分液ロートに残った 100 mL のエーテル相を得た。エーテル相に 2 M NaOH を 300 mL 加えた後、抽出操作によって下層の水相を 500 mL ビーカーに分取することで回収した。回収した水相を potassium hexacyanoferrate 165 g を含む水溶液 1 L に加えた後、15 分間室温で攪拌した。生成した析出物を吸引ろ過により回収し、2 日間減圧乾燥した後、目的物である Bis(thiobenzoyl)disulfide (Scheme 2.1)を回収した^{4),5)}。得られた化合物は核磁気共鳴装置によって ¹H-NMR スペクトルで確認した。



Scheme 2.1 Synthesis of bis(thiobenzoyl)disulfide.

2.2.3.2 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate の合成

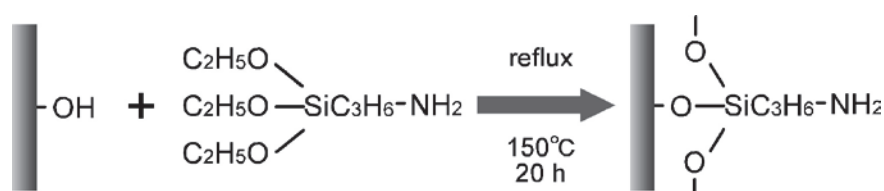
前節で合成した bis(thiobenzoyl)disulfide (0.0489 mol, 15 g)、および 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (V501, 0.0916 mol, 25.69 g)を酢酸エチル(350 mL)に溶解後、窒素ガスバブリング処理を 1.5 時間行った。次に N₂ 雰囲気下で 80°C、24 時間還流後、反応溶液を減圧濃縮した。目的物を分取するために酢酸エチル/ヘキサン(2/1, v/v)を展開溶媒として、シリカゲルカラム(ワコーゲル[®]200)により目的物を分取した(Rf 値: 0.24)。回収した溶液に硫酸マグネシウムを添加することで水分を除去した。吸引ろ過後のろ液を減圧下で溶媒留去した。減圧乾燥後、目的物である薄赤色を呈した固形粉末の 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (CPDTB) (Scheme 2.2)を得た^{4),5)}。得られた化合物は核磁気共鳴装置によって ¹H-NMR スペクトルで確認した。



Scheme 2.2 Synthesis of 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (CPDTB).

2.2.4 第一級アミノ基導入ガラス基板の調製

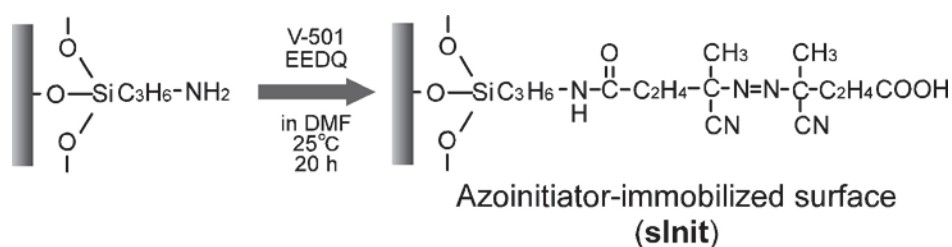
酸素プラズマ処理(酸素分圧: 0.1 mmHg, 照射強度: 400 W, 照射時間: 180 秒)を行うことで、カバーガラス(glass coverslip, 24×50 mm, 0.2 mm in thickness)表面上に存在する有機物除去と-SiOH 基の活性化を行った。酸素プラズマ処理を行ったガラス基板をセパラブルフラスコ内に 62 枚設置し、フラスコ内の真空脱気-窒素置換を行い、最終的にフラスコ内に窒素を充填した。窒素フローを行いながら、フラスコ内に 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) を 2.5 μ L 含むトルエン 0.5 mL をフラスコ底部に滴下し、窒素雰囲気下、150°C で 20 時間還流した。反応終了後、ガラス基板をトルエン、次にメタノールでそれぞれ洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥した。これにより、第一級アミノ基を基板表面上に導入したガラス基板 (APTES 固定化基板)を得た(Scheme 2.3)。



Scheme 2.3 Immobilization of APTES on glass surface.

2.2.5 ガラス表面へのアゾ系重合開始剤の導入

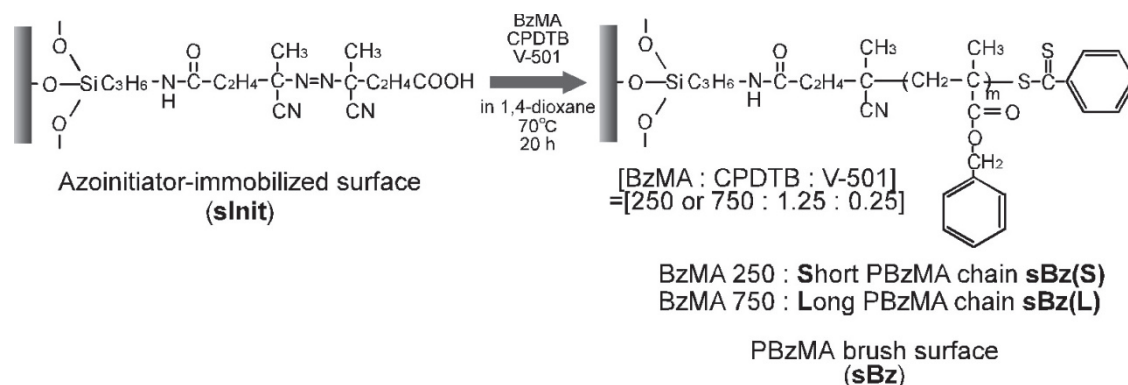
APTES 固定化基板をセパラブルフラスコ内に 18 枚設置し、アゾ系重合開始剤である V-501(9.38 mmol, 7.4 g)および縮合剤の 1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ: 18.75 mmol, 12.8 g)を含む DMF(700 mL)で浸漬後、窒素雰囲気下、室温で 20 時間攪拌した。反応終了後基板を DMF(250 mL)、アセトン(250 mL)で順次洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥した。乾燥終了後、アゾ系重合開始剤を基板表面上に導入したガラス基板(開始剤固定化基板: sInit)を得た(Scheme 2.4)。



Scheme 2.4 Immobilization of azoinitiator on APTES immobilized surfaces.

2.2.6 SI-RAFT 重合による PBzMA ブラシ表面の作製

基板に修飾した PBzMA が基板の特性に与える効果について議論するため、BzMA の濃度を変更することによって PBzMA のグラフト量が異なる基板を作製した。具体的には BzMA(0.25 mol: 42.36 mL, 0.75 mol: 127.08 mL)、CPDTB(1.25 mmol, 349 mg)、V-501(0.25 mmol, 70 mg)を含む 1,4-ジオキサン (250 mL)中に sInit を 18 枚浸漬させ、反応溶液中の溶存酸素を十分に除去するために窒素ガスバブリングを 1 時間行うことで溶存酸素を除去した。次に、窒素雰囲気下において 70°C、20 時間 SI-RAFT 重合によって反応させた。反応終了後、基板を 250 mL のアセトン中で 1 時間攪拌し、基板表面上に残存した有機物の除去を行った。その後、室温で 3 時間減圧乾燥し、sInit に PBzMA が 0.25 mol の条件でグラフトした基板 sBz(Short: S)および PBzMA が 0.75 mol の条件でグラフトした基板 sBz(Long: L)を得た (Scheme 2.5)。また反応終了後、溶液中に残存するポリマーを回収するため、各反応溶液 10 mL をそれぞれメタノール(300 mL)中に滴下することで PBzMA を再沈殿させた。再沈殿した PBzMA を吸引ろ過により回収し、室温で 3 時間減圧乾燥することで、反応溶液中の PBzMA を回収した。

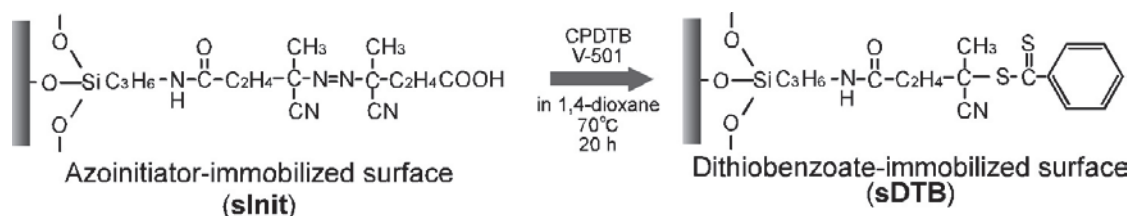


Scheme 2.5 PBzMA grafting through RAFT polymerization on sInit.

2.2.7 CPDTB 固定化ガラス基板の作製

作製した開始剤固定化基板を CPDTB(1.25 mmol, 349 mg)、V-501(0.25 mmol, 70 mg)を含む 1,4-ジオキサン (250 mL)中に浸漬し、反応溶液中の溶存酸素を十分に除去するために窒素ガスバブリングを 1 時間行うことで溶存酸素を除去した。このとき、V-501 を加えることで、2.2.6 で行った PBzMA の重合条件に合わせており、BzMA 0 mol の条件として用いた。次に、窒素雰囲気下、70°C で 20 時間基板上的開始剤と CPDTB を反応させることで、モノ

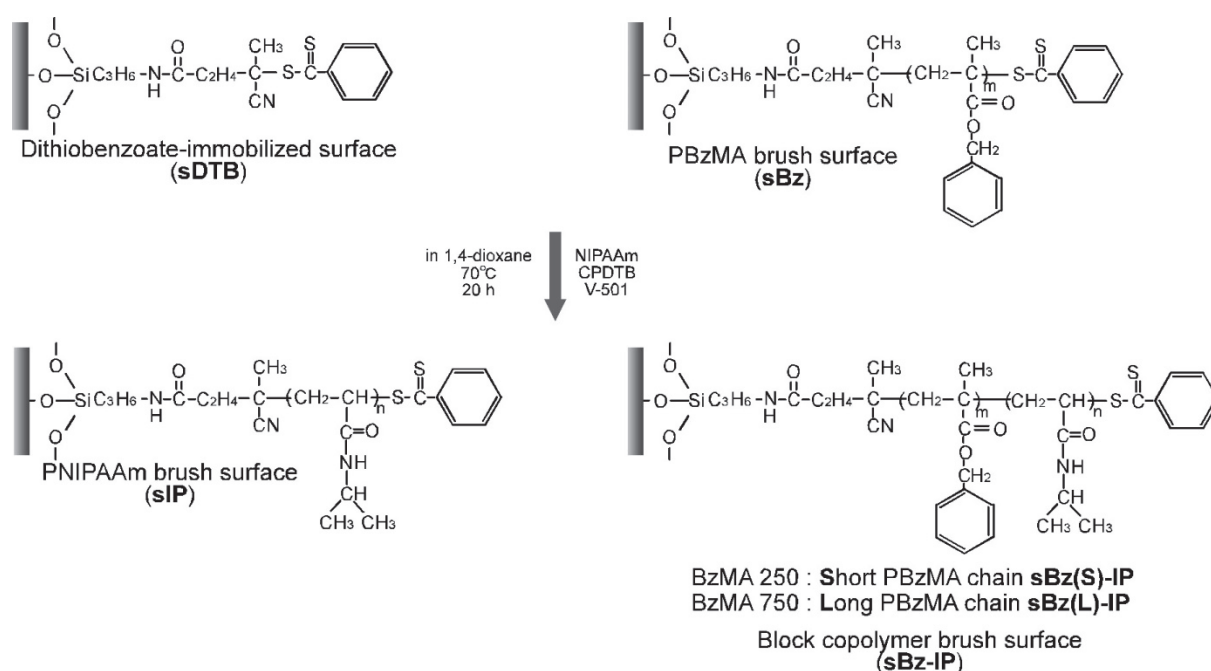
マーの存在しない SI-RAFT 重合として反応を行った。反応終了後、基板をアセトン(250 mL)で洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥することで開始剤固定化基板に CPDTB が固定化された基板 sDTB を得た(Scheme 2.6)。



Scheme 2.6 Immobilization of CPDTB on sInit.

2.2.8 PBzMA-*b*-PNIPAAm ブロック共重合体ブラシおよび PNIPAAm ブラシ表面の作製

PNIPAAm(0.25 mol, 28.28 g)、CPDTB(0.06 mmol, 18 mg)、V-501(0.25 mmol, 70 mg)を含む 1,4-ジオキサン (250 mL)中に作製した sDTB および sBz(S or L)を同一のセパラブルフラスコ内に浸漬させ、反応溶液中の溶存酸素を十分に除去するために窒素ガスバブリングを 1 時間行うことで溶存酸素を除去した。次に、窒素雰囲気下において 70°C、20 時間 SI-RAFT 重合を行った。反応終了後、各基板を 250 mL のアセトン中で 1 時間攪拌することで、基板表面上に残存した溶液中に生成される PNIPAAm やモノマーなどの除去を行った。攪拌終了後、室温で 3 時間減圧乾燥し、sDTB に PNIPAAm がグラフトした基板 sIP、PNIPAAm が sBz(S)にグラフトした基板 sBs(S)-IP および PNIPAAm が sBz(L)にグラフトした基板 sBz(L)-IP を得た(Scheme 2.7)。また反応終了後、溶液中に残存するポリマーを回収するため、反応溶液 10 mL をそれぞれジエチルエーテル(200 mL)中に滴下し、PNIPAAm を再沈殿させた。再沈殿した PNIPAAm を吸引ろ過により回収し、室温で 3 時間減圧乾燥し、反応溶液中の PNIPAAm を回収した。



Scheme 2.7 PNIPAAm grafting through RAFT polymerization on sDTB, sBz(S) and sBz(L).

2.3 回収した各ポリマーおよび作製した各基板の物性評価

2.3.1 重合溶液系における高分子の数平均分子量と分子量分布の決定

高速 GPC 装置(標準試料: ポリ(スチレン) (PSt), (分子量既知, 分子量分布: 1.05 以下))を用いて作製したサンプルの分子量と分子量分布の算出を行なった。重合 1 段階目の PBzMA を基板上に修飾した際に、反応溶液中で生成した PBzMA 10 mg をそれぞれ 50 mM LiCl 含有 DMF 3 mL に溶解することで測定サンプルを作製した。高速 GPC 装置にサンプルを 30 μ L 注入し、得られたクロマトグラムから、数平均分子量(M_n)と、分子量分布(M_w/M_n)を算出した。

高速 GPC 装置(標準試料: ポリ(エチレングリコール) (PEG) (分子量既知, M_w/M_n : 1.05 以下))を用いて作製したサンプルの数平均分子量(M_n)と分子量分布(M_w/M_n)の算出を行なった。重合 2 段階目の PNIPAAm を基板上に修飾した際に、反応溶液中で生成した PNIPAAm 10 mg をそれぞれ 50 mM LiCl 含有 DMF 3 mL に溶解することで測定サンプルを作製した。高速 GPC 装置にサンプルを 30 μ L 注入することで、得られたクロマトグラムから、数平均分子量(M_n)と、分子量分布(M_w/M_n)を算出した。

2.3.2 X線光電子分光分析(XPS)による各ポリマー修飾ガラス基板の評価

XPS を用いて作製した各ガラス基板表面上の元素組成について評価した^{6), 7)}。ガラス基板上の元素組成を調べることで、(1)各ポリマーがガラス基板に対してグラフトされているかの確認、(2)得られた元素組成を解析し、主要元素の比を算出することで理論値との比較、などの評価を行う。励起 X 線 monochromatic Al K_{α1,2}線(1486.6 eV)、光電子脱出角度 (Take-off angle)は試料表面に対して 15°、測定範囲(結合エネルギー)は 1400~0 eV および X 線径は 100 μm として測定を行った。

2.3.3 減衰全反射フーリエ変換赤外分光(ATR/FT-IR)測定による高分子修飾量の分析

2.2.6~2.2.8 で作製したサンプルの PNIPAAm 修飾量を算出するために、ATR/FT-IR を用いて測定を行った。ATR/FT-IR では、基板の上に赤外光を照射し、透過または反射した光量を測定する。そうすることで、サンプルの分子構造によって赤外光の吸収スペクトルが異なるため、得られるスペクトルから基板の上に存在する物質を同定できる。本測定では、PNIPAAm 修飾ガラス基板上の PNIPAAm 量を定量するため、濃度既知の PNIPAAm の 2-プロパノール溶液をガラス基板表面に 18 μL キャスティングして乾燥させた。乾燥終了後に ATR/FT-IR 測定を行った結果、Figure 2.1 (A)に示すように、1650 cm⁻¹付近に PNIPAAm 側鎖である amide I の伸縮振動由来のピークと 1000 cm⁻¹付近にガラス基板の Si-O-Si 伸縮振動由来のピークが検出された^{2), 8)}。得られたピークの強度比(I_{1650}/I_{1000})を基板に導入した PNIPAAm の単位面積当たりの量に対してプロットし、検量線を作成した(Figure 2.1 (B))。得られた検量線より、

$$(I_{1650}/I_{1000}) = 0.0030 \times (\text{PNIPAAm amount}) \quad (1)$$

となり、ガラス基板表面に固定化された PNIPAAm のグラフト量について、基板 3 枚の測定を行い、その平均値と標準偏差(Standard deviation, SD)値を評価した(n=3)。

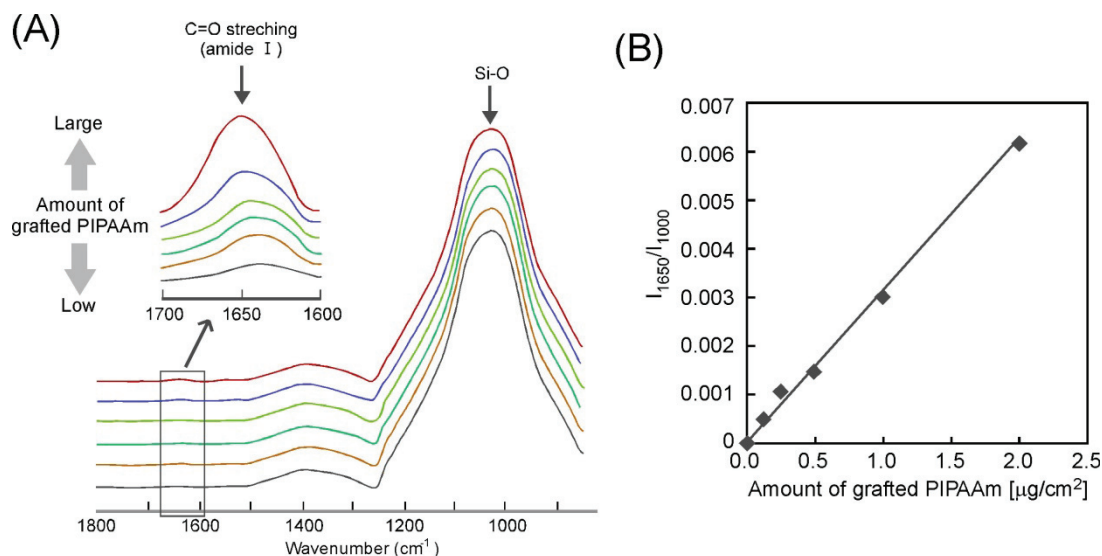


Figure 2.1 (A) ATR/FT-IR spectra of PNIPAAm-grafted surface. (B) Calibration curve for the grafted amount of PNIPAAm on the glass surface. x; Grafted amount of PNIPAAm, y; I_{1650}/I_{1000} .

2.2.6~2.2.8 で作製したサンプルの PBzMA 修飾量を算出するために ATR/FT-IR を用いて評価した。具体的には、PBzMA 修飾ガラス基板上の PBzMA 量を定量するため、濃度既知の PBzMA のメタノール溶液をガラス基板表面に 36 μL キャスティングして乾燥させた。乾燥終了後に ATR/FT-IR 測定を行った結果、Figure 2.2 (A)に示すように、 1725 cm^{-1} 付近に PBzMA 側鎖のエステル結合の伸縮振動由来のピークが検出された⁸⁾⁻¹⁰⁾。得られたピークの強度比(I_{1725}/I_{1000})を基板に導入した PBzMA の単位面積当たりの量に対してプロットし、検量線を作成した(Figure 2.2 (B))。得られた検量線より、

$$(I_{1725}/I_{1000}) = 0.0070 \times (\text{PBzMA amount}) \quad (2)$$

となり、ガラス基板表面に固定化された PBzMA のグラフト量について、基板 3 枚の測定を行い、その平均値と SD 値を算出した。

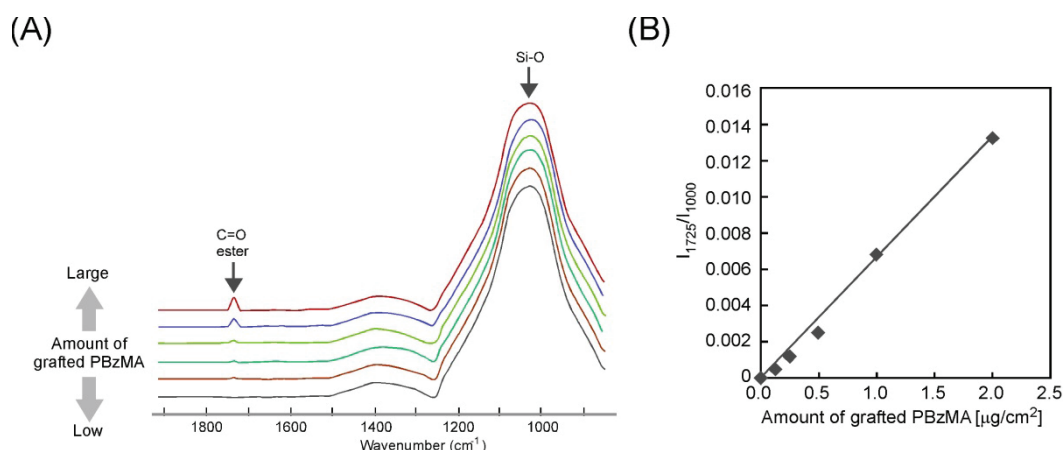


Figure 2.2 (A) ATR/FT-IR spectra of PBzMA-grafted surface. (B) Calibration curve for the grafted amount of PBzMA on the glass surface. x; Grafted amount of PBzMA, y; I_{1650}/I_{1000} .

