

博士論文

両性イオンポリマーと微細加工を
用いた毛髪再生医療用培養デバイス
に関する研究

(Zwitterionic polymers and microfabricated culture devices for hair regenerative
medicine)

横浜国立大学大学院
理工学府

鈴木 康平

Suzuki Kohei

2022年9月

目次

第 1 章	6
序論	6
1.1 研究背景	6
1.1.1. 再生医療と三次元細胞構造体の利用	6
1.1.2. 細胞の三次元組織の種類	7
1.1.3. 細胞培養による細胞凝集塊の作成法	10
1.1.4. 毛髪の機能と構造	12
1.1.5. 脱毛症と毛髪再生医療による治療	13
1.1.6. 細胞低接着コーティング材料	15
1.1.7. 微細加工容器の表面修飾法	17
1.1.8. オルガノイド形成時の細胞培養器の設計と培養プロセス	18
1.2 本研究の目的	19
1.3 本論文の構成	19
参考文献	23
第 2 章	25
両性イオンポリマーを用いた細胞低接着処理	26
2.1. はじめに	26
2.2. 細胞低接着材料の設計、合成および解析	26
2.2.1 本項の目的	26
2.2.2. 実験装置及び試薬	26
2.2.3. 実験手順	27
2.2.4. 実験結果と考察	28
2.2.5. 本項のまとめ	29
2.3. コーティング表面の物性評価	30
2.3.1. 本項の目的	30
2.3.2. 実験装置及び試薬	30
2.3.3. 実験手順	30
2.3.4. 実験結果と考察	31
2.3.5 本項のまとめ	33
2.4. PREVELEX コーティング表面の生体物質付着抑制能の評価	33

2.4.1.	本項の目的	33
2.4.2.	実験装置及び試薬	34
2.4.3.	実験手順	34
2.4.4.	実験結果と考察	37
2.4.5.	本項のまとめ	39
2.5	微細加工細胞培養器への適用	39
2.5.1.	本項の目的	39
2.5.2.	実験装置及び試薬	40
2.5.3.	実験手順	40
2.5.4.	実験結果と考察	42
2.5.5.	本項の目的	46
2.6	本章のまとめ	46
	参考文献	47
第3章		48
	微細加工技術を用いた培養器の構造最適化	48
3.1	はじめに	48
3.2	微細加工 PDMS 培養器の設計、作製	49
3.2.1	本項の目的	49
3.2.2	実験装置及び試薬	49
3.2.3	実験手順	49
3.2.4	実験結果と考察	50
3.2.5	本項のまとめ	51
3.3	細胞低接着コーティングおよびスフェロイド形成確認	51
3.3.1	本項の目的	51
3.3.2	実験装置及び試薬	51
3.3.3	実験手順	51
3.3.4	実験結果と考察	52
3.3.5	本項のまとめ	54
3.4	毛包原基の形成試験	55
3.4.1	本項の目的	55
3.4.2	実験装置及び試薬	55

3.4.3	実験手順	55
3.4.4	実験結果と考察	56
3.4.5	本項のまとめ	58
3.5	毛包原基の形状評価	58
3.5.1	本項の目的	58
3.5.2	実験装置及び試薬	58
3.5.3	実験手順	58
3.5.4	実験結果と考察	59
3.5.5	本項のまとめ	60
3.6	毛包原基の機能評価	60
3.6.1	本項の目的	60
3.6.2	実験装置及び試薬	60
3.6.3	実験手順	61
3.6.4	実験結果と考察	63
3.6.5	本項のまとめ	64
3.7	調製した毛包原基の毛包再生能	64
3.7.1	本項の目的	64
3.7.2	実験装置及び試薬	65
3.7.3	実験手順	65
3.7.4	実験結果と考察	67
3.7.5	本項のまとめ	68
3.8	本章のまとめ	68
	参考文献	69
第4章		70
	遠心処理プロセスを用いた毛包原基の調製	70
4.1	はじめに	70
4.2	遠心処理による細胞の集合確認	70
4.2.1	本項の目的	70
4.2.2	実験装置及び試薬	71
4.2.3	実験手順	71
4.2.4	実験結果と考察	71

