

学位論文題名

Micro-Patterned Immobilization of Cell Adhesive Ligands Based on Self-Organization.

(自己組織化に基づく細胞接着性リガンドのマイクロパターン固定化)

学位論文内容の要旨

【緒言】

生物活性を有する分子(ペプチド・タンパク質・DNA)の位置を制御した基板表面へのマイクロパターン固定化は、診断・バイオセンサー・バイオマテリアルなどの多くの応用が期待される。そして現在までに報告されている固定化法のほとんどは、フォトリソグラフィの手法に基づいている。

これに対し本研究では、自己組織化により形成される微細な構造の利用を試みた。高い湿度下で作製された両親媒性高分子のキャストフィルムは、表面に付着した水滴が鑄型となり、マイクロメートルスケールで規則正しいハニカム構造を持つ事が見出されている。この手法は特別な設備を必要とせず、かつ簡便であるという利点を持つ。それゆえ、このフィルムへの機能性の付与は、様々なマイクロパターン化表面を作製法する有用な手法になると期待される。

そこで本研究では、導入するターゲットとして細胞接着性リガンドを選択し、①予めリガンドを導入したポリマーを用いる、②反応性部位を持つパターンフィルムとリガンドの縮合反応を利用する、③ビオチン残基を持つパターンフィルムとの特異的相互作用を利用する、の三種類の手法によりリガンドのパターン化フィルムへの導入を行った。また、導入されたりガンドの認識能についても検討した。

【実験・結果】

リガンドを有する両親媒性ポリマーを用いたリガンドのパターン固定化

アクリルアミドを主鎖骨格とし、側鎖にリガンドであるラクトースと疎水性のドデシル基を有するポリマー-LacPを合成した。得られたポリマーのベンゼン溶液(0.5mg/ml)を80%の湿度下、20°Cでキャストしフィルムを作製した。フィルムを原子間力顕微鏡(AFM)により観察した結果から、このキャストフィルムは穴の直径が5μm、厚みが0.4μmのハニカム構造を有することがわかった。次にハニカムフィルム上に固定化されたラクトースとレクチンの相互作用を検討した。ハニカムフィルムをフルオレセインで蛍光ラベルしたエリスリナレクチン(FITC-ECA)の0.5mg/mlリン酸緩衝液(100mM, pH=7.3)に30分間浸し、リン酸緩衝液で洗浄した後

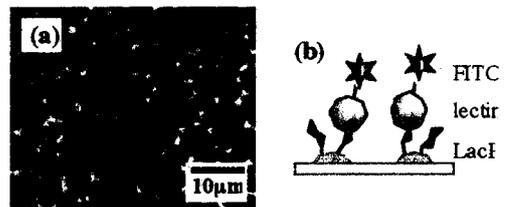
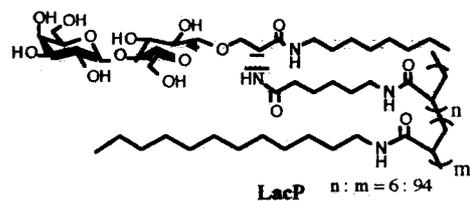


Fig. 1 (a) Fluorescence and (b) schematic image of cast films of LacP after immersion into FITC-lectin.

に蛍光顕微鏡で観察した。FITC 由来の緑色の発光部位 (Fig.1(a)) がハニカムパターン状であることから、パターンフィルム表面にラクトースが存在し、レクチンにより認識されることがわかった (Fig.1(b))。

### 反応性部位を持つパターンフィルム作製と縮合反応によるリガンドの固定化

側鎖に活性エステル基とドデシル基を有する両親媒性ポリマー-SucP を合成し、そのクロロホルム溶液 (1mg/ml) を 80%の湿度下、20°C でキャストする事によりハニカムフィルムを得た。このフィルムを FITC-ゼラチンの 0.1mg/ml の PBS 溶液 (10mM, pH=7.4) に室温で 6 時間浸漬した。蛍光顕微鏡で観察した結果 (Fig.2)、FITC-ゼラチンはハニカムパターン上に選択的に導入されたことが分かった。そこでこのフィルムの細胞認識能を調べるため、これを基板としてウシ大動脈由来血管内皮細胞を播種し、無血清条件下で表面への細胞接着性を検討した。その結果、未修飾のハニカムフィルムでは細胞の接着が弱く丸い形状であるのに対して、ゼラチンを導入したフィルムではよく接着して伸展する事が見出された (Fig.3)。これはパターン上に固定化されたゼラチンが細胞により認識されうる事を示唆する。