2.3.4 水中気泡法を用いた静的接触角測定による各ポリマー修飾表面のぬれ性変化

2.2.6~2.2.8 で作製した各基板に対して水中気泡法(captive bubble method)を用いて、水中に基板を浸漬させ、気泡を基板下部表面に付着させた後、接触角法により接着した気泡の接触角(θ_g)を算出した¹¹⁾。

各基板に対して 20°C から 50°C の範囲で 11 点の温度 の水中気泡法による静的接触角測定を行い、転移温度を挟んだ温度範囲の表面ぬれ性を評価した。基板に付着させる気泡の大きさは 5 μL、各基板 1 枚につき 6 点の静的接触角を基板 3 枚分測定することで、その平均値と SD 値を算出した(n=3)。

2.3.5 各ポリマー修飾基板表面への細胞の接着/脱着挙動の観察

2.3.5.1 ウシ頸動脈由来血管内皮細胞(BAEC)の培養

凍結保存されているウシ頸動脈由来血管内皮細胞(bovine caroid endothelial cells, BAEC)懸濁液を解凍し、培養液であるダルベッコ変法イーグル培地(DMEM) (FBS: 10%, penicillin-streptomycin solution: 1%含有)を用いてポリスチレン製細胞培養皿(TCPS) (φ 100 mm)上に播種後、細胞が培養皿一面にわずかに隙間が存在する状態まで培養した。培養し

た BAEC は以下の手順によって継代培養した。

TCPS 上で細胞が培養皿一面にわずかに隙間が存在する状態まで培養し、BAEC の培養液を廃棄後、PBS で洗浄を行い、トリプシン-EDTA 溶液を 3 mL 添加することで、37°C の 5%CO₂ インキュベーター内で 2 分間酵素処理を行った。顕微鏡により TCPS 上からの細胞の剥離を確認後、トリプシンを失活させるために TCPS に DMEM 6 mL を添加し、ピペッティングして細胞懸濁液を回収した。この細胞懸濁液を 4°C、800 rpm、5 分間遠心分離した。細胞懸濁液の上清を吸引除去し、新たに DMEM を加えることで細胞懸濁液を調製した。継代培養する場合、新しい 100 mmTCPS 上に細胞懸濁液を播種し培養を行った。

2.3.5.2 各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の初期接着／脱着挙動の観察

2.2.6 と 2.2.8 作製した各基板をダイヤモンドカッターによって 24 × 25 mm にカットし、培養皿上への細胞接着を抑制するためにカットした基板を 30 mm ペトリディッシュ上に設置した。クリーンベンチ内において、2.3.5.1 で調製した細胞懸濁液を、懸濁液 3 mL に対して基板上への播種密度が 1.0×10^4 cells/cm² となるように調製し、ディッシュ中に懸濁液 3 mL を加えた。細胞播種後、ディッシュを 5%CO₂、37°C のインキュベーター内で 24 時間培養し、位相差顕微鏡下で経時的に観察・撮影することで、基板表面への初期接着細胞数を計数した。続いて細胞の脱着挙動を評価するため、ディッシュを 5% CO₂、20°C のインキュベーター内に静置し、2 時間静置した。同様に位相差顕微鏡下で経時的に観察・撮影し、基板表面における接着細胞数を計数した。一方で、2.2.7 で作製したコントロールの sDTB も同様の実験を行い、細胞の経時変化について観察・撮影を行った。また、位相差顕微鏡により観察したサンプル上の細胞接着数は撮影した細胞数に対して、単位面積当たりの細胞数に計算した数として算出した。

2.3.5.3 各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の接着・増殖挙動の観察

2.3.5.2 と同様の手法でサンプルを用意し、クリーンベンチ内において、2.3.5.1 で調製を行った細胞懸濁液を懸濁液 3 mL に対して基板上への播種密度が 5.0×10^3 cells/cm² となるように調製し、ディッシュ中に懸濁液 3 mL を加えた。細胞播種後、ディッシュを 5%CO₂、

37°C のインキュベーター内で 72 時間培養し、位相差顕微鏡下で経時的に観察・撮影することで、基板表面への接着細胞数を計数した。一方で、2.2.7 で作製したコントロールの sDTB も同様の実験を行い、細胞の経時変化について観察・撮影を行った。このとき、位相差顕微鏡により観察したサンプル上の細胞接着数は撮影した細胞数に対して、単位面積当たりの細胞数に計算した数として算出した。また、細胞培養による細胞増殖において、細胞総数が播種濃度から基板一面に細胞が増殖するまで培養し、倍加時間(Doubling time, DT)を以下の式を用いて算出した。

$$DT = (t_2 - t_1) \log 2 / (\log N_2 - \log N_1) \quad (3)$$

t_1 : 37°C 培養 48 時間、 t_2 : 37°C 培養 72 時間(対数増殖期における 2 点)

N_1 : t_1 における接着細胞数、 N_2 : t_2 における接着細胞数

2.3.5.4 各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収

2.3.5.2 と同様の手法でサンプルを用意し、クリーンベンチ内において、2.3.5.1 で調製を行った細胞懸濁液を懸濁液 3 mL に対して基板上への播種密度が 1.0×10^5 cells/cm² となるように調製し、ディッシュ中に懸濁液 3 mL を加えた。細胞播種後、ディッシュを 5%CO₂、37°C のインキュベーター内で細胞がコンフルエントになるまで培養し、位相差顕微鏡下で経時的に観察・撮影を行った。また、37°C の条件下で培養期間が 5 日間を超過する場合、培養開始後 5 日で 37°C の培養液による培地交換を行った。続いて細胞の脱着挙動を評価するため、ディッシュを 5% CO₂、20°C のインキュベーター内に静置し、細胞シートの回収を試みた。一方、37°C、7 日間以上培養を行っても細胞がコンフルエント状態に到達しない場合も低温処理の操作を行った。また、ポリマーが修飾していない sDTB をコントロールとして、同様の処理を行い、各ポリマー修飾基板との比較を行った。

2.4 結果および考察

2.4.1 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate の $^1\text{H-NMR}$ 測定による評価

合成した Bis(thiobenzoyl)disulfide および 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの同定結果を Figure 2.3 および Figure 2.4 に示す。Figure 2.3 より、7.2、7.4、7.9 ppm 付近にフェニル基のピークが検出され、2 のピークに対して 1 と 3 のピークが大きく検出されたことから、目的の合成物が得られたことが示された。次に Figure 2.4 より、1.9、2.5、2.8 ppm 付近に 4-cyanopentanoic のピークが検出されたことから、目的の合成物が得られたことが示された。

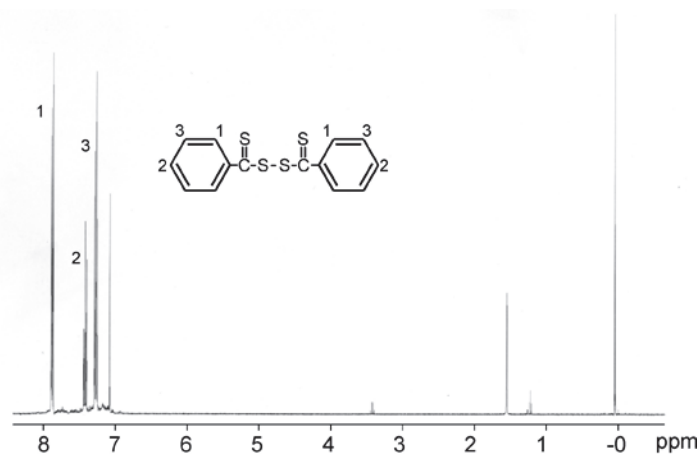


Figure 2.3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Bis(thiobenzoyl)disulfide, in CDCl_3 .

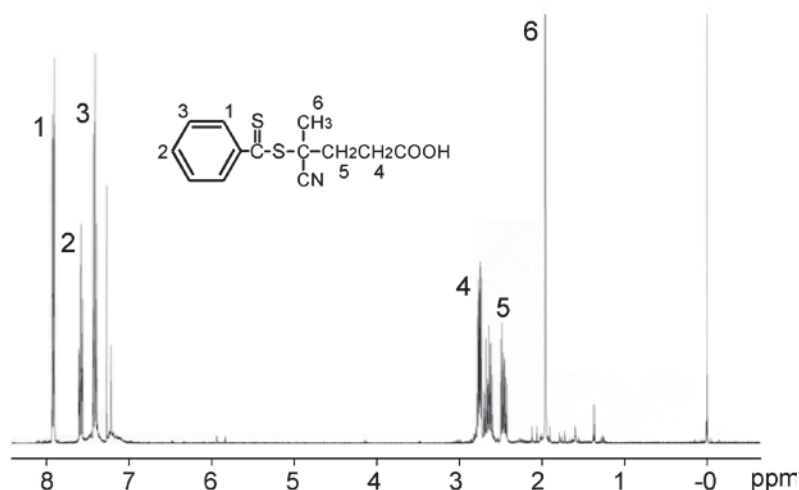


Figure 2.4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate, in CDCl_3 .

2.4.2 重合溶液系における高分子特性解析

2.4.2.1 高分子ブラシの分子量

PBzMA および PNIPAAm ブラシ表面作製時に反応溶液中に生成する各ポリマーの数平均分子量(M_n)および分子量分布(M_w/M_n)を Table 2.1 に示す。

一段階目の重合で生成した PBzMA は、ポリマーの分子量は反応溶液中のモノマー濃度に依存することが報告されており、反応溶液から得られた 0.75 mol で重合したポリマーの分子量も 0.25 mol のものと比較して約 3 倍となった²⁾。

次に二段階目に重合を行った PNIPAAm は、重合溶液中において反応が進行していることから、PBzMA を修飾した基板ではグラフトされている PBzMA 鎖の末端から PNIPAAm が生長してグラフトされていることが期待される。また、反応溶液中で得られたポリマーと基板上にグラフトされたポリマー鎖の分子量は同等であることが報告されていることから、同等の分子量を有するポリマー鎖が基板上にグラフトされていることが期待される¹²⁾。

Table 2.1 Characterization of PBzMA and PNIPAAm obtained from the reaction solutions.

Sample(number of monomer unit) ^a	Molecular weights of free polymers	
	M_n^d	PDI ^{d,e}
PBzMA (250) ^b	22000	1.14
PBzMA (750) ^b	70000	1.13
PNIPAAm (250) ^c	51000	2.25

^a Number in parenthesis was number of monomer unit.

^b Initial feeds of BzMA for PBzMA(250) and PBzMA(750) were 1 M for and 3 M, respectively. CPDTB: 5 mM, V-501: 1 mM.

^c Initial feeds of IPAAm, CPDTB, and V-501 were 1 M, 0.25 mM, and 1 mM, respectively.

^d Determined by GPC using DMF with 50 mM LiCl.

^e PDI: polydispersity index.

2.4.2.2 高分子ブラシの分子量分布

RAFT 重合において開始剤と連鎖移動剤の比率が重要となり、PBzMA の分子量分布は比較的狭い値を示した。これは、今回の重合では開始剤と連鎖移動剤の比が 1:5 となっているため、連鎖移動反応が十分に制御されたため、分子量分布が狭くなったと考えられる。

以上の結果より、一段階目に重合した PBzMA はモノマー濃度を変更することで分子量の制御を行い、開始剤と CTA の比率によって分子量分布の狭いポリマーを得られることから、PBzMA 修飾基板上においても同様の結果が得られていることが期待される^{2),12)}。

次に PNIPAAm の分子量分布は 2.25 と広い値となっており、これは重合する際に導入した開始剤と連鎖移動剤の比率が 25:6 となり、連鎖移動剤の濃度に対して開始剤の濃度が大きくなっている。通常、RAFT 重合を行う場合、開始剤に対して連鎖移動剤の濃度を少なくとも約 5 倍にすることで、連鎖移動反応を効率よく行うことができる。しかしながら、細胞の接着・脱着挙動に対して PNIPAAm 鎖の鎖長が影響することは知られており、重合が可能で細胞の接着・脱着が可能な大きさの鎖長を有する PNIPAAm ブラシを作製するために、連鎖移動剤を前述に示した濃度にするすることで重合を行った。そのため、PNIPAAm の重合においてモノマー濃度に対して連鎖移動剤の濃度が少なかったことから、連鎖移動反応が効率よく進行しなかったため、分子量分布が広がったと考察される。

以上の結果から、反応溶液中の重合反応が進行しているため、基板上に PBzMA および PNIPAAm がグラフトされていることを確認するために、XPS および ATR/FT-IR 測定を行った。

2.4.3 XPS 分析による各ポリマー修飾ガラス基板の元素組成の決定

各基板表面上の最表面元素組成を XPS 分析によって得た結果を Table 2.2 に示す。得られた結果より、CPDTB を固定化した sDTB と比較して、PBzMA を修飾した sBz ではポリマー由来の C 原子の比率が増加、ガラス基板由来の Si 原子の比率は減少した。次に、PNIPAAm を修飾した基板では sDTB と比較して、PNIPAAm 由来の C 原子と N 原子の比率が増加、ガラス基板由来の Si 原子の比率が減少している。一方で、PBzMA および PNIPAAm は構造上 O 原子を含んでいるが、各基板における測定結果では O 原子の比率が減少している。これは各ポリマー修飾基板と比較して sDTB ではガラス基板由来の Si 原子の比率が 28.7%となっており、今回検出されている O 原子も大半がガラス基板由来の O 原子であると考えられる。そのため基板上にグラフトされるポリマーの量が増加するに従って O 原子の比率が減少し、各ポリマーが基板表面上にグラフトされることでガラス基板由来の元素

から放出された光電子の運動エネルギーが低下したことで検出が困難となり、O 原子の比率が減少する結果になったことが示唆された。

次に各基板においてポリマーの主成分となるNをCで比を取ったN/C値はそれぞれTable 2.2 に示した値となり、各基板上のポリマーの構造から算出される計算値(sIP: N/C=0.17, sBz-IP: N/C=0.06)と比較した。各 sBz では、BzMA にはNが含まれないにもかかわらず、Nの値が約 1atomic%検出され、N/C 値も 0.03 となった。これは CPDTB を固定化した sDTB と比較して、sDTB においてもNは 1atomic%を検出されていることから、開始剤 V-501 や CPDTB にはわずかに含まれているNが検出されたと考えられる。次に PNIPAAm 修飾基板の sIP ではN/C 値は 0.08 となり、理論値と比較して低い値を示した。これはCおよびNの両成分ともに PNIPAAm をグラフトした sDTB と比較して増加しているが、ガラス基板由来の Si などが多く検出されていることから、PNIPAAm のグラフト量または密度が小さいために計算値よりも低い値を示したと考えられる。一方で、各ブロック共重合体ブラシ表面では計算値と比較して同等の値を示した。

以上の結果より、XPS 分析の結果から基板上への各ポリマーの修飾が示された。次に PBzMA と PNIPAAm の基板上へのグラフト量を算出するために ATR/FT-IR 測定を行った。

Table 2.2 Elemental analysis on various surfaces by XPS.

Sample	Element (atomic%) ^c				N/C ^c	Calculated value of N/C
	C	N	O	Si		
sDTB	30.0	1.0	40.3	28.7	-	-
sBz(S) ^a	35.8	1.1	37.2	25.9	0.03	-
sBz(L) ^a	39.2	1.1	33.7	26.0	0.03	-
sIP ^b	44.6	3.7	28.5	23.2	0.08	0.17
sBz(S)-IP ^{a,b}	51.1	3.6	26.0	19.3	0.07	0.06
sBz(L)-IP ^{a,b}	69.2	5.0	17.1	8.7	0.07	0.06

^a Initial feeds of BzMA for sBz(S) and sBz(L) were 1 M for and 3 M, respectively. CPDTB: 5 mM, V-501: 1 mM.

^b Initial feeds of IPAAm, CPDTB, and V-501 were 1 M, 0.25 mM, and 1 mM, respectively.

^c Determined by XPS, take-off angle 15°.

2.4.4 ATR/FT-IR 測定を用いた各ポリマーの基板上へのグラフト量の決定

ATR/FT-IR 測定によりガラス基板表面上における PBzMA または PNIPAAm のグラフト量を算出した結果を Table 2.3 に示す。

重合一段階目における PBzMA のグラフト量は ATR/FT-IR 測定より PBzMA を修飾した各基板をそれぞれ 3 枚測定することで、sBz(S)では $0.28 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、sBz(L)では $0.50 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となった。これは、モノマー濃度の導入量が S は 0.25 mol、L は 0.75 mol と 3 倍の違いがあるにも関わらず、実際の PBzMA のグラフト量は約 2 倍の差となった。これは、基板表面上で重合が進行する場合、反応溶液中のポリマーは攪拌によって溶液中を自由に動いているが、基板上のポリマー鎖は固定化されていることで、重合の効率が抑制されるためと考えられる。しかしながら、モノマー濃度の違いにより、異なるグラフト量を有する基板を作製できたため、グラフト量の違いによって基板の物性や細胞の接着・脱着挙動に影響を与えることが期待できる。

重合二段階目における PNIPAAm のグラフト量は ATR/FT-IR 測定より PNIPAAm を修飾した各基板をそれぞれ 3 枚測定することで、sIP では $0.81 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、sBz(S)-IP では $0.93 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、sBz(L)-IP では $0.90 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、と算出した。この 3 種類の基板はすべて同じ反応溶液に浸漬させて重合を行っており、重合を行った基板は下層に導入した BzMA の濃度(0 mol, 0.25 mol, 0.75 mol)が異なる。しかしながら、同等の PNIPAAm のグラフト量を有する基板を作製できたことから、基板上にグラフトされている PNIPAAm の分子量やグラフト密度はほぼ同等の基板が作製できていることが期待できる。

以上の結果から、ブロック共重合体ブラシ表面において、下層では異なるグラフト量を有する PBzMA、上層ではほぼ同等のグラフト量を有する PNIPAAm が修飾された基板が作製できた。

Table 2.3 Grafted amounts of various polymers on the glass surface.

Sample	Amount of grafted polymer ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ^c	
	PBzMA	PNIPAAm
sBz(S) ^a	0.28 \pm 0.02	—
sBz(L) ^a	0.50 \pm 0.01	—
sIP ^b	—	0.81 \pm 0.01
sBz(S)-IP ^{a,b}	0.26 \pm 0.05	0.93 \pm 0.05
sBz(L)-IP ^{a,b}	0.50 \pm 0.02	0.90 \pm 0.07

^a Initial feeds of BzMA for sBz(S) and sBz(L) were 1 M for and 3 M, respectively. CPDTB: 5 mM, V-501: 1 mM.

^b Initial feeds of IPAAm, CPDTB, and V-501 were 1 M, 0.25 mM, and 1 mM, respectively.

^c Determined by ATR/FT-IR, mean \pm SD (n = 3).