4.2.5 本項のまとめ	73
4.3 遠心処理による毛包原基の形成試験	73
4.3.1 本項の目的	73
4.3.2 実験装置及び試薬	73
4.3.3 実験手順	74
4.3.4 実験結果と考察	74
4.3.5 本項のまとめ	76
4.4 遠心処理による毛包原基の遺伝子発現評価および毛包再生能	76
4.4.1 本項の目的	76
4.4.2 実験装置及び試薬	76
4.4.3 実験手順	77
4.4.4 実験結果と考察	78
4.4.5 本項のまとめ	79
4.5 本章のまとめ	80
参考文献	81
第5章	82
結論、総括	82
謝辞	84
業績	85

第一章

序論

1.1 研究背景

1.1.1.再生医療と3次元細胞構造体の利用

再生医療とは、幹細胞等を用いて、臓器や組織の欠損や機能障害・不全に対し、それらの臓器や組織を再生し、失われた人体機能の回復を目指す医療である。既存の医薬品では治療が難しいものや、治療法が確立されていない疾患に対して新たな治療法となる可能性が期待されている[1]。

なかでもiPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞や、間葉系幹細胞や造血幹細胞などの体性幹細胞を用いた研究開発、実用化が進められている。表1-1に示すようにジャパン・ティッシュ・エンジニアリング社の皮膚再生シートのジェイスを初めとし、国内で様々な再生医療等製品が承認されている(令和2年9月時点)[2]。

表 1-1 国内の再生医療等製品の承認品目[2]

再生医療等製品の承認品目			
製造販売業者	製品名（一般的名称）	効能、効果又は性能	備考
株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング	ジェイス（ヒト（自己）表皮由来細胞シート）	重症熱傷 先天性巨大色素性母斑 表皮水疱症	平成19年10月29日承認 平成28年9月29日承認（適応追加） 平成30年12月28日承認（適応追加）
	ジャック（ヒト（自己）軟骨由来組織）	膝関節における外傷性軟骨欠損症又は離断性骨軟骨炎（変形性膝関節症を除く）の臨床症状の緩和	平成24年7月27日承認
	ネビック（ヒト（自己）角膜輪部由来角膜上皮細胞シート）	角膜上皮細胞欠損症	令和2年3月19日承認
JCRファーマ株式会社	テムセルHS注（ヒト（同種）骨髄由来間葉系幹細胞）	造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病	平成27年9月18日承認
テルモ株式会社	ハートシート（ヒト（自己）骨格筋由来細胞シート）	重症心不全	平成27年9月18日承認（条件・期限付承認）
ニプロ株式会社	ステミラック注（ヒト（自己）骨髄由来間葉系幹細胞）	脊髄損傷に伴う神経症候及び機能障害の改善	平成30年12月28日承認（条件・期限付承認） 先駆け審査指定品目
アンジェス株式会社	コラテジエン筋注用 4mg（ヘベリミノゲン ペルプラスミド）（※）	慢性動脈閉塞症における潰瘍の改善	平成31年3月26日承認（条件・期限付承認）
ノバルティスファーマ株式会社	キムリア点滴静注（チサゲンレクルユーセル）	再発又は難治性のCD19陽性のB細胞性急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫	平成31年3月26日承認
	ソルゲンスマ点滴静注（オナセムノゲン アベリボベク）（※）	脊髄性筋萎縮症（遺伝子検査により脊髄性筋萎縮症の発症が予測されるものも含む）	令和2年3月19日承認

