

■ 報告書 ■

生体工学のための感光性材料の開発

山口和夫¹ 前田瑞夫² 横山昌幸³

Development of Photosensitive Materials for Bioengineering

Kazuo Yamaguchi^{1,4}, Mizuo Maeda² and Masayuki Yokoyama³

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293

² Bioengineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198

³ Kanagawa Academy of Science and Technology, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: kazu@kanagawa-u.ac.jp

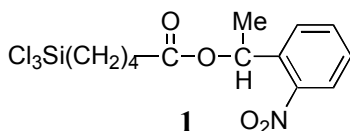
Abstract: We have already developed a method to spatiotemporally control cell adhesion using a photochemical reaction. In this study, we formed cell-adhesive spots smaller than single cells and located the focal adhesions of the cells by controlling the sizes of the illuminated regions. Moreover, by subsequently illuminating the region alongside the cells patterned on the substrate in advance, their geometrical confinements were released, and migration and proliferation were induced. Single cells were also micropatterned on the substrate and were induced to extend lamellipodia or filopodia alternatively by the subsequent formation of wide or narrow paths in their surroundings, respectively. Photodegradable block copolymer composed of hydrophilic poly (ethylene oxide) (PEO) and hydrophobic poly (benzyl aspartate) connected with a photocleavable 2-nitrobenzyl moiety were synthesized to form polymer micelles. Photodegradation of the resulting block copolymer was demonstrated.

Keywords: photosensitive self-assembled monolayer, 2-nitrobenzyl group, cell adhesion, cell migration, photodegradable block copolymer, polymer micelle

序論

我々はこれまでに、光分解性の2-ニトロベンジルエステルで保護したシランカップリング剤 **1** を合成し、無機材料表面への修飾、光照射を行い、カルボキシ基の導入を接触角、XPS の測定などにより確認している^{1,2)}。さらに **1** で処理して得られるガラス基板上の感光性単分子膜を用いて、標準的な蛍光顕微鏡下で細胞接着性を制御する方法を開発している (Fig. 1)³⁾。この方法では、基板表面に吸着させた細胞接着を抑制するウシ血清アルブミン (BSA) を、2-ニトロベンジルエステルの光分解によって表面から解離させ、露出したカルボキシ基に細胞接着を促進させるフィブ

ロネクチン (FN) を吸着させることで表面を細胞接着性へと変換



する。

本研究では、この方法を応用して、サイズや形状の異なる細胞のパターニングや、光照射による細胞移動を試みた^{4,5)}。

一方、両親媒性ブロック共重合体は、細胞接着性を制御する表面修飾剤として用いられているだけ

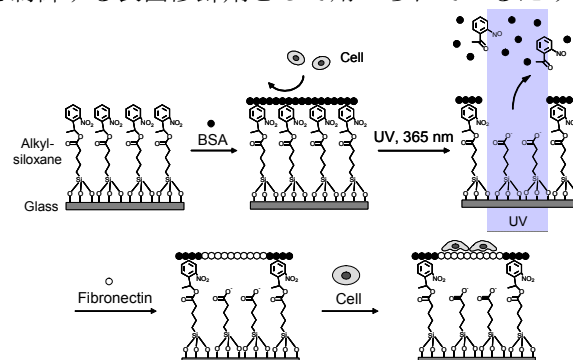
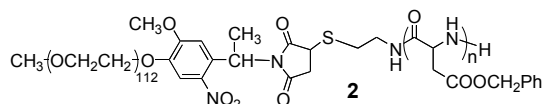


Fig.1. Schematic representations of photoactivation of the substrate for cell adhesion

でなく、疎水性あるいは親水性薬物を内包できるポリマーミセルやポリマーソームなどの薬物送達システム (DDS) としての利用も検討されている。本研究では、親水性成分としてポリエチレンオキシド (PEO)、疎水性成分としてポリベンジルアスパルテート (PBLA) を連結させたブロック共重合体 **2** の合成を試みた⁶⁾。両成分を直接連結させたブロック共重合体は、薬物を内包するポリマーミセルを形成し、DDS としての実用化が検討されているものである⁷⁾。光分解性基で連結された両親媒性ブロック共重合体を得られれば、上記のシランカップリング剤に代わる細胞接着性を光で制御する新たな表面修飾剤として期待されるだけでなく、光で放出を制御する新しい DDS の構築も可能であると予想される。