2.4.5 水中気泡法を用いた静的接触角法による各ポリマー修飾表面のぬれ性変化の測定

各基板のぬれ性を評価するため、20°C から 50°C の範囲で水中気泡法による静的接触角測定を行い、その結果を Figure 2.5 に示した。このとき、 $\cos\theta$ 値は基板のぬれ性を表しており、疎水性であれば 0 に近い値となり、親水性であれば 1 に近い値を示す。

PNIPAAm が未修飾の sDTB、sBz(S)、sBz(L)におけるぬれ性の変化を Figure 2.5 (A)に示す。各温度で測定した結果、CTA 固定化基板である sDTB と比較して、sBz(S)は疎水性を示しており、基板上に疎水性高分子 PBzMA がグラフトされたことが示された。一方で、sBz(L)は sBz(S)と比較してより疎水性を示しており、多くの PBzMA がグラフトされているためと考えられる。次に、sDTB、sBz(S)、sBz(L)において 20°C から 50°C の範囲における測定で接触角を測定した結果、PNIPAAm が未修飾のため、温度変化による接触角の違いは見られなかった。以上の結果から、疎水性高分子 PBzMA を導入することで疎水性を示す基板表面が作製され、PBzMA のグラフト量を変化させることで異なる疎水性を有する基板を作製できることが示された。

次に PNIPAAm を修飾した sIP、sBz(S)-IP、sBz(L)-IP のぬれ性の変化を Figure 2.5 (B)に示す。測定温度 20°C における各 PNIPAAm グラフト基板の $\cos\theta$ 値は 0.86 \pm 0.02 となり、各基板の PNIPAAm 重合前の基板と比較してより親水性を示した。これは、PNIPAAm は LCST

以下の低温において親水性を示す。また、PNIPAAm は疎水性高分子である PBzMA と比較して親水性の高分子であるためと考えられる。この結果から、各 PNIPAAm 修飾基板が作製できたことが接触角測定においても示された。また、測定温度が 20°C から 50°C の範囲において接触角を測定した結果、種々の PNIPAAm 修飾基板において 34°C で 0.78 ± 0.02 となり、低温側と比較してより疎水性の値を示し、最終的に 50°C では 0.77 ± 0.02 となった。このとき、各基板における接触角の変化から、32°C を境に急激に親水性から疎水性に変化した。これは、基板上に PNIPAAm を修飾したことで、表面物性が 32°C を境に親水性から疎水性へと変化し、最表面が PNIPAAm となったことから下層の組成に関わらず同等のぬれ性を示したと考えられる。また、温度応答性ブロック共重合体構造の LCST は、異種の高分子層の分子量に依存しないことが報告されており、各ブロック共重合体ブラシ表面においても sIP と同様の挙動が示されていることから、ブロック共重合体ブラシ構造における PNIPAAm の水和・脱水和の挙動に変化はないことが示された¹³⁾。

これまでに Okano らのグループが、種々の結合様式によって PNIPAAm グラフト表面を作製し、その表面における LCST の解析結果より、PNIPAAm 片末端固定化表面ではポリマー鎖の自由度が高い場合、溶液中における PNIPAAm の LCST と同様に固定化した PNIPAAm においても約 32°C に LCST を有することが確かめられている¹⁴⁾。一方、PNIPAAm が化学架橋によって表面上の分子鎖の運動性が制限されている場合、LCST がわずかに低温側へシフトする¹⁵⁾。そのため、今回の PNIPAAm を修飾した各表面では、PNIPAAm のグラフト量が多いことから、PNIPAAm がグラフトされている高分子鎖の末端の自由度は高くなったと考えられる。そのため、表面上の PNIPAAm 鎖は溶液中の PNIPAAm と比較して、同等の LCST を示したと考えられる。

以上の結果から、基板上に PBzMA を導入した表面では元の基板と比較して疎水性を示し、PBzMA の導入量によって基板表面の疎水性を調節できることが示された。また、PNIPAAm を導入した基板表面では、LCST 32°C を境に溶液中の PNIPAAm と同様に親・疎水性の変化が示された。

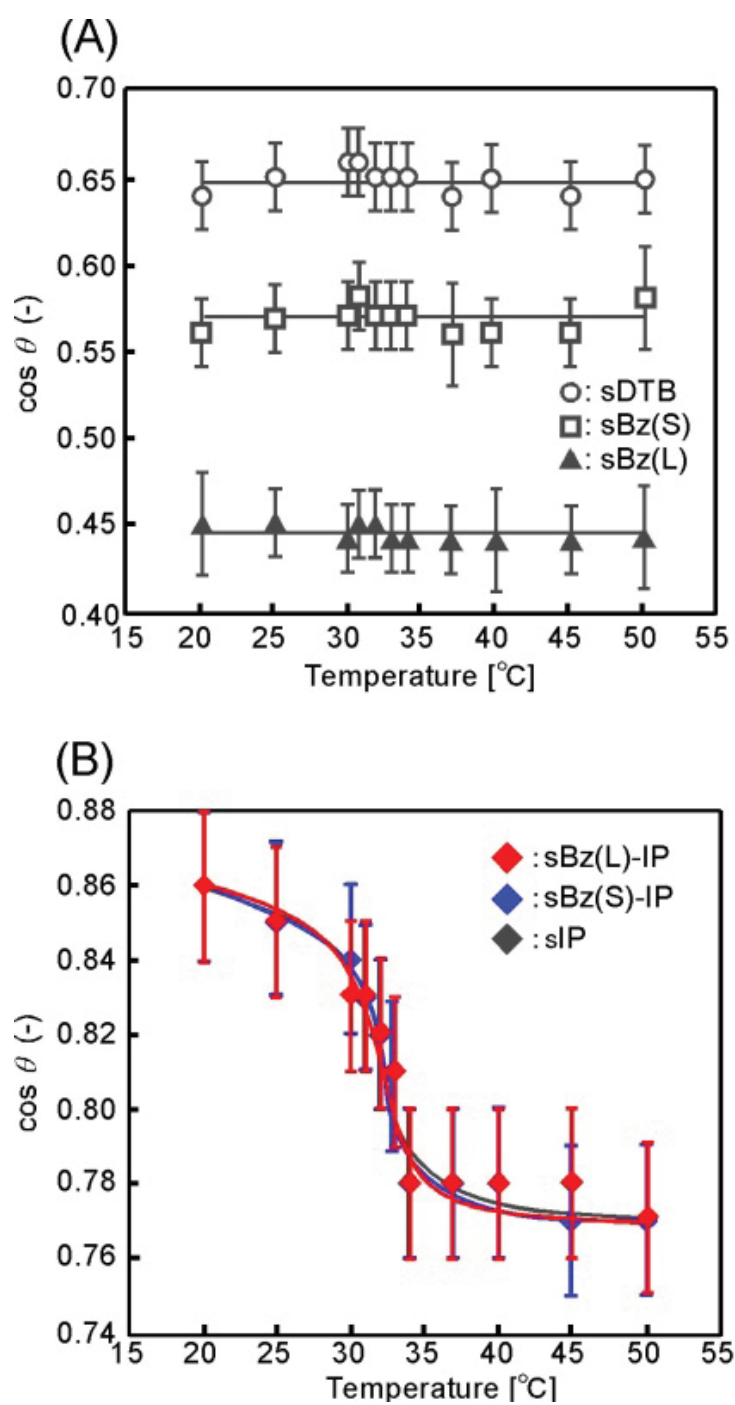


Figure 2.5 (A) Static water contact angle measurements for sBz(L), sBz(S) and sDTB at various temperatures. (B) Static water contact angle measurements for sBz(L)-IP, sBz(S)-IP and sIP at various temperatures.

2.4.6 各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の初期接着／脱着挙動の観察

各ポリマー修飾基板および CPDTB 固定化基板上における細胞の初期接着および脱着挙動について検討した。使用したウシ頸動脈由来血管内皮細胞(今後は細胞と表記)は血管内皮に存在する細胞のため細胞シートの移植などを考慮した場合有用であると考え使用した。各基板上において細胞を 37°C、24 時間培養した際の経時的な細胞接着数の変化を Figure 2.6 に、経時的に観察した細胞の初期接着性および 20°C の低温に基板を静置した際の細胞の形態変化を Figure 2.7 に示す。

Figure 2.6 より、37°C、24 時間培養した結果、各基板上において細胞の接着・伸展が確認できた。また、コントロールの sDTB、ポリマーを修飾した sBz(S)-IP、sBz(S)、sIP では細胞播種後 6 時間で播種した細胞の 70~90%の細胞が基板上に接着・伸展し、細胞播種後 24 時間後ではほぼすべての播種した細胞の接着・伸展を確認した。これは、sDTB と比較して各ポリマーがグラフトされている各基板では細胞の接着性に違いが確認されなかった。一方で、sBz(S)-IP、sBz(S)、sIP はグラフトされている高分子鎖の構造や静的接触角などの物性は違いを示したが、細胞の接着・伸展に影響を与えるほどの違いは生じなかったと考えられる。また、Figure 2.7 より、sBz(S)-IP は sIP と比較して、第一層目に PBzMA がグラフトされているにも関わらず、細胞の接着・伸展に大きな差は示されなかった。しかしながら sBz(S)と比較して多くの PBzMA がグラフトされている sBz(L)では細胞播種後 24 時間で播種した細胞の約 60%、sBz(L)上に PNIPAAm をグラフトした sBz(L)-IP では細胞播種後 24 時間で約 20%程度の細胞の接着・伸展が認められた。このとき、sBz(L)の物性評価において、他の基板と比較して静的接触角測定において最も疎水性を示しており、細胞の接着数がコントロールの基板と同等であった sBz(S)と比較して約 2 倍の量の PBzMA が基板上にグラフトされている。この結果より、PBzMA のグラフト量を約 0.28 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 付近に制御することで、細胞の接着・伸展に影響を与えないことが示された。以上のことから、基板表面上に PBzMA を多くグラフトした場合、基板表面上のぬれ性が高い疎水性になったことで細胞にとって接着が抑制される表面になった、sBz(S)と比較して sBz(L)では接着タンパク質の吸着が抑制されことで細胞の接着性が低下した、細胞と基板表面の物理化学的相互作用の低下によって細胞の接着性が低下した、などが考えられる。いずれにしても、PBzMA

の導入量が増加するに連れて、細胞の接着性の低下が確認された。次に、sBz(L)-IP は他の基板と比較して最も細胞の接着数が最小であった。これは、細胞の接着数が比較的少なかった sBz(L)に PNIPAAm がグラフトされたことで、高分子ブラシ表面と細胞の接着に関する物理化学的相互作用が抑制されたためではないかと考えられる。また、既往研究では NIH-3T3 マウス線維芽細胞、C2C12 筋芽細胞、またはウシ血管内皮細胞を用いた実験において、基板表面が硬いものでは細胞膜上の細胞接着斑というタンパク質の表面を引っ張る牽引力を細胞が感知することで接着・伸展するのに対し、柔軟な表面では牽引力の検出が困難となり接着性が低下するという結果が報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。また、基板上に高分子層を構築する際に、高分子層の厚みが約 25 nm 程度の場合、下層に存在する材料の硬さ、電荷、表面ぬれ性が細胞の接着性に影響することが報告されていることから、細胞は高分子層の下に存在する下層の特性を認識していることが示唆されている^{20), 21)}。そのため、sBz(L)-IP は PNIPAAm 層の下に多量の PBzMA 層がグラフトされており、同様の条件でグラフトされた PNIPAAm 鎖の厚さは約 3 nm と報告されていることから、細胞は下層の PBzMA 層を認識することでガラス表面と比較して、高い疎水性、柔軟な層などの影響により、細胞の接着性が低下したと考えられる²²⁾。

次に、基板上からの細胞の脱着性について検討するため、各基板を 20°C で低温培養を行ったところ、sDTB、sBz(S)、sBz(L)では PNIPAAm が修飾されていないため低温処理開始 2 時間経過後も、ほぼすべての細胞が接着したままだった。一部の細胞が基板上から脱着しているが、これは 20°C に静置したことにより細胞の活性が失われたことなどが考えられる。一方、PNIPAAm グラフト表面である各 sBz-IP では低温処理開始 30 分、sIP は低温処理開始 2 時間で基板表面上からすべての細胞の脱着を確認した。これは上層に PNIPAAm 層、下層に PBzMA 層をグラフトしたことで、PNIPAAm 単層の基板と比較して細胞と基板の相互作用が低下したために、細胞の脱着が促進されたと考えられる。その他に、sIP では PNIPAAm 鎖がガラス基板表面から生長した構造だが、各ブロック共重合体ブラシ表面では PNIPAAm 鎖が PBzMA 鎖の末端から生長している。既往研究において、グラフトされたポリマー鎖の上部におけるポリマー層の水和挙動は比較的大きな運動性を有しており、今回作製したブロック共重合体ブラシ表面においても、低温で水和した際に PNIPAAm 単層の

基板と比較して PBzMA 層が存在することで PNIPAAm 鎖上部のポリマー層の運動性が比較的大きくなったことで、細胞の脱着が促進したと考えられる^{12),22)}。

以上より、ブロック共重合体ブラシ表面では PBzMA の導入量を調節することで、PNIPAAm 単層の基板と比較して同等の細胞の初期接着性を有しており、また、細胞の脱着を促進させることができた。

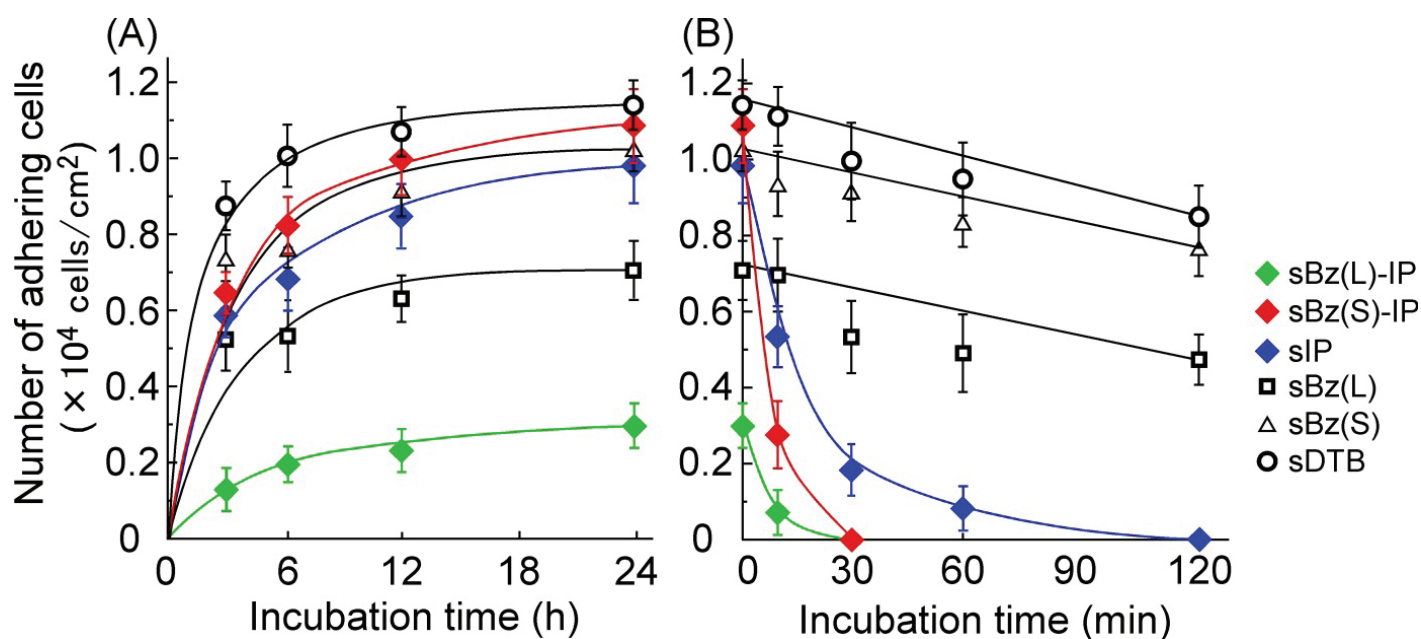
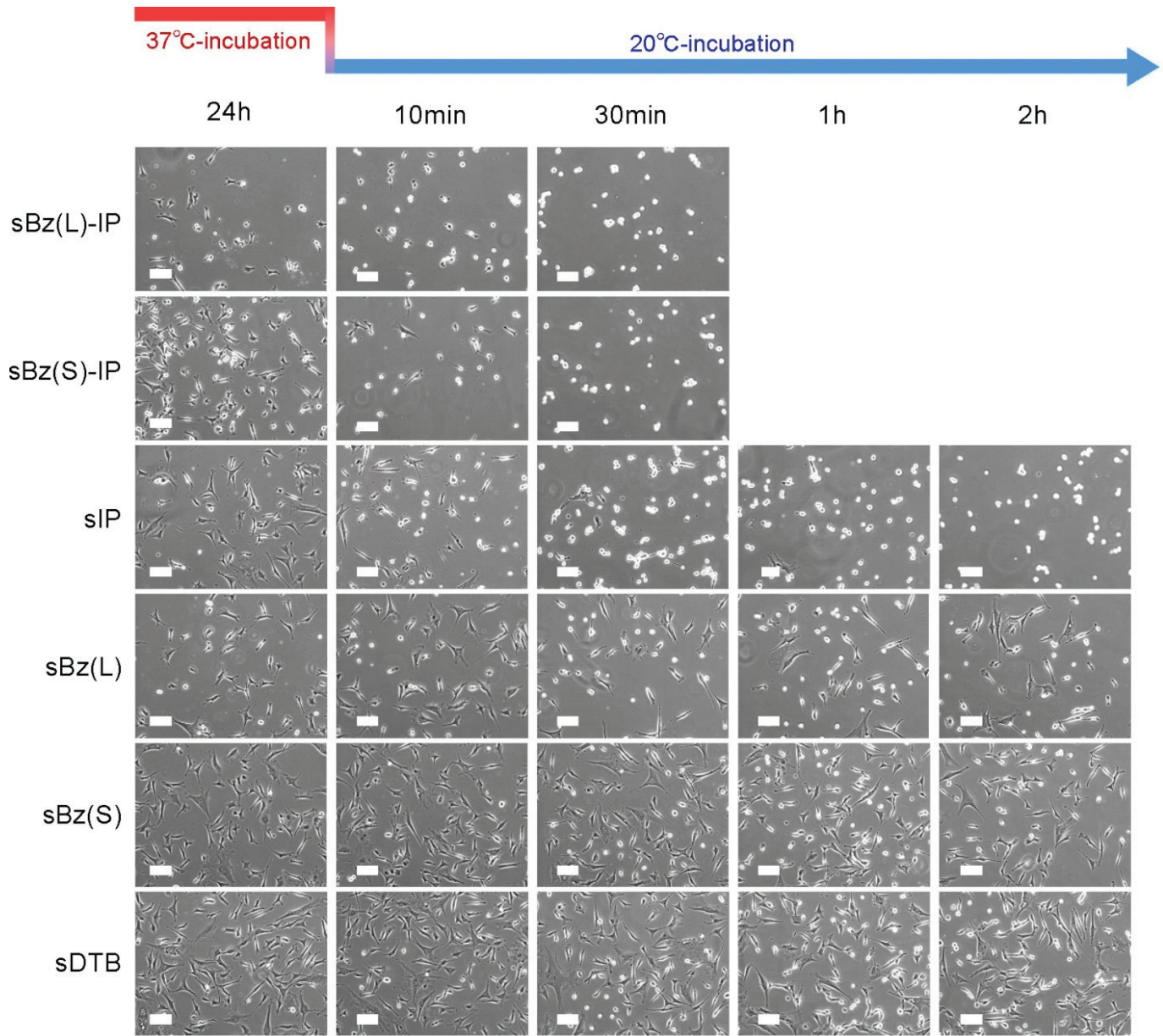


Figure 2.6 (A) Cell adhesion behavior on various surfaces, and (B) cell detachment behavior from various surfaces. Cells were incubated at 37°C for 24h (A) and then at 20°C for 2h (B).