（※）遺伝子治療用製品

ここで再生医療等製品を作製するための1つの流れとして図1-1に示すように『幹細胞の増殖⇒目的細胞への分化誘導⇒三次元組織の形成⇒移植』が挙げられる。

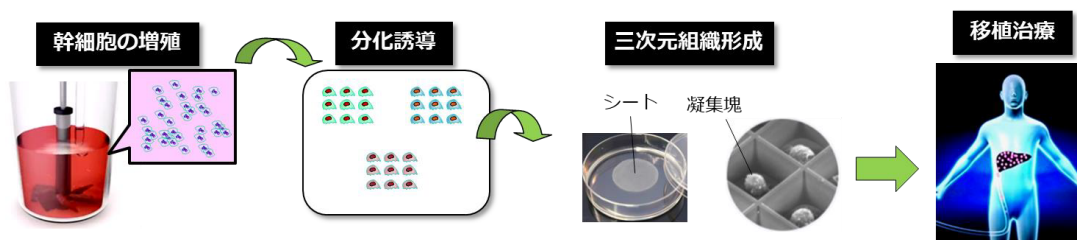


図 1-1 再生医療の原料構築から移植治療までの流れの一例

この中で三次元組織化が1つのポイントとされる。シングル細胞を移植した場合、細胞は移植部位への生着率が低いことが課題とされる。一方でシングル細胞が三次元組織化した細胞シートや細胞凝集塊を用いた場合、移植時の組織への生着率が向上することが知られている [3]。その他にも三次元組織は二次元組織と比較し、細胞の増殖が促進され、治療能力や、生存率、薬物代謝性が *in vivo* の細胞機能と近くなることが示されている (図 1-2) [4]。そのためがん研究、薬剤スクリーニング、組織構築などの幅広い分野で盛んに応用されている。

特徴	二次元培養	三次元培養
形状	単層	塊 / 楕円体 / 多層
微細構造	なし	有り
培養環境	非生理学的	生理学的
化合物や栄養の拡散	平面的	立体的(濃度勾配有り)
酸素供給	平面的	立体的(濃度勾配有り)
細胞間結合	低	高
細胞増殖	高	高
細胞分化	—	高
薬物代謝(CYP)	低	高
毒性試験	低	高
薬物感受性	高	—

図 1-2 二次元培養と三次元培養の比較 [4]

1.1.2. 細胞の三次元組織の種類

三次元組織には大きく面形状の細胞シートと点形状の細胞凝集塊、線形状の細胞ファイバーに分類される [5]。

細胞シート

細胞シートは細胞間結合が保たれたシート状の組織である。図 1-3 に示すように温度応答性ポリマー（PIPAAm）を塗布した基材上で細胞培養することで形成される[6]。本ポリマーは細胞培養条件である 37℃では疎水性となり培養液中の足場タンパク質（ECM）が吸着しその上に細胞が接着する。37℃の条件で接着細胞を培養し続けることで細胞間結合を形成しシート状の層を形成する。その後温度を 20℃程度に下げることによりポリマーの構造変化による水和が起こり表面が親水性へと変化し、細胞が ECM とともに脱離することで細胞シートが得られる。

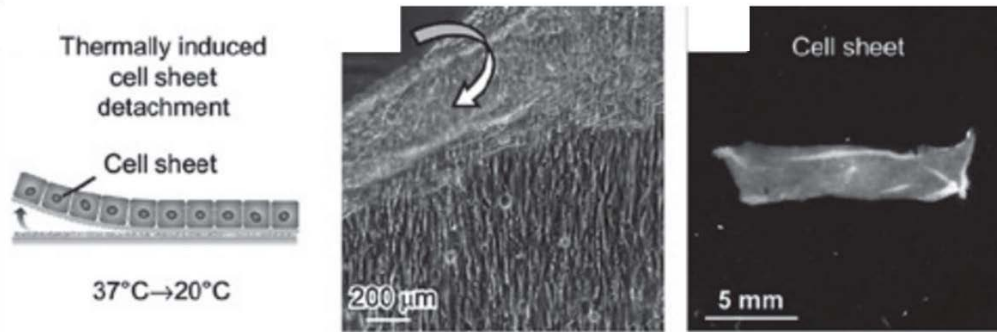


図 1-3 温度応答性ポリマーを用いた細胞シート作製[6]