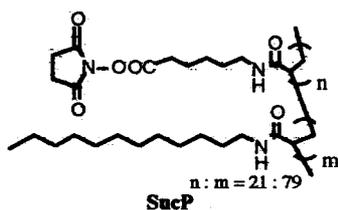


Fig. 2 Fluorescence image of cast films of SucP after immersion into FITC-gelatin solution

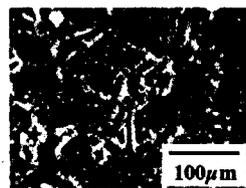


Fig. 3 Microscopic image of cultured cells on a gelatin-modified honeycomb film of SucP

### ビオチン残基を持つパターンフィルムの作製とリガンドの固定化

活性エステル基を有する両親媒性ポリマー-SucP とビオチンヒドラジドとの反応によりビオチンを有する両親媒性ポリマー-BioP を得た。ポリマー-BioP のクロロホルム溶液 (1mg/ml) を 80%の湿度下 20°C でガラス基板上に滴下し、ハニカムフィルムを作製した。ついで、得られたフィルムをアビジン溶液、ガラクトースとビオチン残基を有する水溶性ポリマー-GalBioAAm、蛍光ラベルされたガラクトースを認識するレクチン (FITC-RCA120) の溶液に順次浸漬し、洗った後に蛍光顕微鏡による観察を行った (Fig. 4(a))。FITC の緑色の蛍光発光がハニカムパターン状であることから、このフィルムはポリマー-BioP を鋳型として、アビジン、水溶性糖ポリマー-GalBioAAm、レクチンが順次結合した構造を持つことが示された (Fig. 4(b))。

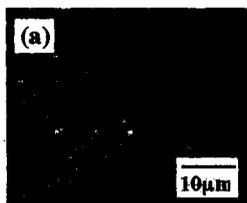
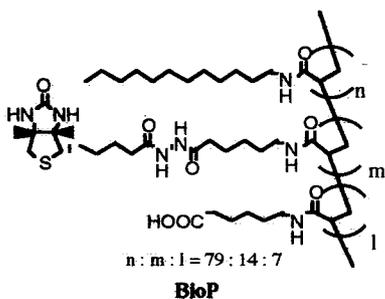
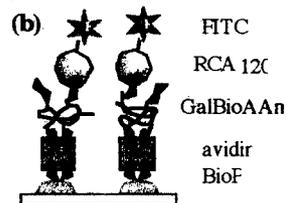


Fig. 4 (a) Fluorescence and (b) schematic image of cast film of BioP after immersion into avidin, GalBioAAm and FITC-RCA120 successively.



### 【結論】

以上の結果から、自己組織化に基づく、新しいリガンドのマイクロパターン化が可能である事が示された。この手法は、その簡便さ、ならびに自己組織化の特徴から、幅広い活用が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎  
副 査 教 授 山 岸 皓 彦  
副 査 教 授 下 村 政 嗣 (電子科学研究所)  
副 査 助 教 授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

## Micro-Patterned Immobilization of Cell Adhesive Ligands Based on Self-Organization.

(自己組織化に基づく細胞接着性リガンドのマイクロパターン固定化)

生物活性を有する分子（ペプチド・タンパク質・DNA）の位置を制御した基板表面へのマイクロパターン固定化は、診断・バイオセンサー・バイオマテリアルなどの多くの応用が期待される。現在までに報告されているマイクロパターン化法のほとんどは光リソグラフィの手法に基づいているが、この手法は加工できる基板に制限がある、非常に煩雑な工程を必要とする、などの欠点を持つ。

これに対し申請者は、自己組織化により形成される微細な構造の利用を試みた。高い湿度下で作製された両親媒性高分子のキャストフィルムは、表面に付着した水滴が鑄型となり、マイクロメートルスケールで規則正しいハニカム構造を持つ事が見出されている。この手法は特別な設備を必要とせず、かつ簡便であるという利点を持つ。それゆえ、このフィルムへの機能性の付与は、様々なマイクロパターン化表面を作製する有用な手法になると期待される。