**Figure 2.7 Cell morphologies at 37°C for 24h and 20°C for 2h on various surfaces.
Scale bar: 100 μm .**

2.4.7 各ポリマー修飾基板表面に対する細胞の接着・増殖挙動の評価

各ポリマー修飾基板および CPDTB 固定化基板上における細胞の初期接着性および増殖の挙動を、各基板上において 37°C、72 時間培養した際の経時的に観察した細胞の接着・増殖した際の細胞の形態変化を Figure 2.8 に、経時的な細胞接着数の変化を Figure 2.9 に示す。また、各基板における播種した細胞が 2 倍に増殖するのに必要な時間である倍加時間を算出した。

2.4.6 の Figure 2.6 より、sDTB、sBz(S)、sIP および sBz(S)-IP はそれぞれ初期接着数が培養 24 時間においてそれぞれ $1.0 \sim 1.1 \times 10^4$ cells/cm² の間となり同等だったが、細胞の増殖性では sDTB と比較して sBz、sIP、sBz(S)-IP はわずかに低下することが確認できた。また、倍加時間においても sDTB の 34 時間と比較してそれぞれ 34、39、35 時間となり、基板上にポリマーがグラフトされたことで細胞の増殖が抑制されることが確認できた。しかしながら、細胞の初期接着数と同様に sBz(S)-IP と PNIPAAm 単層の sIP と比較すると細胞の増殖に差異がないことが確認されたことから、PBzMA の導入量を調節することで、細胞増殖性に影響を与えることなく基板の設計が可能であることが示された。次に、sBz(L)および sBz(L)-IP の細胞の初期接着は 2.4.6 の Figure 2.6 と同様に少なく、37°C、72 時間培養後における細胞の増殖はほとんど観察されなかった。細胞の倍加時間においてもそれぞれ sBz(L) は 55 および sBz(L)-IP は 363 時間と、その他の基板と比較して多くの時間が必要であることが示された。これは、細胞の初期接着の際と同様に、sBz(L)は PBzMA のグラフト量が多くなったことで基板表面の疎水性が高くなった。細胞は疎水性が強い場合において細胞の接着が抑制される報告がされており、sBz(L)においても疎水性が強くなったことで、細胞の接着性が低下し、細胞の増殖も抑制されたと考えられる。また、sBz(L)-IP においても、細胞の初期接着が抑制された結果と同様に、PNIPAAm が sBz(L)上にグラフトされたことで細胞と基板表面の相互作用の低下、表面硬さがガラス基板と比較して柔軟になったことで細胞接着性の低下および増殖が困難になった、などが考えられる。

以上の結果から、ブロック共重合体ブラシ表面は PBzMA の導入量を調節することで、PNIPAAm 単層の sIP と比較して細胞の増殖に差異がないことがわかった。

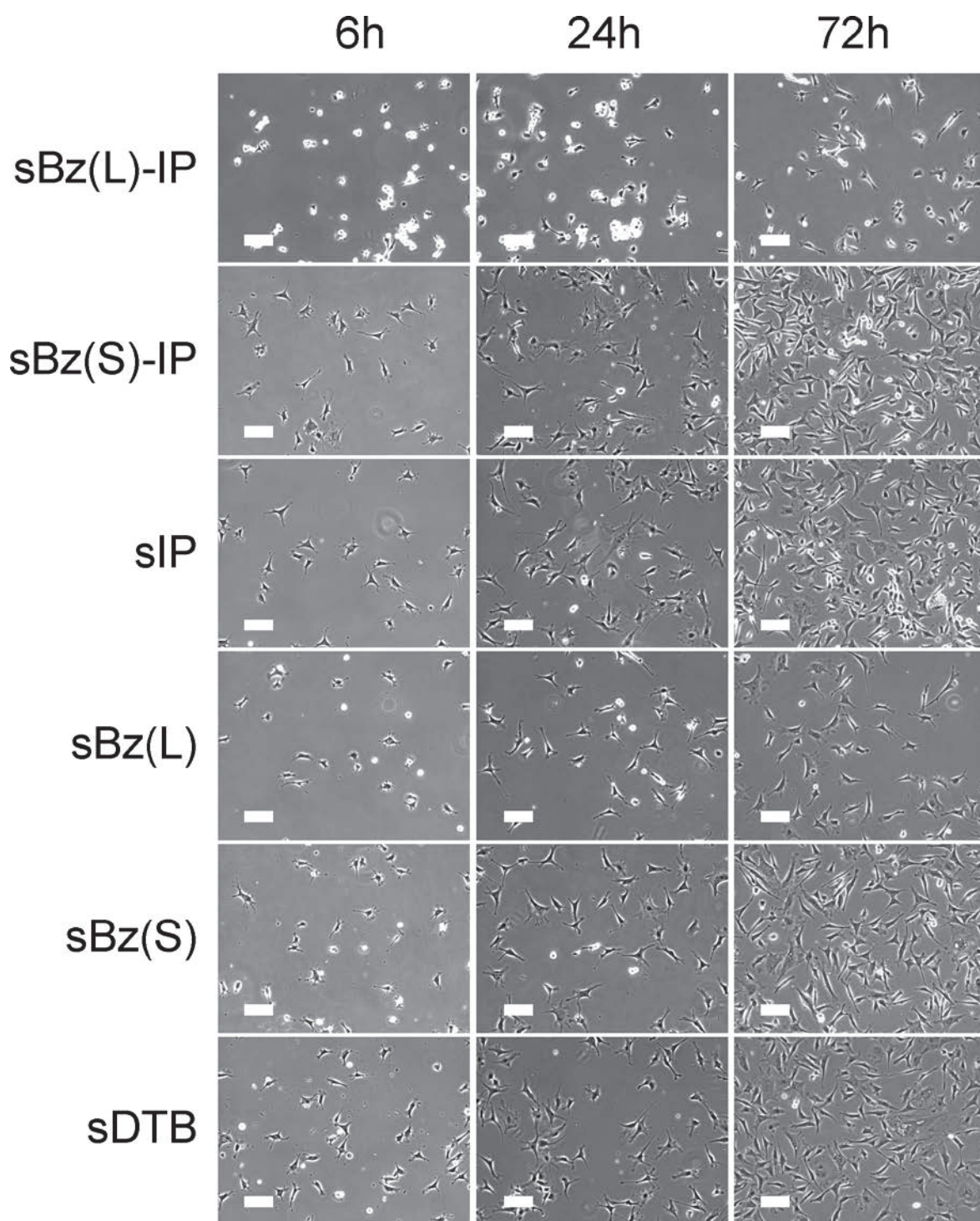


Figure 2.8 Cell morphologies at 37°C for 72h cultures on various surfaces. Scale bar: 100 μm .

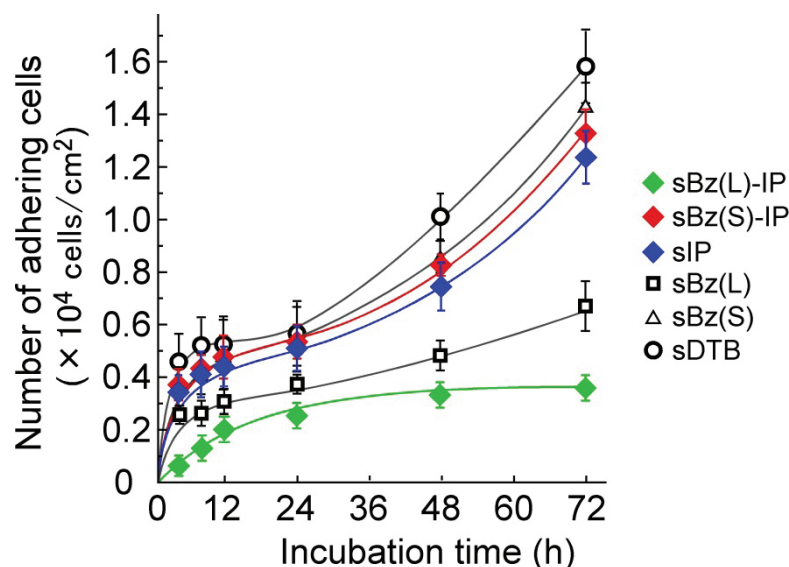


Figure 2.9 Cell adhesion and growth behavior at 37°C for 72h on various surfaces.

2.4.8 各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収

各基板上に細胞を 1×10^5 cells/cm² の条件で播種し、37°C で 5 日または 7 日間培養した位相差顕微鏡画像を Figure 2.10、各 PNIPAAm グラフト基板上で細胞が基板全面に増殖したコンフルエント状態になったものを 20°C のインキュベータに静置し、細胞シート回収時の形態の経時変化と回収するまでに要した時間を Figure 2.11 に示す。また、20°C での培養に要した時間に対して細胞シートが基板上から剥離した領域についてプロットしたグラフを Figure 2.12 に示す。

各基板に対して細胞播種後、sDTB、sBz(S)は培養開始 2 日、sDTB、sBz(S)に PNIPAAm をグラフトした sIP、sBz(S)-IP では培養開始 3~5 日で細胞がコンフルエントになった。このとき、PNIPAAm を修飾する前後の基板で、コンフルエントになるまでに数日間の差が生じているが、これは 2.4.7 の Figure 2.9 からそれぞれ倍加時間が 4~5 時間長くなっている。これは、PNIPAAm 鎖のグラフト量が増加すると細胞の増殖が遅くなることが報告されていることから、コンフルエントまでに長時間を要したと考えられる²⁾。一方、細胞の接着・増殖が抑制されていた sBz(L)、sBz(L)-IP は 7 日以上培養を行っても細胞はコンフルエントにならなかった。これは 2.4.6 の Figure 2.6 (A)、2.4.7 の Figure 2.9 が示すように、sBz(L)、sBz(L)-IP は細胞の播種密度を高くしても細胞の接着性が低く、sBz(L)、sBz(L)-IP は細胞の

増殖が非常に遅いことから 7 日間以上の培養においてもコンフルエントにならなかったことが示唆された。以上より、PBzMA のグラフト量を調節することで、ブロック共重合体ブラシ表面においても細胞がコンフルエントになることを確認した。

細胞がコンフルエントになった各基板を 20°C のインキュベータに静置して低温培養を行った。PNIPAAm がグラフトされていない sDTB、sBz(S) では 24 時間低温に静置しても基板上から細胞が剥離することはなかった。一方、PNIPAAm がグラフトされている基板では、細胞同士が結合したままシート状に剥離した。この細胞シートの剥離挙動を経時的に観察した結果、sBz(S)-IP では低温処理開始約 10 分、sIP では低温処理開始約 35 分で剥離し始めた。最終的に sBz(S)-IP では低温処理開始約 21 分、sIP では 62 分で基板上から細胞をシート状の組織として回収することができた。また、剥離開始から完了に要した時間は、sBz(S)-IP は約 10 分、sIP では約 30 分かかっている。これは 2.4.6 の Figure2.6 (A) の細胞の脱着挙動の結果から、基板表面と細胞間の相互作用の低下、PBzMA 鎖の末端と基板上にグラフトされた PNIPAAm 鎖の運動性の違いなどが影響していると考えられる。その他に細胞シートは基板上で細胞がコンフルエントの状態が存在しているため、細胞と細胞が連結していることによって、基板上から一部で剥離し始めると、それに連動して隣あっている細胞も剥離する。これは、細胞間の接着はアクチンというタンパク質が多数重合したアクチンフィラメント(アクチン F)とよばれる構造体によって細胞と細胞が接着結合することになる。そのため、低温に静置した場合、細胞シートが基板上から剥離し始めると、細胞間がアクチン F を通じて接着していることにより、細胞間が引かれる形となり、細胞シートは収縮した形状となる。このとき、この収縮挙動も細胞シートが剥離する際の駆動力となるため、2.4.6 の Figure2.6 (A) における単一の細胞の脱着挙動の結果と比較して、両基板共に細胞の剥離速度が速くなったと考えられる^{24),25)}。

以上の結果から、ブロック共重合体ブラシ表面から細胞シートの回収が可能であり、ブロック共重合体ブラシ表面にすることで、PNIPAAm 単層の sIP と比較して細胞シートの剥離速度を向上させ、剥離時間の短縮に成功した。

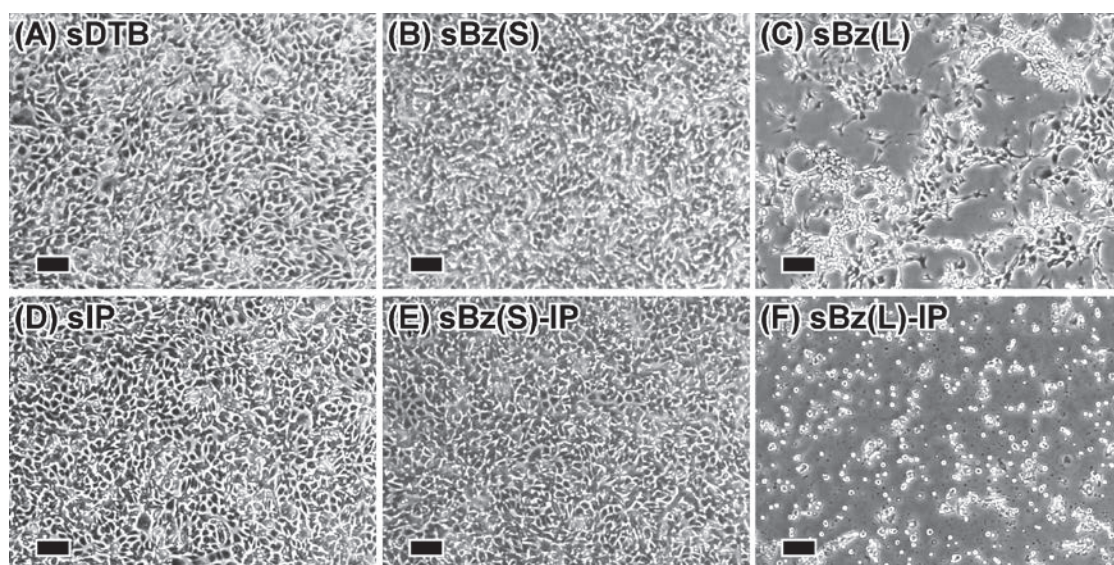


Figure 2.10 Microscopic photographs of cultured cells at 37°C for 5 days after cell seeding on (A) sDTB, (B) sBz(S), (C) sBz(L), (D) sIP, (E) sBz(S)-IP, and (F) sBz(L)-IP. Scale bar: 100 μm .

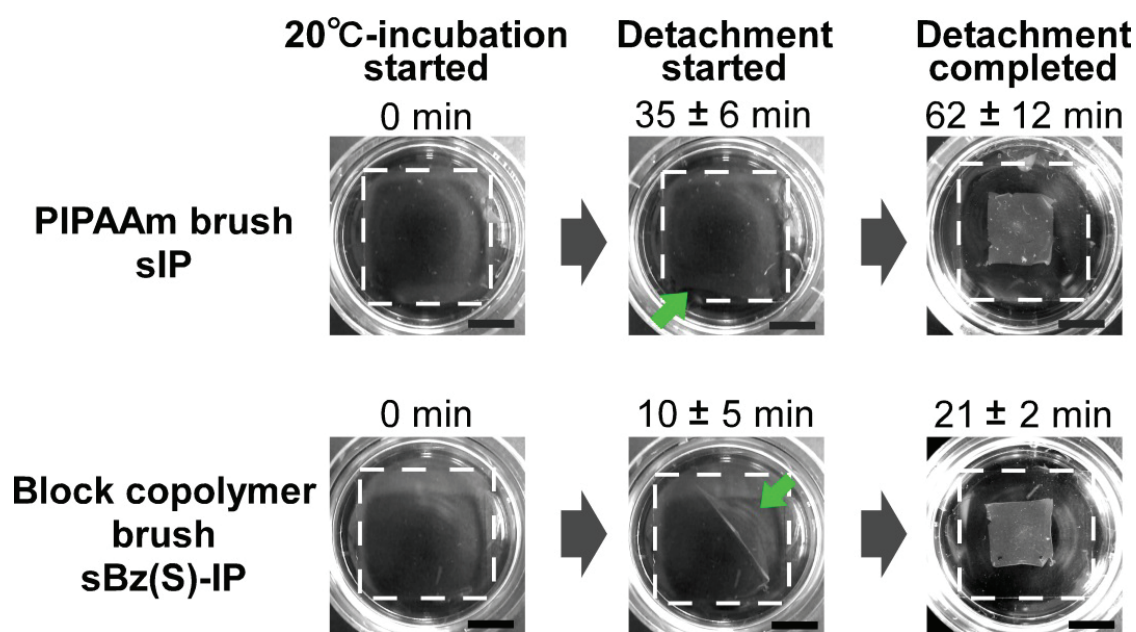


Figure 2.11 Spontaneous cell sheets harvesting from sIP and sBz(S)-IP. Harvesting initiated at 35 ± 6 min (sIP) and 10 ± 5 min (sBz(S)-IP). Harvesting were completed after 62 ± 12 min (sIP) and 21 ± 2 min (sBz(S)-IP) ($n=3$). White-dashed lines indicate the edges of glass surfaces. Scale bars: 1 cm.

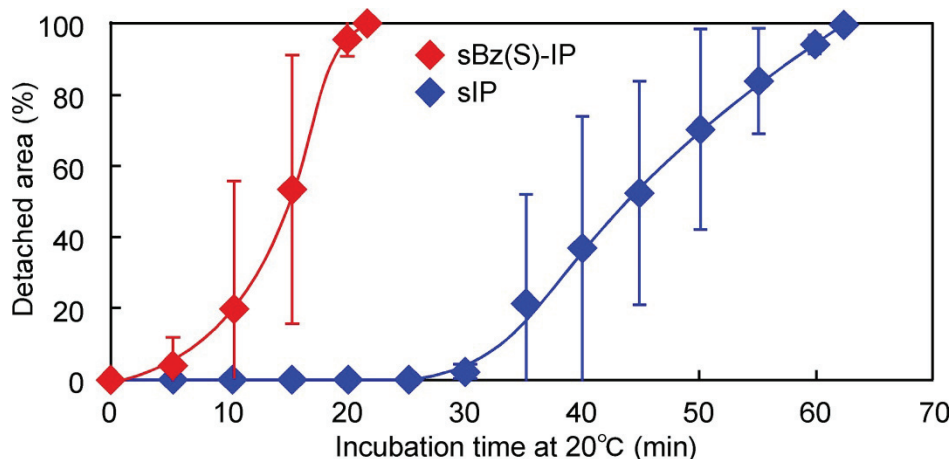


Figure 2.12 Average harvested areas for cell sheets recovered from sIP and sBz(S)-IP with culture area of 6.3 cm² as a function of incubation time. Incubation temperature: 20°C.

2.5 結言

作製した基板の物性評価より、SI-RAFT 重合によって温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面を作製できることが示された。このとき、BzMA のモノマー濃度を調節することで、基板表面上に導入される PBzMA のグラフト量を変えることが可能であった。また、静的接触角測定による基板表面のぬれ性の変化は、PNIPAAm 単層の基板においてもブロック共重合体ブラシ表面においても、LCST32°C を境に親・疎水性が変化することが示された。作製した基板上における BAEC の接着・増殖/脱着挙動の結果は、疎水性高分子 PBzMA グラフト基板上では、PBzMA のグラフト量が増加するにつれて細胞の接着・増殖が抑制される結果が得られた。しかしながら、PBzMA の導入量を調節することで、ポリマー未修飾の CTA 固定化基板 sDTB と比較して細胞の接着・増殖挙動が同等の基板になることが確認できた。次に、PBzMA グラフト基板の上層に PNIPAAm をグラフトしたブロック共重合体ブラシ表面では、下層の PBzMA のグラフト量が増加するに連れて、基板上への細胞の接着・増殖が困難となった。一方で、ブロック共重合体ブラシ表面において PBzMA の導入量を調節した sBz(S)-IP では、PNIPAAm 単層の構造を有する sIP と同等の細胞の接着・増殖を示した。作製した基板上に播種した細胞がコンフルエントになるまで培養後、細胞を

シート状の組織として回収するため各 PNIPAAm グラフト基板を 20°C の低温に静置して培養した結果、sBz(S)-IP では低温処理開始約 21 分で、sIP では 62 分で細胞シートとして回収することに成功した。これはブロック共重合体ブラシ表面にすることで細胞の剥離速度に影響を与えており、基板上から PNIPAAm がグラフトされている sIP と比較して PBzMA 鎖の末端から PNIPAAm がグラフトされた構造により、細胞と基板表面の相互作用が低下、PNIPAAm 鎖の運動性の違いなどが剥離速度に影響を与えていると考えられる。以上の結果から、ブロック共重合体ブラシ表面において、下層の PBzMA 層の導入量を調節することで、細胞の接着・増殖挙動に影響を与えることなく、細胞シートの剥離速度を促進可能な基板を作製できることがわかった。

2.6 参考文献

- 1) Kikuchi, A., Okuhara, M., Karikusa, F., Sakurai, Y., Okano, T., 1998. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted surfaces, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 1331-1348.
- 2) Takahashi, H., Nakayama, M., Yamato, M., Okano, T., 2010. Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest, *Biomacromolecules*, **11**, 1991-1999.
- 3) Tamada, Y., Ikada, Y., 1994. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 783-789.
- 4) Thang, H. S., Chong, K. Y. B., Mayadunne, A. T. R., Moad, G., Rizzardo, E., 1999. A novel synthesis of functional dithioesters, dithiocarbamates, xanthates and trithiocarbonates, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2435-2438.
- 5) Mitsukami, Y., Donovan, S. M., Lowe, B. A., McCormick, L. C., 2001. Water-soluble polymers. 81. Direct synthesis of hydrophilic styrenic-based homopolymers and block copolymers in aqueous solution via RAFT, *Macromolecules*, **34**, 2248-2256.
- 6) Mizutani, A., Kikuchi, A., Yamato, M., Kanazawa, H., Okano, T., 2008. Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells, *Biomaterials*, **29**,

2073-2081.

- 7) 日本表面科学会編, 1998. X線光電子分光法, 丸善株式会社 (東京), pp. 4-20.
- 8) 荒木峻, 益子洋一郎, 山本修, 鎌田利紘, 2007. KIEMLE, W. S. 有機化合物のスペクトルによる同定法—MS, IR, NMR の併用—, 東京化学同人 (東京), pp. 103-106.
- 9) Mandal, K. T., Woo, M. E., 1999. Marginal miscibility and solvent-dependent phase behavior in solution-blended poly (vinyl methyl ether)/poly(benzyl methacrylate), *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 1143-1149.
- 10) Mandal, K. T., Fleming, S. M., Walt, R. D., 2000. Production of hollow polymeric microspheres by surface-confined living radical polymerization on silica templates, *Chem. Mater.*, **12**, 3481-3487.
- 11) 野瀬卓平, 堀江一之, 金谷利治, 2006. 若手研究者のための有機・高分子測定ラボガイド, 講談社 (東京), pp. 1-30.
- 12) Baum, M., Brittain, J. W., 2002. Synthesis of polymer brushes on silicate substrates via reversible addition fragmentation chain transfer technique, *Macromolecules*, **35**, 610-615.
- 13) Neradovic, D., Soga, O., Van Nostrum, F. C., Hennink, E. W., 2004. The effect of the processing and formulation parameters on the size of nanoparticles based on block copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(*N*-isopropylacrylamide) with and without hydrolytically sensitive groups, *Biomaterials*, **25**, 2409-2418.
- 14) Idota, N., Kikuchi, A., Kobayashi, J., Akiyama, Y., Sakai, K., Okano, T., 2006. Thermal modulated interaction of aqueous steroids using polymer-grafted capillaries, *Langmuir*, **22**, 425-430.
- 15) Yakushiji, T., Sakai, K., Kikuchi, A., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T., 1998. Graft architectural effects on thermoresponsive wettability changes of poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified surfaces, *Langmuir*, **14**, 4657-4662.
- 16) Schneider, A., Francius, G., Obeid, R., Schwinte, P., Hemmerle, J., Frisch, B., Schaaf, P., Voegel, J. C., Senger, B., Picart, C., 2006. Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: Influence of film stiffness on cell adhesion, *Langmuir*, **22**, 1193-1200.