細胞シートは積層による立体組織の構築や血管網の構築も検討がなされており、角膜や心臓等の治療に向けた臨床研究・治験や実用化が進められている(図 1-4)[7]。

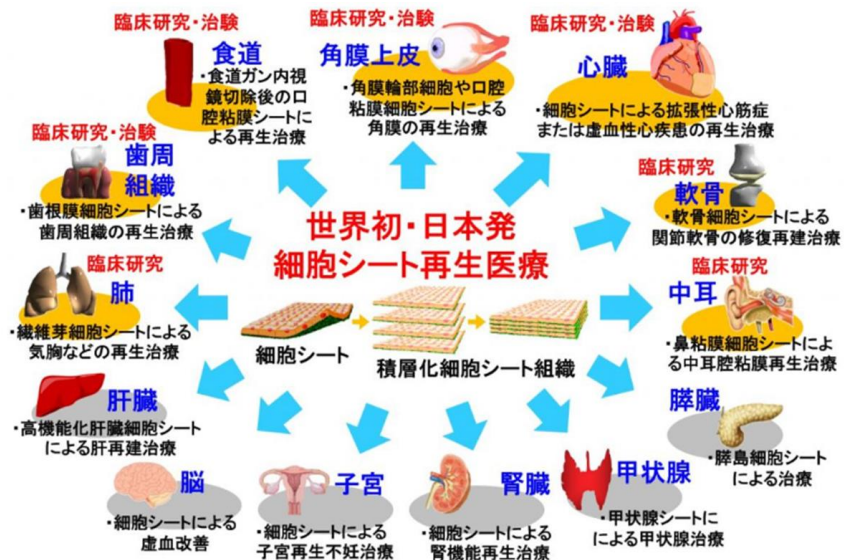


図 1-4 細胞シートの再生医療への展開 [7]

細胞凝集塊 [4]

細胞凝集塊は単一あるいは複数種の細胞が集合して形成された塊である。細胞凝集塊はスフェロイドとオルガノイドに分類される。スフェロイドは、*in vitro* で細胞間の相互作用を促し、細胞同士が凝集した球状体のことを言う。スフェロイド培養は、正常神経幹細胞や胚細胞の培養法として確立された[8]が、グリオーマ幹細胞やがん幹細胞などがん分野での研究も多い。また、スフェロイド培養は二次元培養では機能保持が難しい肝細胞等の細胞[9,10]でも試みられ効果を上げている。一方でオルガノイドとは、臓器特異的な複数の細胞種から作られる三次元組織・臓器様物のことを言い、生体に近い構造や機能を有する。臓器の幹細胞や前駆細胞から作られることもあり、その場合は生体内と同様の機構により自己組織化したものと考えられている。近年では、それぞれの目的に合わせて作られたオルガノイド、ミニ臓器が報告されている[11]。

細胞シートを移植する際には移植部位の切開が必要だが、スフェロイドの場合は静脈注射やカテーテルを用いた移植法も考えられることから低侵襲性の治療法になりうると考えられる。変形性膝関節症(図 1-5)や心臓病(図 1-6)等で臨床研究が進められている[12,13]。その他にも得られたスフェロイドを原料としてバイオ 3D プリンターなどを使用して細胞構造体やミニ臓器を形成させる試みも行われている[14]。

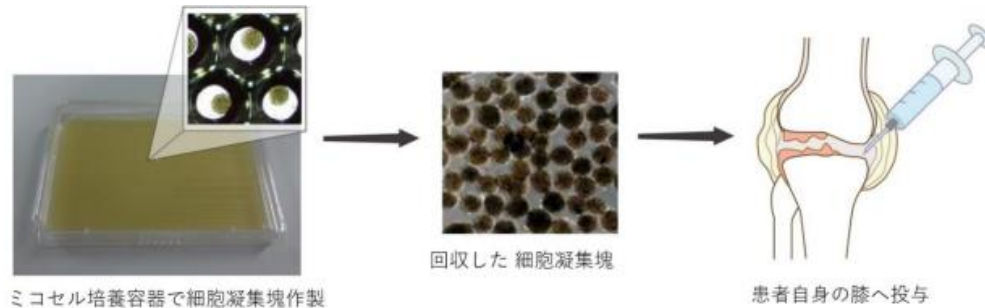


図 1-5 細胞凝集塊の軟骨治療への応用[12]