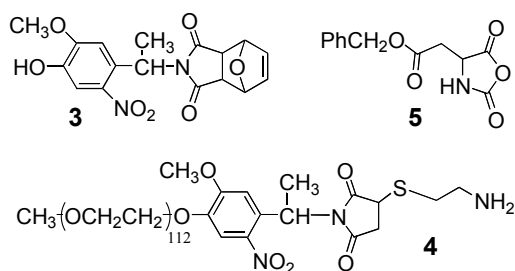
材料と方法

1 で修飾した基板を用いた細胞アレイの作製

1 のベンゼン溶液にガラス基板を投入し、1 時間還流させ修飾ガラス基板を得た。修飾基板を 10mg/mL の牛血清アルブミン (BSA) あるいは Pluronic F108 のリン酸緩衝溶液 (PBS) に 1 時間浸漬後、蛍光顕微鏡下で波長 365 nm の光 (1 W/cm²) を 10 秒間照射した。その基板を 25 μg/mL のフィブロネクチンを含む PBS に 30 min 浸漬させた。無血清培地中でヒト胎児腎細胞 (HEK293) を播種し、30 分後に培地交換して細胞を観察した。光照射領域は、OHP シートに印刷したフォトマスクを蛍光顕微鏡の視野絞りに挿入することで制御した。

光分解性ブロック共重合体 **2** の合成

Scheme 1, 2 に示すように、光分解性リンカー**3**、PEO 末端にリンカーを介してアミノ基が結合した **4** を合成し、**4** を開始剤として用いたベンジルアスパルテートの N-カルボキシ酸無水物 **5** の開環重合を行い、**2** を合成した。得られた生成物は、¹H NMR スペクトルなどで同定した。**2** の THF 溶液に対し、500 W 超高压水銀灯を光源とし、硫酸銅水溶液フィルターを用いて 320 nm 以上の光のみを照射した。



結果と討論

1 で修飾した基板を用いた細胞パターン⁵⁾の作製

ストライプ型の細胞パターンを作成した結果を Fig. 2 に示す。200 μm 幅の透明なストライプと 400 μm 幅の不透明なストライプを持つフォトマスク (Fig. 2a) を介する光照射により、蛍光インクを塗布したカバーガラス上に、100 μm 幅の間隔に 50 μm 幅の蛍光性のストライプが観察できる (Fig. 2b)。このことから、視野絞りに挿入したフォトマスクの四分の一の倍率で、カバーガラス上に光照射されていることがわかった。1 で化学修飾したカバーガラスに BSA をコートした後、上記のフォトマスクを用いて光照射し BSA を染色したところ、未照射部位のみに BSA が残存していることがわかった (Fig. 2c)。このカバーガラスをフィブロネクチン溶液に浸漬させると、照射部位に選択的にフィブロネクチンが吸着していることが、蛍光抗体法により明らかになった (Fig. 2d)。この基板に HEK293 を播種すると、フィブロネクチン吸着部位に、細胞が接着している

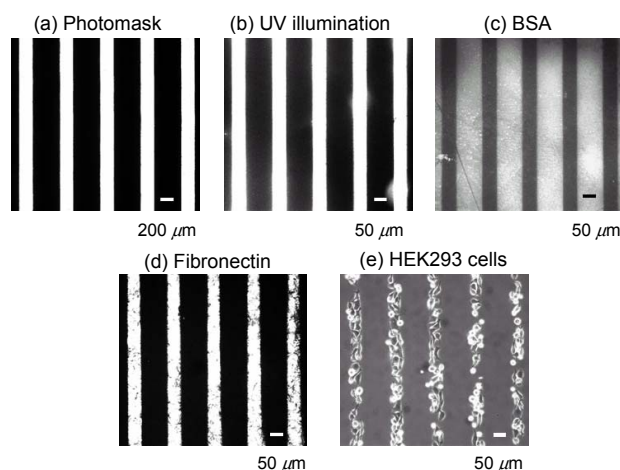


Fig.2. Patterns of a photomask, illumination, proteins, and cells.