- 17) Vazquez, C. P., Boudou, T., Dulong, V., Nicolas, C., Picart, C., Glinel, K., 2009. Variation of polyelectrolyte film stiffness by photo-cross-linking: A new way to control cell adhesion, *Langmuir*, **25**, 3556-3563.
- 18) Ren, K., Fourel, L., Rouviere, C. G., Albiges-Rizo, C., Picart, C., 2010. Manipulation of the adhesive behavior of skeletal muscle cells on soft and stiff polyelectrolyte multilayers, *Acta Biomaterialia*, **6**, 4238-4248.
- 19) Riveline, D., Zamir, E., Balaban, Q. N., Schwarz, S. U., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., Bershadsky, D. A., 2001. Focal contacts as mechanosensors: Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism, *J. Cell Biol.*, **126**, 1175-1186.
- 20) Shimomura, S., Matsuno, H., Tanaka, K., 2013. Effect of Mechanical Instability of Polymer Scaffolds on Cell Adhesion, *Langmuir*, **29**, 11087-11092.
- 21) Kuang, J., Messersmith, B. P., Universal Surface-Initiated Polymerization of Antifouling Zwitterionic Brushes Using a Mussel-Mimetic Peptide Initiator, *Langmuir*, **28**, 7258-7266.
- 22) Halperin, A., Kröger, M., Theoretical considerations on mechanisms of harvesting cells cultured on thermoresponsive polymer brushes, *Biomaterials*, **33**, 4975-4987.
- 23) Akiyama, Y., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T., 2004. Ultrathin poly(*N*-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control, *Langmuir*, **20**, 5506-5511.
- 24) Kushida, A., Yamato, M., Kikuchi, A., Sakurai, Y., Okano, T., 1999. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 355-362.
- 25) Kushida, A., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T., 2001. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: The noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 37-46.

第3章

温度応答性高分子ブラシ表面における

末端官能基の違いが

細胞の接着温度領域に与える影響

3.1 緒言

第2章では、SI-RAFT 重合を用いて温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面を作製し、下層に疎水性高分子 PBzMA、上層に温度応答性高分子 PNIPAAm を導入することで、PNIPAAm 単層の基板と比較して細胞の剥離挙動の加速に成功した。ブロック共重合体ブラシ表面を作製する際に、PBzMA 鎖の生長末端に存在する CTA 由来の末端官能基を用いて、PBzMA 鎖の生長末端から PNIPAAm 鎖をグラフトした。この末端官能基はブロック共重合体構築のための多段階の重合に関与する以外に、還元反応によって末端官能基をチオール化した後、さまざまな機能性官能基に置換することが可能である¹⁾⁶⁾。また、末端官能基は PNIPAAm の LCST に対して影響を与えることが知られている。一般に PNIPAAm の末端官能基の親水性/疎水性の違いは高分子鎖の脱水和に顕著な影響を及ぼし、疎水性官能基では LCST の低温シフト、親水性官能基では高温シフトを生起することが報告されている⁷⁾¹²⁾。以上の特性を用いて、SI-RAFT 重合によって基板上に PNIPAAm をグラフトし、その末端官能基を親水性または疎水性に置換する。末端官能基の親・疎水性により、PNIPAAm 鎖の LCST は高温または低温側にシフトすることで、PNIPAAm 鎖の LCST の違いを利用した細胞の接着開始温度の制御が期待される。

以上のことから、第3章では疎水性官能基ドデシル基を片末端に有する CTA を用いて SI-RAFT 重合を行うことで、基板表面上の PNIPAAm 鎖の生長末端にドデシル基を導入する。続いて、還元反応によって末端基を親水性官能基であるマレイミド基に置換することで、末端官能基が PNIPAAm 鎖の相転移挙動およびそれにもなう細胞の接着・脱着挙動に与える影響について検討することを目的とした。

3.2 実験方法

以下に示す試薬を用いた合成に関する実験は、ドラフト内で行った。

3.2.1 試薬

本章で使用した試薬を以下に示す。

(1) *N*-イソプロピルアクリルアミド(*N*-isopropylacrylamide, NIPAAm)

興人(東京)より提供されたものを、第2章 2.2.1 の(1)で記したように精製したものをそのまま用いた。

(2) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane)

東京化成工業(東京)から購入したものをそのまま使用した。

(3) 4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸) (4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid))

和光純薬工業(大阪)のから購入したものをそのまま使用した。

(4) 4-Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanoic acid (97%) (trithiocarbonate-based CTA, 本章では略称を CTA とした。)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したものをそのまま使用した。

(5) マレイミド(Maleimide)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(6) *N*-ヒドロキシコハク酸イミド(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(7) *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(8) 水素化ホウ素ナトリウム(sodium borohydride, NaBH₄)

関東化学(東京)から購入したものをそのまま使用した。

(9) ハイドロサルファイトナトリウム(sodium Hypodisulfite, Na₂S₂O₄)

東京化成工業(東京)から購入したものをそのまま使用した。

(10) メタノール(methanol)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(11) *n*-ヘキサン(*n*-hexane)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(12) アセトン(acetone)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(13) *N,N*-ジメチルホルムアミド(脱水) (*N,N*-dimethylformamide, Dehydrated)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(14) 1,4-ジオキサン(1,4-dioxane)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(15) トルエン(脱水) (Toluene, Dehydrated)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(16) ジクロロメタン(脱水) (Dichloromethane, Dehydrated)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(17) 塩酸(hydrochloric acid)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(18) 水酸化ナトリウム(sodium hydroxide)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(19) ジエチルエーテル(diethyl ether)

和光純薬工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

(20) ダルベッコリン酸緩衝溶液(Dulbecco's phosphate buffered saline, PBS)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したPBS(液体)を滅菌水で10倍に希釈したものを使用した。

(21) トリプシン-EDTA 溶液(trypsin-EDTA solution: 0.1 % trypsin-1.1mM EDTA)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したものを PBS で 10 倍に希釈して使用した。

(22) ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したものをそのまま使用した。

(23) ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(penicillin-streptomycin solution, AB: 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入したものをそのまま使用した。

(24) ウシ胎児血清(fetal bovine serum, Mexico origin, FBS)

Bioserum (Victoria, Australia) から購入したものをそのまま使用した。

(25) ウシ頸動脈由来血管内皮細胞(bovine carotid endothelial cells, EC, JCRB0099)

ヒューマンサイエンス研究資源バンク(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

培養回数が 20～25 回の継代数の細胞を用いた。

- (26) ローダミン標識フィブロネクチン(Rhodamine-labeled fibronectin, FN)

Cytoskeleton (Denver, CO, USA)から購入したものをそのまま使用した。

- (27) ポリスチレン製細胞培養皿(tissue culture dish, polystyrene, Falcon 353003, 100 Φ x 20 mm, TCPS)

BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入したものをそのまま使用した。

- (28) ペトリディッシュ(Petri dish, Falcon 351008, 35 Φ x 10 mm)

BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) から購入したものをそのまま使用した。

- (29) 分画分子量 1,000 の再生セルローズ製透析膜(Spectra/Por 6) (dialysis membrane)

Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA) から購入したものをそのまま使用した。

- (30) カバーガラス(glass coverslip, 24×50 mm, 0.2 mm in thickness)

松浪硝子工業(大阪) から購入したものをそのまま使用した。

3.2.2 使用機器

- (1) 低温プラズマ放電装置(plasma dry cleaner, PX-1000), サムコ(京都)

使用条件: 酸素分圧: 0.1 mmHg, 照射強度: 400 W, 照射時間: 180 秒

- (2) 高速ゲル浸透クロマトグラフィー装置(gel permeation chromatography, HLC-8320GPC), 東ソー株式会社(東京)

使用条件: カラム: TSKgel Super AW2500, TSKgel Super AW3000, TSKgel Super AW4000, 流速: 0.6 mL/min, 温度: 40°C, 溶離液: DMF(50 mM LiCl 含む), 標準試料: poly(ethylene glycol (PEG), polystyrene (PSt), (両標準試料共に分子量既知, 分子量分布: 1.05 以下)

- (3) 全反射型フーリエ変換赤外分光装置(attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, ATR/FT-IR, Nicolet 6700), サーモフィッシャーサイエンティフィック(神奈川県)

使用条件: スキャン回数: 128 回, 分解能: 4, 光入射角度: 60°, 波数: 4000～650 cm⁻¹, 検出器: MCT/A, ビームスプリッター: KBr, 光源: IR, 使用窓材: Ge

- (4) X線光電子分光分析装置(x-ray photoelectron spectroscopy, K-Alpha), サーモフィッシャーサイエンティフィック(神奈川)
使用条件: 励起 X 線 monochromatic Al $K_{\alpha 1,2}$ 線(1486.6 eV), 光電子脱出角度(Take-off angle): 15°, X 線径: 100 μm , 測定範囲(結合エネルギー): 1400~0 eV
- (5) 接触角測定装置(contact angle meter, DSA100S), KRUSS(Germany)
使用条件: 水中気泡法による静的接触角測定法, 気泡容量: 5 μL
- (6) 紫外可視(UV-vis)分光光度計(V-660), 日本分光(東京)
使用条件: 最大吸収波長: 600 nm, 昇温および降温速度: 0.1 °C/min, 使用キュベット: EHC-477S, LCST の決定: 光透過度 50%のときの温度
- (7) ペルチェ式恒温セルホルダー(ETC-717), 日本分光(東京)
- (8) 遠心分離機(5910), 久保田商事(大阪)
使用条件: 温度: 4°C, 回転数: 800 rpm
- (9) クリーンベンチ(MCV-131BNF)
三洋電機(大阪)
- (10) インキュベーター(BNR-110M)
Espec corp(東京)
顕微鏡(蛍光・位相差) (ECLIPSE TE2000-U), ソフトウェア : AxioVision 4.6 software, ニコン(東京)
使用条件: 対物レンズ: 100×, 200×, 400×, 接眼レンズ: CFI 10×/22
- (11) デジタルカメラ(Lumix DMC-FX66)
パナソニック(東京)

3.2.3 第一級アミノ基導入ガラス基板の調製

酸素プラズマ処理(酸素分圧: 0.1 mmHg, 照射強度: 400 W, 照射時間: 180 秒)を行うことで、カバーガラス表面上に存在する有機物除去と-SiOH 基の活性化を行った。酸素プラズマ処理を行ったガラス基板をセパラブルフラスコ内に 62 枚設置し、フラスコ内の真空脱気-窒素置換を行い、最終的にフラスコ内に窒素を充填した。窒素フローを行いながら、フラ

スコ内に 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)を 2.5 μ L 含むトルエン 0.5 mL をフラスコ底部に滴下し、窒素雰囲気下、150°C で 20 時間還流した。反応終了後、ガラス基板をトルエン、次にメタノールでそれぞれ洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥した。これにより、第一級アミノ基を基板表面上に導入したガラス基板(APTES 固定化基板)を得た。

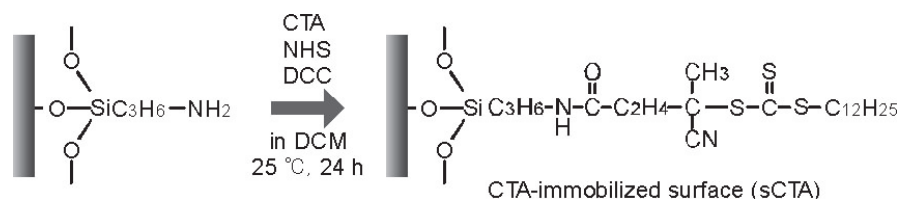
3.2.4 ガラス表面への末端ドデシル型連鎖移動剤の導入

3.2.4.1 末端ドデシル型連鎖移動剤の逆末端の活性エステル化

4-Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanoic acid (CTA: 1.25 mmol, 1413 mg)および *N*-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS) (1.88 mmol, 604 mg)を 500 mL ナスフラスコに加え、ジクロロメタン(DCM) (195 mL)を用いて室温で溶解した。溶解後、暗所、氷浴中に設置し、*N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) (1.88 mmol, 1083 mg)を溶解した DCM (5 mL)をゆっくりと 500 mL ナスフラスコ内に加えた。すべて加えてから 30 分後、常温に放置して、暗所で 20 時間攪拌しながら反応した。反応終了後、吸引ろ過を行うことで溶液中に生成した副生成物の *N,N*-ジシクロヘキシルウレアを取り除き、吸引瓶内に滴下したろ液を回収することで、片末端が活性エステル化された CTA を得た。

3.2.4.2 CTA 固定化基板の作製

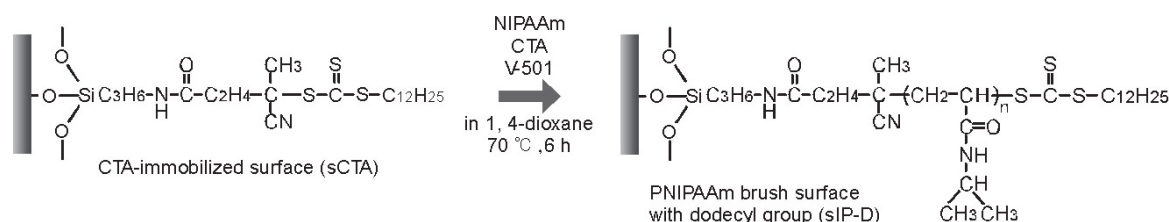
APTES 固定化基板をセパラブルフラスコ内に設置し、DCM (500 mL)中に浸漬した。基板設置後、3.2.4.1 で作製した活性エステル化 CTA 含有 DCM (200mL)をセパラブルフラスコに添加し、室温、暗所で 24 時間アミノリシス反応を行った。反応終了後、基板を DCM (250 mL)、アセトン (250 mL)で順次洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥することで APTES 固定化基板に CTA が固定化された CTA 固定化基板(sCTA)を得た。(Scheme 3.1)



Scheme 3.1 Immobilization of CTA on amino-functionalized glass coverslips.

3.2.5 SI-RAFT 重合による PNIPAAm ブラシ表面の作製

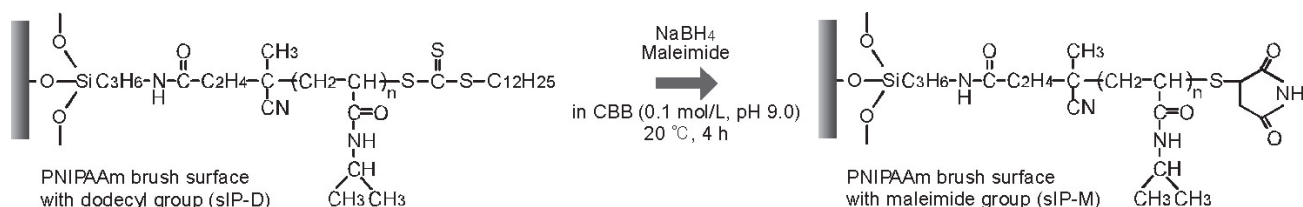
NIPAAm(0.30 mol, 33.94 g)、CTA(0.25 mmol, 101 mg)および V-501(0.05 mmol, 14 mg)を含む 1,4-ジオキサン (250 mL)中に sCTA を浸漬させ、反応溶液中の溶存酸素を十分に除去するために窒素ガスバブリングを 1 時間行うことで溶存酸素を除去した。窒素ガスバブリング後、窒素雰囲気下において 70°C、6 時間反応させた。反応終了後、基板を 250 mL のアセトン中で 1 時間攪拌することで、基板表面上に残存した有機物の除去を行った。攪拌終了後、室温で 3 時間減圧乾燥することで、末端ドデシル型 PNIPAAm ブラシ表面(sIP-D)を得た。(Scheme 3.2)



Scheme 3.2 PNIPAAm grafting via RAFT polymerization on the glass surfaces.

3.2.6 末端マレイミド型 PNIPAAm ブラシ表面の作製

末端官能基の親・疎水性の違いが基板の物性および細胞の与える影響について議論するため、作製した PNIPAAm ブラシ表面の末端官能基を親水性のマレイミド基に置換した。具体的にはマレイミド(6 mmol, 730 mg)、 NaBH_4 (100 mmol, 4730 mg)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.2 mmol, 35 mg)を含む炭酸緩衝液(200 mL, pH 9.0)中に sIP-D を浸漬させ、室温で 4 時間反応させた。反応終了後、基板を超純水 (250 mL)、アセトン (250 mL)で洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥することで末端マレイミド型 PNIPAAm ブラシ表面(sIP-M)を得た。(Scheme 3.3)



Scheme 3.3 Introduction of maleimide groups via reduction reaction on terminal groups.

3.2.7 ガラスビーズ上からの PNIPAAm 鎖の切り出し

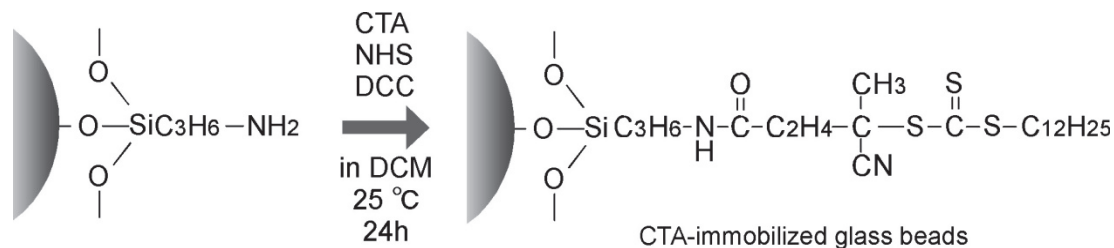
末端官能基の影響による PNIPAAm 鎖の LCST の変化は PNIPAAm 鎖の分子量に依存する。そのため基板表面上の PNIPAAm 鎖の分子量の測定と、PNIPAAm 鎖の LCST の測定を行った。具体的には、より多くの PNIPAAm を得るために、粒径 50 μm のガラスビーズ上に PNIPAAm を修飾し、ビーズ上から PNIPAAm を脱離させたものに対して GPC 測定を行い、分子量を測定した。

3.2.7.1 APTES 固定化ガラスビーズの作製

ガラスビーズ(Φ 50 μm , 60 g)を濃塩酸(12 mol/L)に浸漬させ、90°C、3h 反応させることで、表面上の有機物の除去および表面を活性化による水酸基の導入を行った。反応終了後、蒸留水、アセトンの順で洗浄を行い、洗浄後、室温で終夜減圧乾燥を行った。APTES を 0.5 v/v% 含むトルエン(200 mL)中に洗浄したガラスビーズを浸漬させて、窒素雰囲気下、室温で 20h 反応させた。反応終了後、トルエン(200 mL)、アセトン(200 mL)を用いて順次洗浄を行い、洗浄後、室温で 3 時間減圧乾燥を行った。乾燥終了後、APTES 固定化ガラスビーズを得た。

3.2.7.2 CTA 固定化ガラスビーズの作製

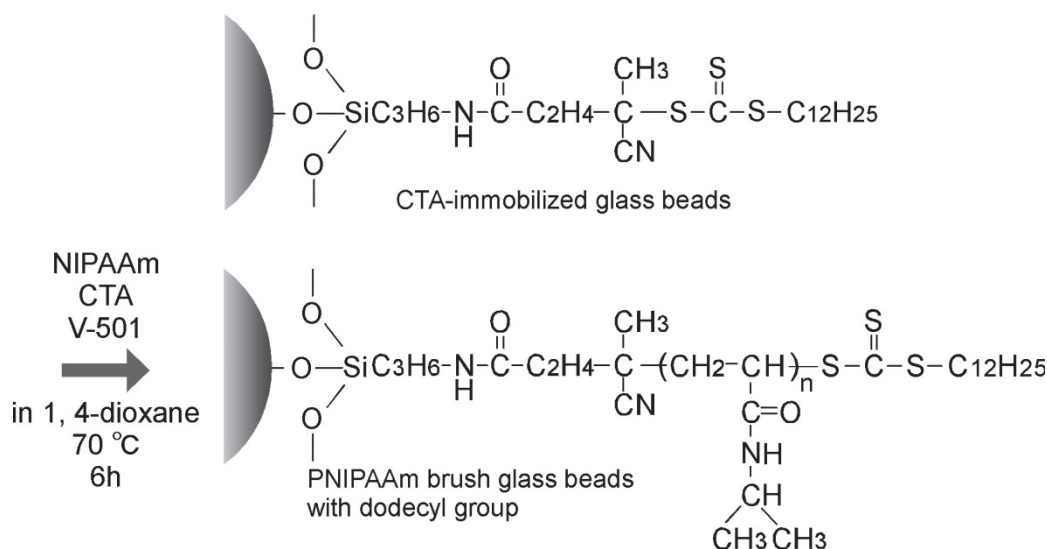
シランカップリング反応で作製した APTES 固定化ガラスビーズを、3.2.4.1 で合成した活性エステル化 CTA 含有 DCM (200mL)中に浸漬させ、室温、暗所で 24 時間アミノリシス反応を行った。反応終了後、ガラスビーズを DCM (250 mL)、アセトン (250 mL)で順次洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥させ、CTA 固定化ガラスビーズを得た。(Scheme 3.4)



Scheme 3.4 Immobilization of CTA on amino-functionalized glass beads.