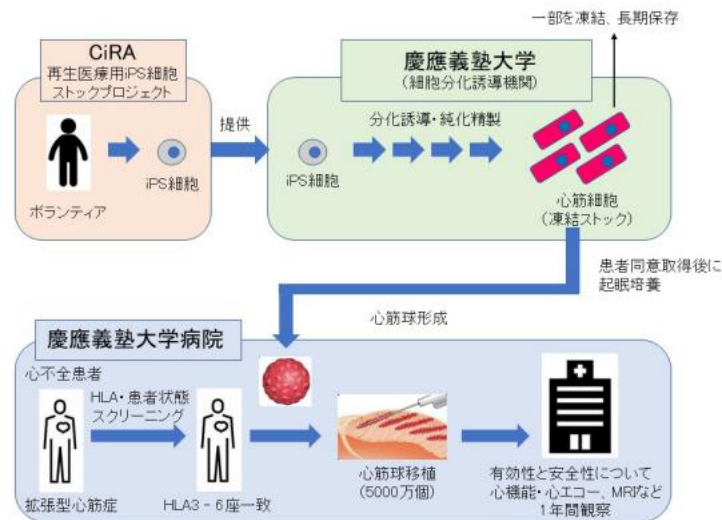


図 1-6 細胞凝集塊の心臓治療への応用[13]

1.1.3. 細胞培養による細胞凝集塊の作成法[15,16]

スフェロイドやオルガノイドなどの細胞凝集塊の作製方法として、様々な培養方法が検討されている。細胞凝集塊を形成する際、凝集塊の形成効率やサイズ均一性が重要となる。下記に 4 つの方法を例示する。

(a) ハンギングドロップ法

ハンギングドロップ法は、気液界面法の一つで、液相-気相の界面に細胞が集積することを利用した手法である。まず細胞懸濁液をシャーレ等の蓋の裏面にスポットする。蓋を裏返すと表面張力と重力の関係から液滴が形成され、保持される。重力により、細胞は

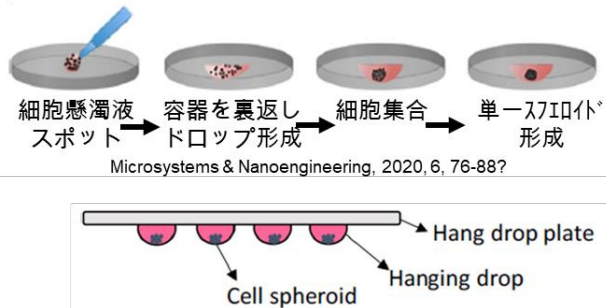


図 1-7 ハンギングドロップ法でのスフェロイド形成[15,16]

ゆっくりと液滴の最下点に沈降し、凝集してスフェロイドを形成する (図 1-7)。細胞密度や懸濁液量を変えることで、スフェロイドサイズの変更が出来る。また異なる種類の細胞の共培養も実現できる[17]。本方法の課題としては大きな液滴 (50 μL 以上) が形成できない点や、スフェロイドに悪影響を与えることなく細胞培養液の交換ができないことが挙げられる[16]。また本方法では慎重かつ正確なりキッドハンドリングが必要であり、手作業で行うと困難な場合がある。そこで操作性を改善するハンギングドロッププレートが開発されて

いる。例えば Perfecta3D、GravityPLUS™、Elplasia、MAPlate™、5RC96などが挙げられる。

(b) リアクター培養

細胞の浮遊培養も細胞凝集塊構築法の一つとして著名である。浮遊培養では、懸濁液の粘性を高める薬剤を取り入れる方法や、攪拌システムを利用する方法がある（図1-8）。例えばスピナー