ことが観察できた (Fig. 2e)。このような細胞パターンは、細胞種にも依存するが 1–3 日間維持された。BSA の代わりに合成高分子 Pluronic F108 を用いると、パターンの維持時間が約 1 週間まで向上できる。

次に光照射領域を縮小し、細胞より小さいサイズのアレイパターンを用いた結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3a のフォトマスクを用いた照射パターンのサイズは 6 mm であることがわかる (Fig. 3b)。照射パターン通りにフィブロネクチンが吸着しており (Fig. 3c)、HEK293 細胞は照射したアレイスポットの上に節状の構造体を形成した (Fig. 3d)。細胞はこの節状の構造体中に接着斑を形成しているのであろう。この結果は、本手法の空中分解能が細胞以下のサイズまで達していることを意味している。

この手法を用い、光照射と細胞播種を繰り返すことによって、2つの細胞をすぐ横に並べ配置することも可能であった。光照射を制御することで、細胞どうしを接触させることも可能であり、基板上で細胞同士の相互作用を人為的に設定することができる。

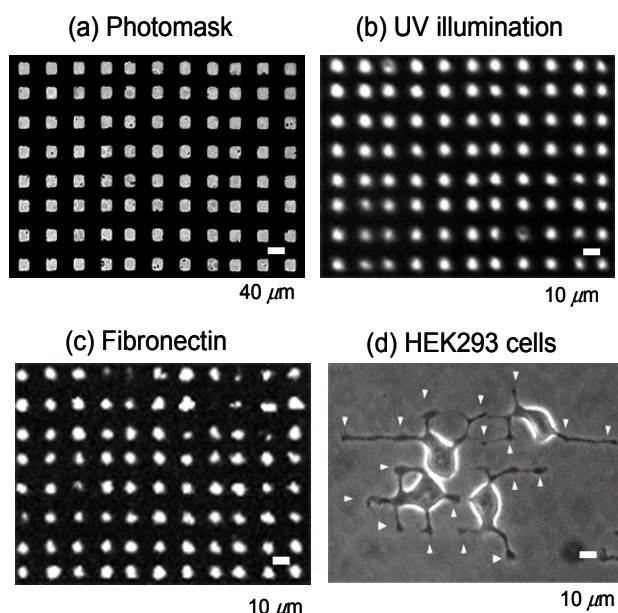


Fig.3. Cell adhesion onto the substrate photoactivated in a subcellular pattern.

さらに Fig. 4 に示すように、基板上に接着した HEK293 細胞のすぐ横の領域を光照射し、新たな接着領域を形成したところ、細胞は新設された細胞接着領域に向かって移動を開始し、増殖することがわかった。これは、創傷治療、あるいはガン細胞の浸潤モデルと考えることができ、誘導した細胞の移動・増殖能を指標に、細胞の運動性を調節する薬物

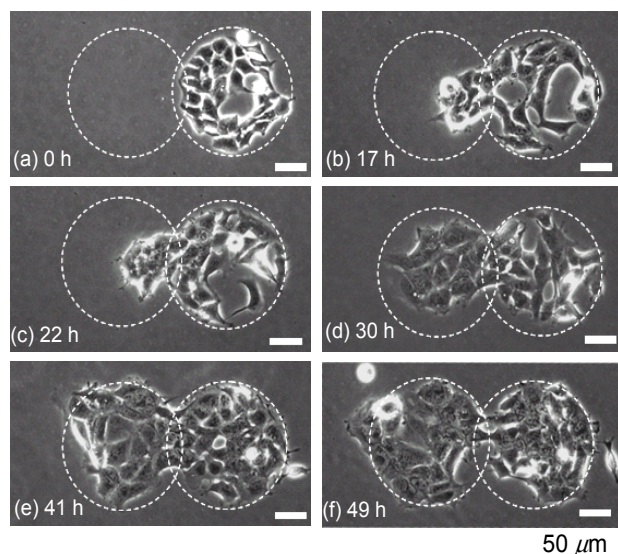


Fig.4. Inducing migration of HEK 293 cells by sequential photoactivation of the substrate.