3.2.7.3 末端ドデシル型 PNIPAAm グラフトガラスビーズの作製

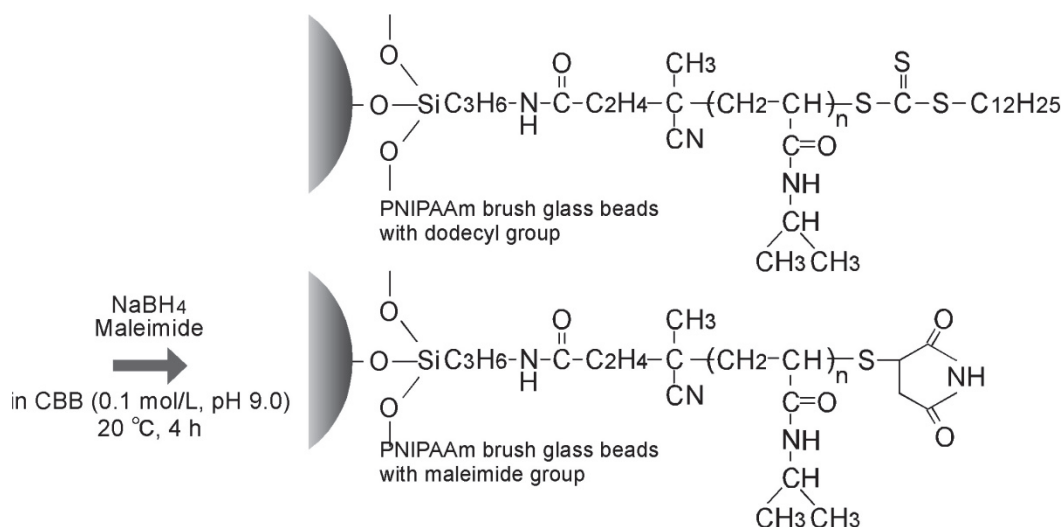
CTA 固定化ガラスビーズ(20 g)を NIPAAm(0.30 mol, 27.16 g)、CTA(0.25 mmol, 80 mg)および V-501(0.05 mmol, 12 mg)を含む 1,4-ジオキサン (200 mL)中に浸漬させ、1 時間窒素ガスバブリングすることで溶存酸素を除去した後、窒素雰囲気下、70 °C で 6 時間反応させた。反応終了後、ガラスビーズをアセトン(200 mL)中で 1 時間攪拌し、ビーズ表面上に残存した有機物を除去した。洗浄後、室温で 3 時間減圧乾燥し、CTA 固定化ガラスビーズに PNIPAAm をグラフトした PNIPAAm グラフトガラスビーズを得た。また反応終了後の反応溶液 10 mL をジエチルエーテル中に滴下し、PNIPAAm を再沈殿させた。再沈殿した PNIPAAm を回収し、室温で 3h 減圧乾燥することで、反応溶液中の PNIPAAm を回収した。(Scheme 3.5)



Scheme 3.5 PNIPAAm grafting via RAFT polymerization on the glass beads.

3.2.7.4 末端マレイミド型 PNIPAAm グラフトガラスビーズの作製

マレイミド(6 mmol, 730 mg)、NaBH₄ (100 mmol, 4730 mg)、Na₂S₂O₄ (0.2 mmol, 35 mg)を含む炭酸緩衝液(200 mL, 0.1 M, pH 9.0)中に末端ドデシル型 PNIPAAm グラフトガラスビーズ (20 g)を浸漬させ、室温で 4 時間反応させた。反応終了後、基板を超純水 (200 mL)、アセトン (200 mL)で洗浄し、室温で 3 時間減圧乾燥することで末端マレイミド型 PNIPAAm グラフトガラスビーズを得た。(Scheme 3.6)



Scheme 3.6 Introduction of maleimide groups via reduction reaction at terminal groups.

3.2.7.5 PNIPAAm グラフトガラスビーズ上からの PNIPAAm 鎖の切り出し

水酸化ナトリウム水溶液(10 M)中に末端マレイミド型 PNIPAAm グラフトガラスビーズ (20 g)を浸漬させ、室温で 24 時間攪拌することで、ガラスビーズ表面の溶解を行った。反応終了後、濃塩酸(12 N)を用いて溶液を中性にし、超純水 (200 mL)、アセトン (200 mL)の順で洗浄を行い、吸引濾過により濾液を回収した。回収した濾液をエバポレーターにより濃縮後、1 週間蒸留水で透析を行った。透析後、エバポレーターで濃縮し、濃縮した溶液を凍結乾燥することで、ガラスビーズ上の PNIPAAm 鎖を切り出した PNIPAAm を回収した。

3.3 回収した PNIPAAm および作製した各基板の物性評価

3.3.1 XPS 分析による各 PNIPAAm 修飾ガラス基板の評価

XPS を用いて作製した各ガラス基板表面上の元素組成について評価する。ガラス基板上の元素組成を調べることで、

- ① PNIPAAm がガラス基板に対してグラフトされているかの確認
- ② 得られた元素組成を解析し、主要元素の比を算出することで理論値との比較などの評価を行った。励起 X 線 monochromatic Al $K_{\alpha 1,2}$ 線(1486.6 eV)、光電子脱出角度

(Take-off angle)は試料表面に対して10°、およびX線径は100 μmとして測定を行った。

3.3.2 ATR/FT-IR 測定による PNIPAAm 修飾量の分析

作製したサンプルの PNIPAAm 修飾量を算出するために ATR/FT-IR を用いて PNIPAAm のグラフト量を評価した。具体的には、2.3.3 で得られた PNIPAAm の検量線より、ガラス基板表面に固定化された PNIPAAm のグラフト量について、その平均値と標準偏差 (Standard deviation, SD)値を評価した(n=3)。

3.3.3 回収したガラスビーズ上の PNIPAAm の数平均分子量と分子量分布の評価および基板表面上への PNIPAAm のグラフト密度の算出

ガラスビーズ上から切り出した PNIPAAm は回収した全量を 50 mM LiCl 含有 DMF 300 μL に溶解した。作製したサンプルを高速 GPC 装置(ポリ(エチレングリコール) (PEG) (分子量既知, 分子量分布: 1.05 以下)を用いて分子量に対する検量線を作成し、PEG 標準での分子量と分子量分布の算出を行なった高速 GPC 装置に 30 μL 注入することで、得られたクロマトグラムから、数平均分子量(M_n)と、分子量分布(M_w/M_n)を算出した。また、3.3.2 において得られた ATR/FT-IR 測定より算出した基板表面上の PNIPAAm のグラフト量を用いて、基板上の PNIPAAm 鎖のグラフト密度を下記に示す計算式を用いて算出した。

$$\text{Graft density} = \frac{m_p N_A}{M_n} \quad (1)$$

ここで、 m_p はPNIPAAmのグラフト量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、 N_A はアボガドロ定数($6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)、 M_n はPNIPAAmの数平均分子量(M_n)とする。

3.3.4 紫外可視分光光度計による各 PNIPAAm の LCST の評価

ガラスビーズ上から切り出した PNIPAAm と同等の分子量を有する PNIPAAm を、基板作製時と同様の条件で作製し、末端官能基の違いが PNIPAAm の LCST に与える影響につ

いて検討した。作製した PNIPAAm は 10.0 mg/mL の条件で PBS 中に調整し、UV-vis を用いて温度変化にともなう波長 600 nm の光透過率変化を昇温および降温速度 0.1 °C/min の条件で測定を行い、LCST を決定した。このとき、溶媒の光透過率を 100% として、サンプル溶液の光透過率が 50% となる温度を LCST とした。

3.3.5 水中気泡法を用いた静的接触角法による各 PNIPAAm 修飾表面のぬれ性変化の測定

3.2.4.2~3.2.6 の作製した基板に対して 20°C から 37°C の範囲で水中気泡法による静的接触角測定を行い、転移温度を挟んだ温度範囲の表面ぬれ性を評価した。測定は PBS 中において、20°C から測定を開始し、各温度で 1 時間静置してから測定を行った。37°C まで測定後、折り返し測定を行うことで、転移温度を挟んだ温度範囲の表面ぬれ性を評価した。基板に付着させる気泡の大きさは 5 μ L、各基板 1 枚につき 6 点の静的接触角を測定することで、その平均値と SD 値を算出した(n=3)。

3.3.6 各 PNIPAAm 修飾基板表面への細胞の接着/脱着挙動の観察

3.3.6.1 各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上への細胞の接着挙動の評価

3.2.4.2~3.2.6 の作製した各基板をダイヤモンドカッターによって 24 × 25 mm の大きさにカットし、表面が細胞非接着性の未処理のペトリディッシュ上に設置した。クリーンベンチ内において、2.3.5.1 と同様の調製方法で作製した細胞懸濁液を基板上への播種密度が 5.0×10^3 cells/cm² となるように調製し、懸濁液 3 mL をディッシュ中に添加した。細胞播種後、ディッシュを 5%CO₂ 下、培養温度それぞれ 25、29、31、33、37°C の条件下のインキュベーター内で 24 時間培養し、位相差顕微鏡下で細胞播種後 24 時間の細胞の様子を観察・撮影することで、各温度における基板表面への接着細胞数を計数した(n=3)。

3.3.6.2 各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上へのフィブロネクチンの吸着性の評価

作製した各基板をダイヤモンドカッターによって 24 × 25 mm の大きさにカットし、細胞非接着性の未処理のペトリディッシュ上に設置し、カットした基板上に直径 1 cm の穴を有するシリコンゴムを設置した。ローダミン標識フィブロネクチンを PBS 中に 5 μ g/mL

の濃度で拡散させ、シリコーンゴム内に 500 μL 播種し、ディッシュを 5% CO_2 下、培養温度を 29、31、33 $^\circ\text{C}$ の条件下のインキュベーター内で 3 時間静置した。3 時間後、基板上の溶液を除去し、37 $^\circ\text{C}$ に昇温した PBS で各基板を洗浄後、蛍光顕微鏡下でローダミン標識フィブロネクチンの基板上への吸着性について観察・撮影することで、各温度における接着タンパク質の吸着挙動を評価した。

3.3.6.3 各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上からの細胞の脱着挙動の評価

作製した各基板をダイヤモンドカッターによって 24 \times 25 mm の大きさにカットし、細胞非接着性の未処理のペトリディッシュ上に設置した。クリーンベンチ内において、2.3.5.1 と同様の調製方法で作製した細胞懸濁液を基板上への播種密度が $5.0 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ となるように調整し、懸濁液 3 mL をディッシュ中に添加した。細胞播種後、ディッシュを 5% CO_2 下、培養温度 37 $^\circ\text{C}$ の条件下のインキュベーター内で 24 時間培養した。細胞の脱着挙動を評価するため、各ディッシュを 5% CO_2 下、20、28、29 $^\circ\text{C}$ の条件下のインキュベーター内に静置し、12 時間培養した。同様に位相差顕微鏡下で経時的に観察・撮影することで、基板表面における接着細胞数を計数した(n=3)。

3.3.6.4 各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収

作製した各基板をダイヤモンドカッターによって 24 \times 25 mm の大きさにカットし、ペトリディッシュ上に設置した。クリーンベンチ内において、2.3.5.1 と同様の調製方法で作製した細胞懸濁液を基板上への播種密度が $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ となるように調整し、懸濁液 3 mL をディッシュ中に添加した。細胞播種後、ディッシュを 5% CO_2 下、培養温度 37 $^\circ\text{C}$ の条件下のインキュベーター内で細胞が基板一面に増殖した状態であるコンフルエントになるまで培養した。続いて細胞の脱着挙動を評価するため、ディッシュを 5% CO_2 下 20 $^\circ\text{C}$ の条件下のインキュベーター内に静置し、細胞シートの回収が可能かどうか観察するとともに末端官能基の違いによる脱着速度を比較・評価した(n=3)。

3.4 結果と考察

3.4.1 XPS 分析による各 PNIPAAm 修飾ガラス基板の評価

各基板表面上の最表面元素組成を XPS 分析によって得た結果を Table 3.1 に示す。

得られた結果より、連鎖移動剤 CTA を固定化した sCTA から CTA 由来の C 原子、N 原子および S 原子のピークが検出されたことから、基板上に CTA が固定化されたことが示された。次に、異なる末端化官能基を有する各 PNIPAAm 修飾基板は sCTA と比較して、PNIPAAm 由来の C 原子と N 原子が増加、ガラス基板由来の Si 原子が減少している。一方で、2.2.8 で作製した PNIPAAm グラフト基板と同じく、各基板における測定結果において O 原子が減少し、各 PNIPAAm 修飾基板と比較して sCTA ではガラス基板由来の Si 原子が 23.6% となっていることから、今回検出されている O 原子も大半がガラス基板由来の O 原子であると考えられる。そのため PNIPAAm が基板表面上にグラフトされることでガラス基板由来の元素の検出が困難となったため、O 原子が減少する結果になったことが示唆される。また、sIP-D と sIP-M を比較して、N/C 値は 0.13 および 0.12 となり、各成分の値がほぼ同等の値を示していることから、PNIPAAm 鎖に対して末端官能基の置換の操作による影響は無いことが示唆された。

以上の結果より、XPS 分析の結果から基板上への PNIPAAm の修飾が示された。

Table 3.1 Elemental analysis and amount of grafted PNIPAAm on glass surfaces.

Sample	Element (atomic%) ^a					Grafted PNIPAAm amount ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ^b	Graft density (Chains/ nm^2)
	C	N	O	S	Si		
sCTA	27.6	3.7	44.0	1.1	23.6	-	-
sIP-D	65.4	8.5	17.9	0.1	8.1	1.02 \pm 0.10	0.16
sIP-M	61.9	7.3	20.9	0.0	9.9	0.95 \pm 0.12	0.15

^a Determined by XPS, take-off angle 10°.

^b Determined by ATR/FT-IR, mean \pm SD (n = 3).

3.4.2 ATR/FT-IR 測定を用いた PNIPAAm の基板上へのグラフト量の評価

ガラス基板表面上における PNIPAAm のグラフト量を ATR/FT-IR 測定により算出した結果を Table 3.1 に示す。

PNIPAAm のグラフト量は、sIP-D は $1.02 \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、sIP-M は $0.95 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、となった。このとき、sIP-M は sIP-D の末端官能基を置換して作製していることから、PNIPAAm のグラフト量は同等の値になると考えられる。これは 3.4.1~3.4.2 の結果と同じく、末端官能基の置換操作は基板表面上の PNIPAAm グラフト量に影響を与えないことが示された。以上の結果から、末端官能基が異なり、同等の PNIPAAm のグラフト量を有した PNIPAAm グラフト基板を作製できたことが示唆された。

3.4.3 回収したガラスビーズ上の PNIPAAm の数平均分子量と分子量分布の評価および基板表面上への PNIPAAm のグラフト密度の算出

ガラスビーズ表面上から得られた PNIPAAm の数平均分子量 M_n は 3.8×10^4 と大きいことから、基板上にグラフトされた PNIPAAm 鎖の分子量も大きいことが期待される。一方で、分子量分布 M_w/M_n は 1.52 となっており、これは重合する際に導入したモノマー濃度に対して CTA の量が少なかったことから、連鎖移動反応が効率よく進行しなかったためと考察される。また、末端官能基の親・疎水性が PNIPAAm 鎖の LCST を高温または低温側にシフトさせる場合、PNIPAAm 鎖の分子量が大きく影響する。そのため、同等の分子量を有する PNIPAAm を作製し、末端官能基が PNIPAAm 鎖の LCST に与える影響について検討する必要がある。次に、3.3.4 で作製した PNIPAAm の分子量は末端官能基がドデシルまたはマレイミド基の PNIPAAm とともに 4.0×10^4 、分子量分布はドデシル基のものでは 1.62、マレイミド基のものでは 1.69 となったことから、ガラスビーズ上から切り出した PNIPAAm と比較してほぼ同等の分子量を有していると考えられる。

続いて、ガラスビーズ表面上から得られた PNIPAAm の分子量と基板上的 PNIPAAm のグラフト量を用いて基板表面上の PNIPAAm 鎖のグラフト密度を 3.3.3 の式(1)より算出した結果、sIP-D では $0.16 \text{ chains}/\text{nm}^2$ 、sIP-M では $0.15 \text{ chains}/\text{nm}^2$ となった。これは既往研究より、高分子修飾表面においてグラフト密度が “ $>0.10 \text{ chains}/\text{nm}^2$ ” となった表面は高分子ブラシ表面と呼ばれる¹³⁾。そのため、本手法を用いて、高密度に PNIPAAm 鎖が修飾した温度応答性高分子表面を作製できていることが明らかとなった。

3.3.4 紫外可視分光光度計による各 PNIPAAm の LCST の評価

3.3.4 で作製した末端官能基の異なる各 PNIPAAm に対して、温度変化にともなう吸収波長 600 nm の各温度における光透過度測定による LCST の結果を Table 3.2 に示す。

低温から高温に変化させた昇温条件において、末端に疎水性のドデシル基を有する PNIPAAm では LCST は 29.0°C、親水性官能基のマレイミド基では 29.6°C となった。これは培養液中の条件に合わせるため、PBS 中に PNIPAAm を溶解させており、PBS 中には塩が含まれている。塩の存在により PNIPAAm の LCST は低温側にシフトすることが知られていることから、両 PNIPAAm 共に 32°C を下回ったと考えられる¹⁴⁾。また、マレイミド基の PNIPAAm と比較してドデシル基の PNIPAAm の LCST が低温側にシフトしている。これは、末端官能基が疎水性のため、PNIPAAm 鎖の脱水和・凝集の機構において末端のドデシル基が脱水和・凝集の起点となったため、親水性のマレイミド基を有する PNIPAAm よりも低温側に LCST がシフトしたことが示唆される。しかしながら、末端官能基の親・疎水性の違いによる LCST の差は 0.6°C となった。これは、一般に PNIPAAm 鎖の LCST が末端官能基の親・疎水性の影響を顕著に受けるのは分子量(M_n) 3.0×10^4 以下とされており、今回作製した PNIPAAm の分子量は 4.0×10^4 のため、末端官能基の影響が小さくなったと考えられる^{11), 12)}。次に、高温から低温に変化させた降温条件では、どちらの PNIPAAm においても LCST は 28.0°C となり、昇温・降温条件によるヒステリシスが確認できた。これは既往研究より、LCST 以下の温度で溶液中に分散した PNIPAAm は LCST 以上の温度になると脱水和・凝集する。このとき、PNIPAAm 中の $>C=O$ と $H-N<$ が水素結合することで凝集した形状となる。続いて、溶液の温度を LCST 以下にした場合、PNIPAAm は水和・伸長の相転移挙動を示すが、 $>C=O$ と $H-N<$ の水素結合により凝集状態が継続することで昇温条件による LCST よりも降温条件による LCST は低温側に移動すると報告されている¹⁵⁾。また、末端官能基がマレイミド基の場合、マレイミド基が有する $H-N<$ によって水素結合が起こるため凝集状態の継続がドデシル基を有する PNIPAAm よりも延長したことで、降温条件によるドデシル基の LCST と同等の値を示したと考えられる。

以上の結果から、末端官能基の親・疎水性の違いにより昇温条件において PNIPAAm 鎖の LCST に影響を与え、降温条件では同等の LCST になることを確認した。一方で、基板

上の PNIPAAm 鎖は表面に片末端が固定化されることで、架橋構造のように多点で固定化されている PNIPAAm よりも自由度が高いため、相転移温度が水溶液中の PNIPAAm の LCST に対応していることが報告されている¹⁶⁾。そのため、基板上においても末端官能基が PNIPAAm 鎖の LCST に影響を及ぼすと考えられる。

Table 3.2 Characterization of linear semitelechelic PNIPAAms.

Sample	M_n^a	M_w/M_n^a	LCST (°C) ^b	
			Heating	Cooling
Dodecyl-PNIPAAm	4.0×10^4	1.62	29.0	28.0
Maleimide-PNIPAAm	4.0×10^4	1.69	29.6	27.9

^a Determined by GPC using DMF with 50 mM LiCl.

^b LCST profiles were determined by optical transmittance changes at 600nm in PBS at a heating /cooling rate of 0.1 °C/min and a polymer concentration of 10 mg/mL.