申請者は、導入するターゲットとして細胞接着性リガンドを選択し、1) 予めリガンドを導入したポリマーを用いる、2) 反応性部位を持つパターン化フィルムとリガンドの縮合反応を利用する、3) ビオチン残基を持つパターン化フィルムとの特異的相互作用を利用する、の三種類の手法によりリガンドのパターン化フィルムへの導入を行った。また、導入されたリガンドの認識能についても検討した。本論文は5章からなり、その内容は以下のように要約できる。

第1章では、細胞接着性リガンドのマイクロパターン化を行う意義について述べた後、これまでに用いられている種々のマイクロパターン化法を概観し、ついでこれらの手法が持つ限界を克服する方法として自己組織化を用いる方法について述べている。

第2章では、リガンドを有する両親媒性ポリマーを用いたリガンドのパターン固定化について述べている。アクリルアミドを主鎖骨格とし、側鎖にリガンドであるラクトースと

疎水性のドデシル基を有するポリマーを合成した。得られたポリマーのベンゼン溶液を高い湿度でキャストしフィルムを作製した。フィルムを原子間力顕微鏡 (AFM) により観察した結果から、このキャストフィルムは穴の直径が $5\mu\text{m}$ 、厚みが $0.4\mu\text{m}$ のハニカム構造を有することがわかった。次にハニカムフィルム上に固定化されたラクトースとレクチンの相互作用を検討した。ハニカムフィルムをフルオレセインで蛍光ラベルしたエリスリナレクチンのリン酸緩衝溶液に 30 分間浸し、リン酸緩衝液で洗浄した後に蛍光顕微鏡で観察した。フルオレセイン由来の緑色の蛍光発光がハニカムパターン状に確認されたことから、パターン化フィルム表面にラクトースが存在し、レクチンにより認識されることが見出されている。

第3章では、反応性部位を持つパターン化フィルムの作製と縮合反応によるリガンドの固定化について述べている。側鎖に活性エステル基とドデシル基を有する両親媒性ポリマーを合成し、そのクロロホルム溶液を高い湿度下でキャストする事によりハニカムフィルムを作製した。このフィルムをフルオレセインで蛍光ラベル化されたゼラチンの溶液に室温で 6 時間浸漬した。蛍光顕微鏡で観察した結果から、蛍光ラベル化ゼラチンはハニカムパターン上に選択的に導入されたことが分かった。さらに、このフィルムの細胞認識能を調べるため、このフィルム上にウシ大動脈由来血管内皮細胞を播種し、無血清条件下で表面への細胞接着性を検討した。その結果、未修飾のハニカムフィルムでは細胞の接着が弱く丸い形状であるのに対して、ゼラチンを導入したフィルムではよく接着して伸展する事が見出された。この結果から、パターン固定化されたゼラチンが細胞接着性を持ち、細胞培養が可能であることが示された。

第4章では、ビオチン残基を持つパターン化フィルムの作製とリガンドの固定化について述べている。活性エステル基を有する両親媒性ポリマーとビオチンヒドラジドとの反応によりビオチンを有する両親媒性ポリマーを得た。得られたポリマーのクロロホルム溶液を高い湿度下でガラス基板上に滴下し、ハニカムフィルムを作製した。ついで、得られたフィルムをアビジン溶液、ガラクトースとビオチン残基を有する水溶性ポリマー、蛍光ラベルされたガラクトースを認識するレクチンの溶液に順次浸漬し、洗った後に蛍光顕微鏡による観察を行った。その結果、蛍光発光がハニカムパターン状であることから、このフィルムはポリマーを鋳型として、アビジン、水溶性糖ポリマー、レクチンが順次結合した構造を持つことが示された。

第5章では、本文を総括している。

以上のように、申請者は自己組織化に基づいて細胞接着性リガンドのマイクロパターン化を達成する新規な手法の確立に成功した。この手法は、その簡便さ、加工できる表面の幅広さ、導入できるリガンドの多様さなどから、細胞と基板の相互作用の研究等に大きく貢献できるものと考えられる。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有する者と認定した。