候補物質の活性評価が行えると考えている。

この方法を応用して、一細胞の移動挙動を顕微鏡観察する手法を開発した。ここでは、1で修飾したカバーガラスを BSA の代わりにパターンの維持時間の長い Pluronic F108 を用いて、基板全面を細胞非接着性にした。25 x 25 μm^2 のアレイスポットに配置した細胞 (Fig. 5a) に接する幅 25 μm あるいは 5 μm の通路状領域を光照射したところ、それぞれ葉状仮足、糸状仮足が選択的に形成された (Fig. 5b, c)。アレイ状に隔てて配置した一細胞の先端端の移動挙動を定量的に評価することにより、葉状仮足の方が糸状仮足よりも有意に速く移動することが明らかになった ($22.6 \pm 2.2 \mu\text{m}/\text{h}$ vs. $19.4 \pm 1.4 \mu\text{m}/\text{h}$)。今後、細胞移動を調節する分子の細胞内挙動を同時観察することで、より詳細な解析ができると考えられる。

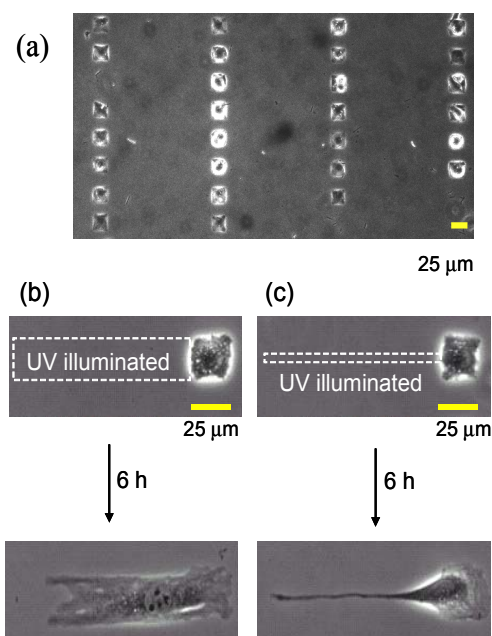
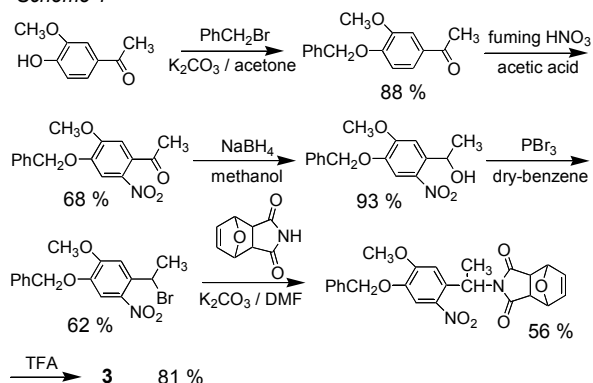


Fig.5. Spatiotemporal control of cell migration on the photoactiatable cell-culturing substrate. (a) Single NIH3T3 cells on 25 x 25 μm^2 square spots. (b,c) Selective extension of a lamellipodium (b) or filopodium (c) in an NIH3T3 cell induced by illuminationg paths with 25- μm (b) or 5- μm width.

光分解性ブロック共重合体 2 の合成⁶⁾

光分解性リンカー 3 の合成の反応式と収率を Scheme 1 に示す。出発原料である 4-ヒドロキシ-3-メトキシアセトフェノンのフェノール性-OH を、ベンジルエーテルとして保護した。これに対し、ニトロ化、還元、三臭化リンを用いたブロモ化を行った。得られたブロモ体と、フランを Diels-Alder 反応によって付加させたマレイミド誘導体をカップリングさせ、ベンジル基を脱保護することで 3 を得た。