3.4.5 水中気泡法を用いた静的接触角法測定による各 PNIPAAm 修飾表面のぬれ性変化

各基板に対して 20°C から 37°C の範囲で水中気泡法による静的接触角測定を行い、昇温条件の結果を Figure 3.1 (A)、降温条件の結果を (B)に示す。このとき、 $\cos\theta$ 値は疎水性であれば低い値、親水性であれば高い値を示す。

連鎖移動剤のみを固定した CTA 固定化基板では、温度変化にともなう親・疎水性の変化は確認されなかった。一方で、PNIPAAm を修飾した sIP-D、sIP-M とともに低温では親水性、高温では疎水性を示し、温度変化にともなうぬれ性の変化を確認した。特に昇温条件において、測定温度 31°C において末端ドデシル基型の sIP-D では $\cos\theta$ 値が 0.79 ± 0.02 (n=3)、末端マレイミド型の sIP-M では $\cos\theta$ 値が 0.84 ± 0.02 (n=3)となり、末端官能基の違いによる表面のぬれ性の違いが明らかになった。この結果は、末端官能基の違いによる PNIPAAm 鎖の水和/脱水和挙動の変化によるものと考えられる。これは 3.4.4 の結果と同様に、sIP-D では末端官能基が疎水性のため、PNIPAAm 鎖の脱水和・凝集に影響を与え、相転移挙動が低温側にシフトしたこと考えられる。次に降温条件では、sIP-D および sIP-M とともに各温度におけるぬれ性の違いに差異は確認されず、疎水性から親水性への変化も昇温条件の結果と比較してわずかに低温側にシフトしている。これは 3.4.4 の結果と同様に、>C=O と H-N <の水素結合により、PNIPAAm 鎖の凝集状態が継続したことで昇温条件の相転移挙動より

も低温側にシフトしたと考えられる^{15),17)}。この結果から、基板表面上においても相転移挙動のヒステリシスが示されたことから、本研究で作製した基板上の PNIPAAm 鎖の相転移挙動は溶液中の PNIPAAm の LCST と対応していることが確認された。

以上の結果から、基板の上に修飾された PNIPAAm 鎖における末端官能基の親・疎水性の違いにより、昇温条件において温度によるぬれ性の違いが確認された。

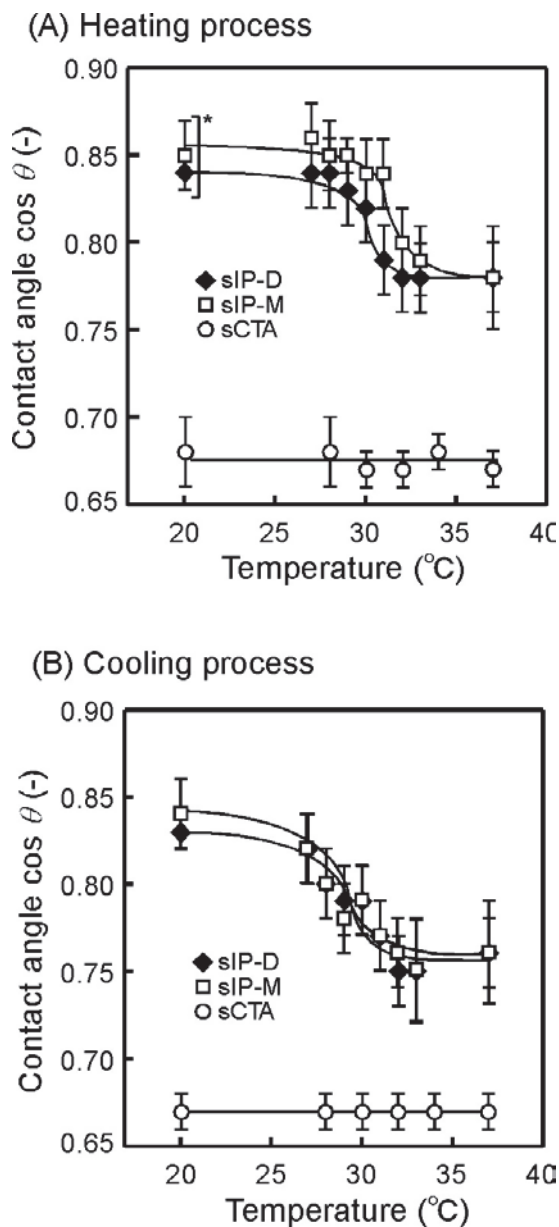


Figure 3.1 Temperature-dependent surface wettability changes of sIP-D, sIP-M and sCTA in the heating process (A) and the cooling process (B).

3.4.6 各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上への細胞の接着挙動の評価

各 PNIPAAm 修飾基板および CTA 固定化基板上への細胞の各温度における接着挙動について検討した。各基板上において 25~37°C の温度範囲で、24 時間培養した細胞の接着数の変化を Figure 3.2 に示す。

PNIPAAm がグラフトされていない sCTA 上の各温度における細胞の接着性は、低温側においてわずかに細胞接着性の低下が確認された。これは低温環境での培養のため、細胞の代謝活性が低下したために接着性が抑制されたと考えられる。一方、末端官能基がドデシル基およびマレイミド基の PNIPAAm ブラシでは、いずれも 37°C で同程度の細胞接着性を示し、29°C 以下では細胞は接着しなかった。これは、LCST を境とした温度変化による PNIPAAm 鎖の水和/脱水状態の違いに起因するものと考えられる。また、末端官能基がドデシル基の sIP-D では、マレイミド基の sIP-M と比較して、低温側である 31°C で細胞の接着が観察された。一方でマレイミド基の sIP-M では培養温度 33°C において細胞の接着が観察された。これは 3.4.5 の静的接触角測定の結果より、培養温度の付近で各基板表面のぬれ性が親水性から疎水性に変化していることから、末端官能基の違いにより PNIPAAm 鎖の LCST が変化し、細胞が接着する温度に違いが生じたものと考えられる。しかしながら、溶液中の PNIPAAm では末端官能基の違いによる LCST の差は 0.6°C となっているにもかかわらず、細胞の接着温度では 2°C の差が生じている。これは溶液中における高分子ミセルといった局所的に疎水性基が集合した場合、疎水性基がクラスター効果によって脱水を促進することが報告されている¹⁸⁾。そのため、基板上に強い疎水性を有するドデシル基が PNIPAAm 鎖の末端に存在することで、高密度(0.16 chains/nm²)にグラフトされた PNIPAAm 鎖の末端ドデシル基同士が疎水性のクラスターを形成し、PNIPAAm 鎖近傍の脱水・凝集を促進する。そのため、基板上では sIP-D と sIP-M の LCST の差は 0.6°C 以上の差が生じているのではないかと考えられる。

以上の結果から、基板上に修飾された PNIPAAm 鎖における末端官能基の親・疎水性の違いにより、細胞の接着温度の制御が可能であることが明らかになった。

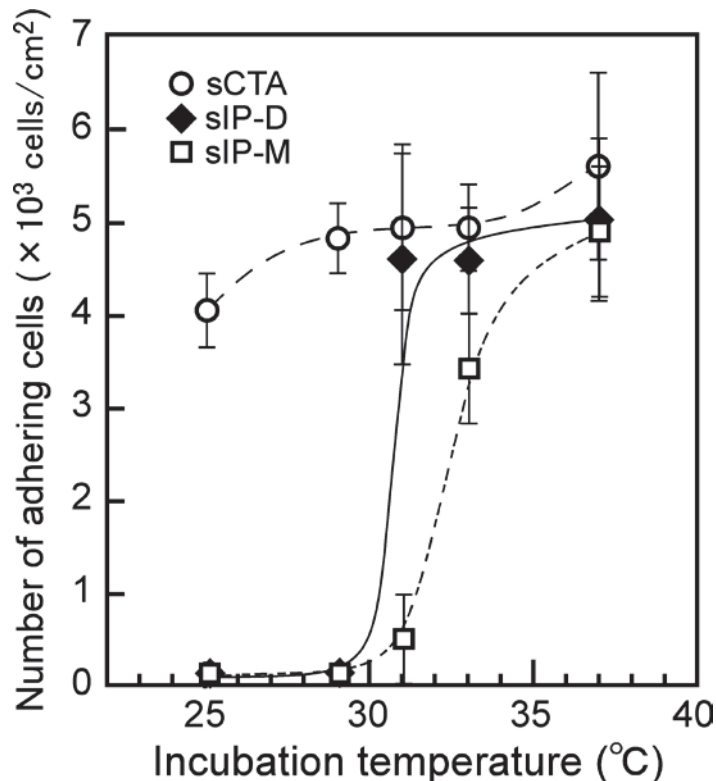


Figure 3.2 Cell adhesion behavior depending on temperature to sIP-D, sIP-M and sCTA for after 24h incubation at various temperature.

3.4.7 各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上へのフィブロネクチンの吸着性の評価

細胞はフィブロネクチンなどの接着タンパク質を仲介して基板上に接着する。そのため、各温度における異なる末端官能基を有する PNIPAAm ブラシ表面上における細胞接着の違いの要因となると考えられるため、各温度におけるフィブロネクチンの吸着性の評価を行った。各 PNIPAAm 修飾基板および CTA 固定化基板上へのローダミン標識フィブロネクチンの 29、31、33°C における吸着性について検討する。各基板上において 29、31、33°C の温度範囲で、3 時間培養後、基板上に吸着したフィブロネクチンの蛍光画像を Figure 3.3 に示す。

PNIPAAm が修飾されていない CTA 固定化基板では各温度においてフィブロネクチンの吸着が確認された。一方で、PNIPAAm がグラフトされている sIP-D と sIP-M では 29°C においてフィブロネクチンの吸着は観察されず、33°C では両基板ともにフィブロネクチンの

吸着が確認された。これは、29°C では PNIPAAm 鎖が水和・伸長しているためフィブロネクチンが基板上に吸着せず、33°C では PNIPAAm 鎖が脱水和・凝集しているためフィブロネクチンが吸着していると考えられる。また、培養温度 31°C において sIP-M ではフィブロネクチンの吸着は見られず、sIP-D ではフィブロネクチンの吸着が確認された。これは 3.4.5 の静的接触角測定の結果より、31°C において基板上のぬれ性が sIP-D は疎水性、sIP-M では親水性となっていることからフィブロネクチンの吸着性に差異が生じたと考えられる。これまで、細胞の接着に起因する接着タンパク質の吸着性は基板表面のぬれ性および PNIPAAm 鎖の水和/脱水和による構造が影響を与えることが報告されている¹⁹⁾。溶液中において接着タンパク質は、疎水性の表面では、水溶液との間の大きな界面自由エネルギーが解消することで基板上に吸着する。一方で、親水性表面では界面に大きな自由エネルギーがないことから、タンパク吸着が困難となる。そのため、3.4.6 における細胞の接着性の違いは、接着タンパク質の吸着性の違いが起因していると考えられる。

以上より、基板上に修飾された PNIPAAm 鎖における末端官能基の親・疎水性の違いにより、フィブロネクチンの吸着性の違いが確認された。この結果から、3.4.6 の各温度における細胞の接着性とフィブロネクチンの吸着性の間には明確な相関性が示された。そのため、各温度において基板上への細胞の接着は、フィブロネクチンなどの接着タンパク質の吸着性が起因していると考えられる。

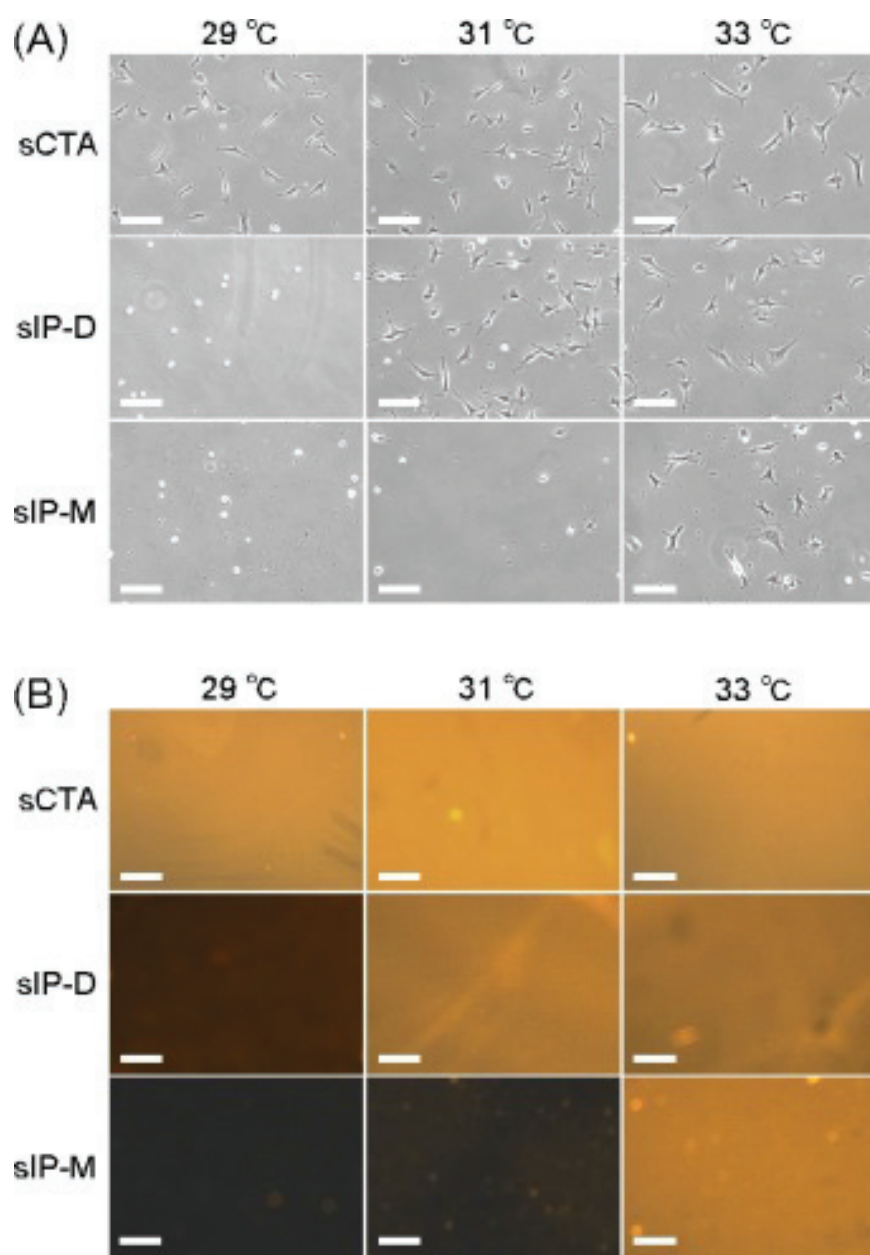


Figure 3.3 (A) Microscopic photographs of adherent cells on sIP-D, sIP-M and sCTA at various temperatures for 24h. (B) Fluorescent microscopic images of adsorption of Rhodamine-labeled fibronectin on sIP-D, sIP-M and sCTA at various temperatures for 3h.

3.4.8 各温度における各 PNIPAAm 修飾基板上からの細胞の脱着挙動の評価

各 PNIPAAm 修飾基板における細胞の脱着挙動について検討する。各基板上において 37°C、24 時間培養後、20、28、29°C の低温に基板を静置した際の細胞の経時的な細胞接着数の変化を Figure 3.4 に示す。また模式図を Figure 3.5 に示す。

培養温度 20°C では、sIP-D および sIP-M とともに低温処理開始から 2 時間で基板上からすべての細胞が脱着したことを確認した。一方で、培養温度 28°C に静置した場合、sIP-D および sIP-M とともに低温処理開始から 24 時間で接着した細胞の 80%が脱着した。これは PNIPAAm 鎖の LCST 以下の温度に基板を静置したことにより、PNIPAAm 鎖が水和・伸長したために、基板表面が親水性となり、細胞と基板との相互作用が低下し、細胞が脱着したと考えられる。次に、培養温度 29°C に静置した場合、sIP-D および sIP-M とともに低温処理開始から 24 時間後においても細胞の脱着は確認されなかった。これは、PNIPAAm 鎖の LCST 以上であるため、PNIPAAm 鎖が脱水和・凝集した状態を維持しているため、細胞の脱着が起きなかったと考えられる。この結果から、末端官能基の違いによる細胞の脱着挙動の違いは確認されなかった。これは 3.4.5 の静的接触角測定の結果と同じく、PNIPAAm 鎖の水和・伸長のプロセスにおいて末端官能基に関係なく PNIPAAm 鎖全体が水和するため、細胞の脱着挙動においても温度による違いが観察されなかったと考えられる。また、28°C に静置した場合、脱着挙動が緩和されたのは、静的接触角測定の結果から、両基板において PNIPAAm 鎖のぬれ性が親水性側のピークに達していない。そのため、基板上の PNIPAAm 鎖が水和・伸長しきれていないために、28°C における細胞の脱着挙動が 20°C の場合と比較して抑制されたのだと考えられる。

以上の結果から、末端官能基が異なる sIP-D および sIP-M において低温処理による細胞の脱着挙動が観察された。また、脱着のプロセスにおいて末端官能基の違いは影響がないことが確認された。

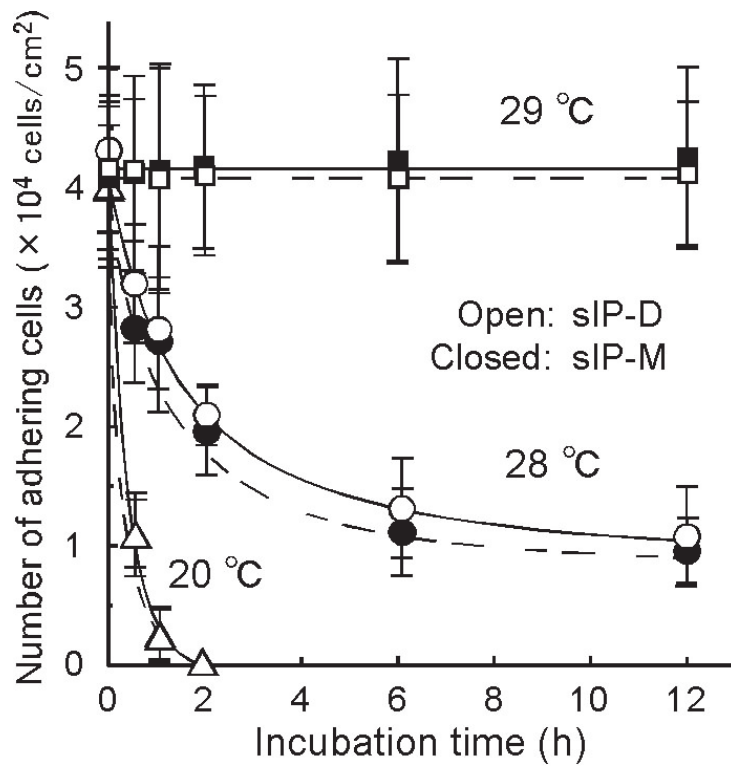


Figure 3.4 Cell detachment behavior depending on temperature from sIP-D and sIP-M at temperatures 20°C, 28°C and 29 °C, respectively.

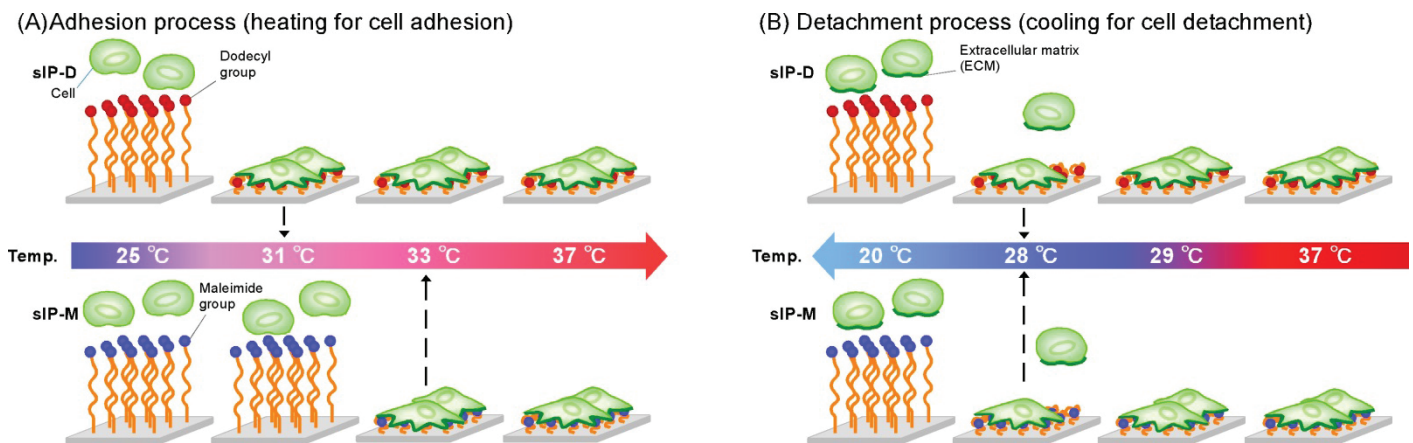


Figure 3.5 Schematic illustrations of cell adhesion/detachment behavior depending on temperatures on/from sIP-D and sIP-M.

3.4.9 各 PNIPAAm ブラシ表面からの細胞シート回収

各基板上に細胞を 1×10^5 cells/cm² の条件で播種し、37°C で細胞がコンフルエントになるまで培養し、細胞がコンフルエントになった基板を 20°C の低温に静置し、回収した細胞シートの形態および要した時間を Figure 3.6 に示す。

PNIPAAm を修飾していない CTA 固定化基板では細胞播種後 3 日で、各 PNIPAAm 修飾基板では 5 日以内に細胞がコンフルエントになることを確認した。次に、コンフルエントになった基板を 20°C に静置した結果、PNIPAAm が修飾していない sCTA では細胞の剥離は確認されなかった。一方で、PNIPAAm が修飾されており、末端官能基がドデシル基の sIP-D では低温処理開始 29 ± 2 分 (n=3)、末端官能基がマレイミド基の sIP-M では低温処理開始 23 ± 2 分 (n=3) となり、有意差検定の結果、 $p < 0.05$ となった。そのため、sIP-D と sIP-M を比較して、細胞シートの剥離時間はわずかに速いという結果が得られた。これは末端官能基の違いによる影響が示唆されるが、ほぼ同等の時間であることから細胞シート作製のための基板として使用することは可能であると考えられる。

以上の結果から、末端官能基の違いが細胞シート回収に影響を与えることなく、基板上から細胞をシート状の組織として回収することに成功した。

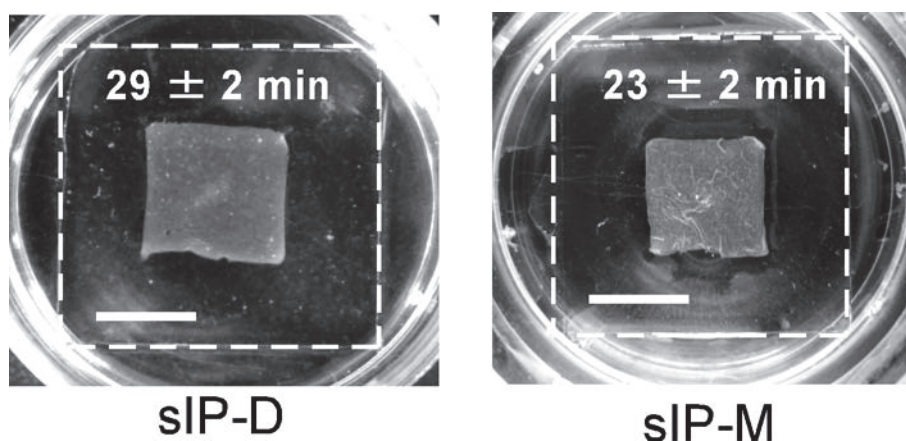


Figure 3.6 Spontaneous cell sheets harvesting from sIP-D and sIP-M. White dashed lines shows the edges of glass surfaces. Scale bars: 1cm.

3.5 結言

作製した基板の物性評価より、ガラス基板表面上に密度高く PNIPAAm 鎖をグラフトすることに成功した。また、末端官能基を疎水性官能基ドデシル基から、親水性官能基マレイミド基に置換することで、静的接触角測定より、31°C 付近を境にしてぬれ性の違いが生じることを確認した。この結果は細胞接着における温度依存性においても細胞の接着数に違いが生じており、31°C で培養した場合、疎水性官能基ドデシル基を有する sIP-D では細胞が接着し、親水性官能基マレイミド基を有する sIP-M では細胞の接着は抑制された。一方で、33°C 以上で培養した場合、両基板共に細胞の接着が確認されたことから、LCST 以上で培養を行えば末端官能基の違いに関係なく細胞培養が可能であることが示された。この結果から、末端官能基の違いによって基板上の PNIPAAm 鎖の相転移挙動を低温または高温側にシフトさせ、細胞の接着可能な開始温度の制御に成功した。また、細胞の脱着挙動において、細胞脱着開始温度は末端官能基に関係なく、sIP-D と sIP-M とともに 28°C という結果となった。これは、PNIPAAm 鎖の水和・伸長のプロセスは末端官能基に関係なく PNIPAAm 鎖は無作為に水和することで、伸長の相転移挙動を示すためだと考えられる。

3.6 参考文献

- 1) Moad, G., Chong, K. Y., Postma, A., Rizzardo, E., Thang, H. S., 2005. Advance in RAFT polymerization: the synthesis of polymers with defined end-groups, *Polymer*, **46**, 8458-8468.
- 2) Chong, K. Y., Moad, G., Rizzardo, E., Thang, H. S., 2007. Thiocarbonyl End Group Removal from RAFT-Synthesized Polymers by Radical-Induced Reduction, *Macromolecules*, **40**, 4446-4455.
- 3) Postma, A., Davis, P. T., Evans, A. R., Li, G., Moad, G., O'Shea, S. M., 2006. Synthesis of Well-Defined Polystyrene with Primary Amine End Groups Through the Use of Phthalimido-Functional RAFT Agents, *Macromolecules*, **39**, 5293-5306.
- 4) Postma, A., Davis, P. T., Evans, A. R., Li, G., Moad, G., O'Shea, S. M., 2006. RAFT Polymerization with Phthalimidomethyl Trithiocarbonates or Xanthates. On the Origin of Bimodal Molecular Weight Distributions in Living Radical Polymerization, *Macromolecules*, **39**,

- 5307-5318.
- 5) Postma, A., Davis, P. T., Moad, G., O'Shea, S. M., 2005. Thermolysis of RAFT-Synthesized Polymers. A Convenient Method for Trithiocarbonate Group Elimination, *Macromolecules*, **38**, 5371-5374.
 - 6) Chong, B., Moad, G., Rizzardo, E., Skidmore, M., Thang, H. S., 2006. Thermolysis of RAFT-Synthesized Poly(Methyl Methacrylate), *Aust. J. Chem.*, **59**, 755-762.
 - 7) Xia, Y., Burke, A. D. N., Stöver, D. H. H., 2006. End Group Effect on the Thermal Response of Narrow-Disperse Poly(*N*-isopropylacrylamide) Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization, *Macromolecules*, **39**, 2275-2283.
 - 8) Duan, Q., Miura, Y., Narumi, A., Shen, X., Sato, S., Satoh, T., Kakuchi, T., 2005. Synthesis and Thermoresponsive Property of End-Functionalized Poly(*N*-isopropylacrylamide) with Pyrenyl Group, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **44**, 1117-1124.
 - 9) Kujawa, P., Segui, F., Shaban, S., Diab, C., Okada, Y., Tanaka, F., Winnik, M. F., 2006. Impact of End-Group Association and Main-Chain Hydration on the Thermosensitive Properties of Hydrophobically Modified Telechelic Poly(*N*-isopropylacrylamide) in Water, *Macromolecules*, **39**, 341-348.
 - 10) Kujawa, P., Tanaka, F., Winnik, M. F., 2006. Temperature-Dependent Properties of Telechelic Hydrophobically Modified Poly(*N*-isopropylacrylamide) in Water: Evidence from Light Scattering and Fluorescence Spectroscopy for the Formation of Stable Mesoglobules at Elevated Temperatures, *Macromolecules*, **39**, 3048-3055.
 - 11) Chung, J. E., Yokoyama, M., Suzuki, K., Aoyagi, T., Sakurai, Y., Okano, T., 1997. Reversibly thermo-responsive alkyl-terminated poly(*N*-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **9**, 37-48.
 - 12) Furyk, S., Zhang, Y., Ortiz-acosta, D., Cremer, S. P., Bergbreiter, E. D., 2006. Effects of End Group Polarity and Molecular Weight on the Lower Critical Solution Temperature of Poly(*N*-isopropylacrylamide), *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **44**, 1492-1501.
 - 13) Yamamoto, S., Ejaz, M., Tsujii, Y., Matsumoto, M., Fukuda, T., 2000. Surface interaction forces

- of well-defined, high-density polymer brushes studied by atomic microscopy. 2.Effect of graft density, *Macromolecules*, **33**, 5608-5612.
- 14) Zhang, Y., Furyk, S., Bergbreiter, E. D., Cremer, S. P., 2005. Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 14505-14510.
 - 15) Cheng, H., Shen, L., Wu, C., 2006. LLS and FTIR Studies on the Hysteresis in Association and Dissociation of Poly(*N*-isopropylacrylamide) Chains in Water, *Macromolecules*., **39**, 2325-2329.
 - 16) Idota, N., Kikuchi, A., Kobayashi, J., Akiyama, Y., Sakai, K., Okano, T., 2006. Thermal modulated interaction of aqueous steroids using polymer-grafted capillaries, *Langmuir*, **22**, 425-430.
 - 17) Liu, G., Zhang, G., 2005. Collapse and Swelling of Thermally Sensitive Poly(*N*-isopropylacrylamide) Brushes Monitored with Quartz Crystal Microbalance, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 743-747.
 - 18) Nakayama, M and Okano, T., 2008. Unique Thermoresponsive Polymeric Micelle Behavior via Cooperative Polymer Corona Phase Transitions, *Macromolecules*, **41**, 504-507.
 - 19) Ma, H., Li, D., Sheng, X., Zhao, B., Chilkoti, A., 2006. Protein-resistant polymer coatings on silicon oxide by surface-initiated atom transfer radical polymerization, *Langmuir*, **22**, 3751-3756.

第4章

総括

総括

本論文では温度応答性培養表面のための高分子ブラシ構造の分子設計を目的として、温度に応答して親・疎水性を変化させる温度応答性高分子 PNIPAAm を密度高くガラス基板表面上に SI-RAFT 重合を用いて PNIPAAm ブラシ表面を設計した。得られた基板を用いて物性評価を行い、ブロック共重合体ブラシ表面特性が細胞の接着脱着挙動に与える影響、PNIPAAm 鎖の末端官能基の親・疎水性の違いが細胞の接着温度領域に与える影響といった評価を行い、再生医療の発展を目指した高分子ブラシ構造の分子設計に関する開発に向けて議論を行った。

第 2 章では温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面を作製し、重合一段階目で下層に疎水性高分子 PBzMA を導入し、重合第二段階目で上層に温度応答性高分子 PNIPAAm を導入した。このとき、下層に導入する PBzMA のグラフト量を変化させることで、PBzMA 層が基板の物性評価や細胞の接着脱着挙動に影響を与えることが示された。特にブロック共重合体ブラシ表面にすることで細胞の脱着性および細胞シートの回収において、PNIPAAm 単層の基板と比較して基板上からの細胞の剥離速度向上に成功した。また、下層の PBzMA のグラフト量を増加させることで、ウシ頸動脈由来血管内皮細胞の接着性を抑制されることを確認した。これは、接着性の強い細胞種などでは最適な基板になることが予想される。この結果から、PNIPAAm の対となるポリマー種の選択、導入するポリマーのグラフト量を調節することで、種々の細胞種や培養条件に適した基板の作製法の一つとしてブロック共重合体ブラシ表面という PNIPAAm 鎖の鎖長や密度以外の新たな因子として用いられることが期待される。

第 3 章では SI-RAFT 重合で作製した PNIPAAm ブラシ表面の末端官能基に着目した。末端官能基の親・疎水性の違いは PNIPAAm 鎖の LCST に影響を与えることが報告されており、親水性官能基では高温側に、疎水性官能基では低温側にシフトする。この現象が基板上の PNIPAAm 鎖においても生起されると考え、疎水性官能基ドデシル基および親水性官能基マレイミド基を有する基板を作製して、基板の物性評価および細胞の接着温度領域の制御について検討した。その結果、培養温度 31°C において末端官能基がドデシル基のものでは細胞が接着し、マレイミド基のものでは細胞の接着が抑制される結果となった。これ

は静的接触角測定の結果より、昇温条件における測定では31°Cにおいて基板のぬれ性に大きな違いが出ており、ドデシル基の基板では20°Cの時と比較して疎水性を示しており、マレイミド基の基板では親水性を維持していた。これは末端官能基の違いにより、基板上のPNIPAAm鎖のLCSTがドデシル基では低温側にシフトし、マレイミド基では高温側にシフトしたと考えられる。以上より、末端官能基の違いにより細胞の接着開始温度の制御に成功したことから、一つの基板上でパターン上に末端官能基を置換することができれば、異種細胞の共培養が可能な細胞培養表面として用いることが期待される。

以上より、SI-RAFT重合を用いて、種々の温度応答性ブラシ表面を作製した。作製した種々の高分子ブラシ構造の分子設計はPNIPAAm鎖におけるグラフト鎖長・密度以外の細胞の接着・脱着挙動に対する新たな制御因子となることが考えられる。この手法を用いて、さまざまな細胞腫や共培養などの培養方法に対応した基板表面のブラシ構造を調製可能な温度応答性表面としての応用が期待される。これにより将来的に、本手法により作製した基板を用いてさまざまな細胞種における細胞シート化を検討する際に、細胞特有の性質によって基板上に細胞が接着・増殖しない、増殖してもシート状に回収することが困難とされる細胞、または、臓器の構造や複数種の細胞を用いてより人体を模倣した細胞シートの作製といった多種多様な細胞種の培養とその機能的な細胞シート作製への応用が考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、6年間という長期間に渡り、懇切丁寧に実験に関する御助言、論文添削や学会発表における御助言および研究者としての心構えを御指導頂きました東京理科大学の菊池明彦教授には大変お世話になりました、心から御礼申し上げます。研究を遂行するにあたり、施設および測定機器の提供ならびに論文添削や研究に関するディスカッションといったさまざまな御指導を頂きました東京女子医科大学先端生命医科学研究所の岡野光夫教授、中山正道講師、高橋宏信助教に謹んで御礼申し上げます。また、実験の御指導、御助言をして頂きました大阪市立大学複合先端研究機構の麻生隆彬講師に厚く御礼申し上げます。本研究を行う上で、有益な御指導、御助言だけでなく、さまざまな相談に乗って頂いた東京理科大学の石原量助教、上村真生助教、東京医科歯科大学の田村篤志助教、先端生命研の秋元淳博士、早稲田大学の有坂慶紀博士、に厚く御礼申し上げます。同期として6年間共に研究・学会参加・さまざまな行事を行いました菊池研究室の松山拓矢様および早稲田大学の亀石統子様には心から感謝申し上げます。さらに、お世話になりました東京女子医科大学のスタッフ、学生の皆様、東京理科大学の菊池研究室の皆様にも厚く感謝申し上げます。また、本論文の第3章に関する研究は日本学術振興会特別研究員奨励費(24・7141)の助成を受けたものである、厚く御礼申し上げます。最後になりましたが、博士後期課程に進学する上でその機会と多大なる支援をして頂き、どのような時でも温かく見守って下さいました両親に深く感謝致します。

2015年 3月 松坂 直樹

論文リスト

本論文は学術誌に掲載された以下の論文を基礎とするものである。

Naoki Matsuzaka, Hironobu Takahashi, Masamichi Nakayama, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano
“Effect of the Hydrophobic Basal Layer of Thermoresponsive Block Co-Polymer Brushes on
Thermally-Induced Cell Sheet Harvest.” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23
(2012) 1301-1314.

Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi,
Teruo Okano “Terminal-Functionality Effect of Poly(*N*-isopropylacrylamide) Brush Surfaces on
Temperature-Controlled Cell Adhesion/Detachment.” *Biomacromolecules*, 14 (2013) 3164-3171.

学会発表リスト

研究について発表を行った学会を以下に示す。

国際会議における発表

1. Naoki Matsuzaka, Hironobu Takahashi, Masamichi Nakayama, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based block copolymer brush surfaces for temperature-controlled cell adhesion/detachment” International Conference on Biomaterials Science 2011 (ICBS2011), P4-31, つくば国際会議場, 2011年3月 (ポスター発表)
2. Naoki Matsuzaka, Hironobu Takahashi, Masamichi Nakayama, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Effect of Hydrophobic Basal Layer in Thermoresponsive Block Copolymer Brush Surfaces on Harvesting Cell Sheets” 14th International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference 2012 (IACIS2012), S5P15-05, 仙台国際センター, 2012年3月 (ポスター発表)
3. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “End-functionality effect of poly(*N*-isopropylacrylamide) brushes on temperature-responsive cell adhesion/detachment behavior” Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES2012), National Tsing Hua University, 2012年9月 (口頭発表)
4. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “End-functionality Effect of Thermoresponsive Polymer Brushes on Thermoresponsive Surface Properties and Temperature-induced Cellular Adhesion Behavior” The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), 13P1S6-027a, 神戸国際会議場, 2012年12月 (ポスター発表)
5. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Terminal-Functionality Effect of Thermoresponsive Polymer Brushes on

- Temperature-controlled Cellular Adhesion/Detachment Behavior” International Conference on Biomaterials Science 2013 (ICBS2013), P092, つくば国際会議場, 2013年3月 (ポスター発表)
6. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Controlled End-functionality of Thermoresponsive Polymer Brushes for Regulating Thermally Induced Surface Cell Adhesion Behavior” Society for Biomaterials 2013 Annual Meeting & Exposition (SFB2013), 22, Boston Hynes Plaza, 2013年4月 (口頭発表)
 7. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Terminal-Functionality Effect of Thermoresponsive Polymer Brushes on Surface Properties and Temperature-Induced Cell Adhesion Behavior” The 4th Asian Biomaterials Congress (ABMC2013), Hong Kong University of Science & Technology, TE-P073, 2013年6月 (ポスター発表)
 8. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Effects of Terminal-Functionality Poly(*N*-isopropylacrylamide) Brushes on Temperature-Controlled Cellular Adhesion/Detachment Behavior” Tsukuba International Conference on Materials Science 2013 (TICMS2013), P38, 筑波大学, 2013年8月 (ポスター発表)
 9. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “End-Functionality Effect of Poly(*N*-isopropylacrylamide) Brushes on Surface Properties and Temperature-Dependent Cell Adhesion Behavior” Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES2013), PA16, 東京理科大学, 2013年9月 (ポスター発表)
 10. Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “End-Functionality of Poly(*N*-isopropylacrylamide) Brushes for Regulating Thermally Induced Cell Adhesion-Initiating Temperature” International Symposium on Smart Biomaterials, P12, 物質材料研究機構, 2014年3月 (ポスター発表)

国内会議における発表

11. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“ブロック共重合体からなる温度応答性高分子ブラシ表面の構築とそのキャラクタリゼーション” 第 59 回高分子年次大会、1Pc131、パシフィコ横浜、2010 年 5 月（ポスター発表）
12. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性ブロックコポリマーブラシ表面の構築とそのキャラクタリゼーション” 第 39 回医用高分子シンポジウム、20、東京大学先端科学技術研究センター、2010 年 7 月（口頭発表）
13. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面の構築と細胞接着・脱着の評価” 第 59 回高分子討論会、2Pf116、北海道大学、2010 年 9 月（ポスター発表）
14. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“Poly(*N*-isopropylacrylamide)-based block copolymer grafted surfaces for regulating thermally induced cell adhesion/detachment behavior” 第 20 回日本 MRS 学術シンポジウム、M-P28-M、横浜情報文化センター、2010 年 12 月（ポスター発表）
15. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“細胞シート作製を目的とした温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面の構築” 第 60 回高分子年次大会、2Pa123、大阪国際会議場、2011 年 5 月（ポスター発表）
16. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“細胞接着及び細胞シートの脱着に与える温度応答性ブロック共重合体ブラシの効果” 第 40 回医用高分子シンポジウム、15、関西大学、2011 年 7 月（口頭発表）
17. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性ブロック共重合体ブラシの物性が細胞の接着・脱着挙動に及ぼす影響” 第 33 回日本バイオマテリアル学会、P124、京都テルサ、2011 年 11 月（ポスター発表）
18. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“Thermoresponsive Block Copolymer Brush Structure for Harvesting Cell Sheets” 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム、P-P47-M、横浜情報文化センター、2011 年 12 月（ポスター発表）
19. 松坂直樹、高橋宏信、中山正道、菊池明彦、岡野光夫、“細胞シートの脱着に及ぼす温

- 度応答性ブロック共重合体ブラシの影響” 第 21 回インテリジェント材料・システムシンポジウム、A05、東京女子医科大学先端生命医科学研究所、2012 年 1 月（口頭発表）
20. 松坂直樹、中山正道、高橋宏信、麻生隆彬、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性高分子ブラシ表面の分子鎖長と末端官能基が細胞の接着・脱着挙動に及ぼす影響” 第 61 回高分子年次大会、2H16、パシフィコ横浜、2012 年 5 月（口頭発表）
 21. 松坂直樹、中山正道、高橋宏信、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性ポリマーブラシ表面における分子鎖長および末端官能基が細胞の接着・脱着挙動に及ぼす影響” 第 41 回医用高分子シンポジウム、17、東京大学先端科学技術研究センター、2012 年 6 月（口頭発表）
 22. 松坂直樹、中山正道、高橋宏信、麻生隆彬、菊池明彦、岡野光夫、“細胞の接着・脱着挙動に及ぼす温度応答性高分子ブラシ構造の末端官能基の効果” 第 6 回ナノ・バイオメディカル学会、P-6、産業技術総合研究所、2012 年 7 月（ポスター発表）
 23. 松坂直樹、中山正道、高橋宏信、麻生隆彬、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性高分子ブラシの末端官能基の構造が細胞の接着・脱着挙動に与える影響” 第 61 回高分子討論会、2Pc091、名古屋工業大学、2012 年 9 月（ポスター発表）
 24. 松坂直樹、中山正道、高橋宏信、麻生隆彬、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性高分子ブラシ表面の末端官能基の違いが細胞接着温度範囲と細胞脱着挙動に与える効果” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、PY38、仙台国際センター、2012 年 11 月（ポスター発表）
 25. 松坂直樹、中山正道、高橋宏信、麻生隆彬、菊池明彦、岡野光夫、“末端官能基の違いによる温度応答性高分子ブラシ表面の細胞接着温度の制御” 第 42 回医用高分子シンポジウム、P14、産業技術総合研究所、2013 年 7 月（ポスター発表）
 26. 松坂直樹、中山正道、高橋宏信、麻生隆彬、菊池明彦、岡野光夫、“温度応答性ポリマーブラシ表面の末端官能基の違いによる細胞接着温度の制御” 第 3 回 CSJ 化学フェスタ、P3-62、タワーホール船堀、2013 年 10 月（ポスター発表）

受賞リスト

学会発表において受賞した賞を以下に示す。

Naoki Matsuzaka, Masamichi Nakayama, Hironobu Takahashi, Taka-Aki Asoh, Akihiko Kikuchi,
Teruo Okano

The 4th Asian Biomaterials Congress (ABMC2013), Hong Kong University of Science &
Technology, TE-P073, 2013年6月 (ポスター発表)

The 4th Asian Biomaterials Congress, Young Scientist Award for Poster Presentation