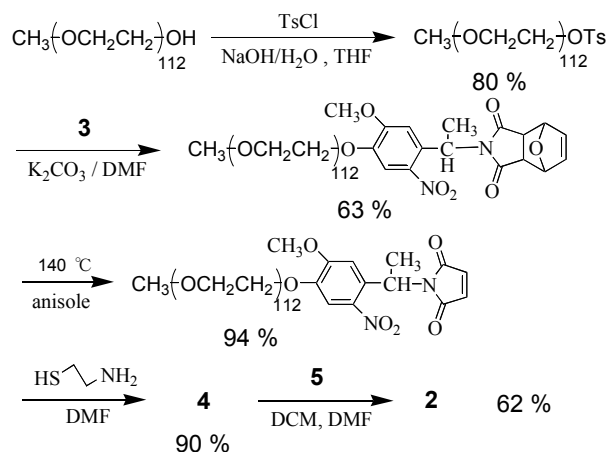
Scheme 1



分子量 5000 のポリエチレングリコールへの光分解性リンカーの導入、開始剤 **4** への変換、**4** を用いた **5** の重合の反応式と収率を Scheme 2 に示す。原料であるポリエチレングリコールモノメチルエーテルを塩基として少量の水に溶解させた NaOH を用いてトシルクロリドによりトシル化した。そこに、Scheme 1 で **3** をカップリングさせ、逆 Diels-Alder 反応により脱保護し PEO 末端にマレイミドを導入した。さらにシステアミンを付加させることで、PEO 末端に光分解性基を介してアミノ基が結合した開始剤 **4** を合成した。

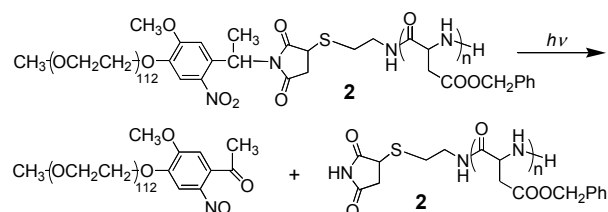
4 を用いて、ベンジルアスパルテートの N-カルボキシ酸無水物 **5** を開環重合し、目的の光分解性ブロック共重合体 **2** を得た (Scheme 2)。反応溶液の IR スペクトルによって反応を追跡した。反応が進行するにつれ、モノマーである **5** のカルボニル吸収が消失している。**2** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、PEO のメチレン鎖由来のピークと PBLA のベンジル位、あるいは芳香環由来のピークを確認することができた。積分比から、目的のブロック共重合体 **2** では、PEO 中のモノマーの重合度 112 に対し、PBLA 中のモノマーの重合度は 9 であることがわかった。

Scheme 2



2 に対して照射を行ったところ、照射前に見られた 240 nm, 300 nm 付近のニトロベンジル基由来の吸収は減少した。一方で、照射によって新たに 270 nm, 400 nm 付近にニトロソ体の吸収ピークが増大した。以上のことから、**2** が Scheme 3 に示すように光分解すると考えられる。

Scheme 3



謝辞

細胞アレイの研究は、理化学研究所との共同研究であり、共同研究者である理化学研究所前田バイオ工学研究室の宝田徹博士、中西淳博士（現 物質・材料研究機構）に深く感謝する。

文献

- 1) Yamaguchi K, Kitabatake T, Izawa M, Fujiwara T, Nishimura H and Futami T (2000) Novel silane coupling agents containing a photolabile 2-nitrobenzyl ester for introduction of a carboxy group on the surface of silica gel. *Chem. Lett.*, **2000**: 228-229.
- 2) Nakayama H and Yamaguchi K (2003) Controlled surface properties of photoreactive monomolecular layers containing nitrobenzyl ester. *Polym. Prep. Jpn.* **52**: 820.
- 3) Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K and Maeda M (2004) Photo-activation of a substrate for cell adhesion under standard fluorescence microscopes. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 16314-16315.
- 4) Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K and Maeda M (2006) Spatiotemporal control of cell adhesion on a self-assembled monolayer having a photocleavable protecting group. *Anal. Chim. Acta*, **578**: 100-104.
- 5) 中西淳、菊地由希子、井上敏、山口和夫、宝田徹、前田瑞夫 (2006) 光応答性基板上に形成した一細胞アレイを用いた細胞移動の顕微鏡観察. *日本分析化学会第 55 年会要旨集*. p. 182.
- 6) Sato T, Yamaguchi K and Yokoyama M (2006) Synthesis of amphiphilic block copolymer by macroinitiator containing photocleavable linker. *Polym. Prep. Jpn.* **55**: 2941.
- 7) Opanasopit P, Yokoyama M, Watanabe M, Kawano K, Maitani Y and Okano T (2005) Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J. Controlled Release* **104**: 313-321.