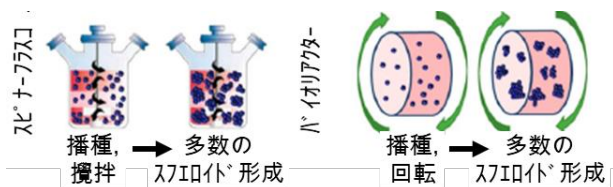


図 1-8 リアクター培養法でのスフェロイド形成 [15]

フラスコやバイオリクターが使用され、シャーレ表面への細胞接着を抑制するために攪拌を利用する。スピナーフラスコでは細胞懸濁液の添加後、容器で攪拌を行う。またバイオリクターは、攪拌ではなく細胞培養容器自体が回転するものである。

この方法では、培地交換は簡便に行うことが出来、スフェロイドのバッチ生産が可能である。一方で形成されるスフェロイドは通常大きく不均一な大きさとなる[18]。また攪拌により細胞がせん断力を受けるため、細胞に影響を与える可能性がある[17]。なお回転式バイオリクターではせん断力はスピナーフラスコほど大きくはない。

(c) 低接着表面での培養法

リアクター培養以外に一度に多量のスフェロイドを形成する方法として、細胞低接着処理した培養器が使用されている。本基

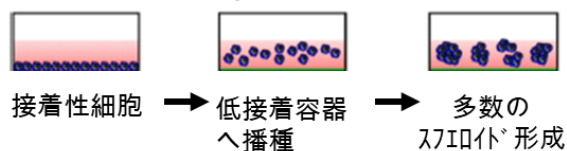


図 1-9 低接着表面でのスフェロイド培養 [15]

材上では播種細胞は表面に接着することができない。その代わりに、細胞同士が相互作用により凝集しスフェロイドを形成する（図1-9）。企業による製品化も盛んに行われており、種々の化学的、物理的処理により低接着処理した製品を開発している。主な市場製品としては、Nunclon™ Sphera™、Nunc™ UpCell™、Corning Ultra-Low Attachment サーフェス、CELLSTAR®、Lipidure®-COAT、NanoCulture、Primesurfaceなどが挙げられる。これらの市販製品は、がん細胞、間葉系幹細胞、および異種細胞型の混合などの多様な細胞からのスフェロイド生成に使用されてきた[16]。

本方法では簡便な播種操作で、大量の細胞スフェロイドが形成できる。しかしながら本方法では細胞凝集塊を形成する際に細胞数にばらつきが生じ、サイズ制御は困難である[19]

(d) マイクロウェルでの培養法

細胞低接着処理のみでは均一なスフェロイド形成は困難である。そこで微細加工技術を用いた培養器が開発されている。微細加工に

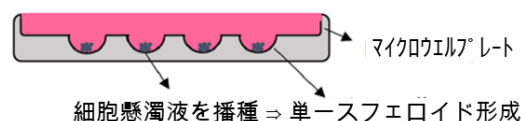


図 1-10 マイクロウェル培養器でのスフェロイド培養 [16]

より作製されたマイクロウェルでは、通常マイクロメートルスケールの小さな物理的区画に細胞を閉じ込め、細胞間の相互作用が促進される。本方法ではマイクロウェル内に均一な数の細胞が集合するため、再現性良く大量の均一スフェロイドを形成できる(図 1-10)。

マイクロウェルは、様々なサイズ、形状、深さで設計され、スフェロイドの大きさを制御することができる。またマイクロウェルの表面は、通常細胞低接着処理が施される。マイクロウェルを搭載した市販品も販売されている。主なものとして EZSPHERE™、AggreWell™、Elplasia® plate、SpheroFilm、3D Petri Dish® micro-mold、ミコセル®、などが挙げられる。

これらの製品は 1 枚では形成出来るスフェロイドの個数に制限があるが、自動分注装置などの自動化装置と統合することで、多量のプレートに細胞を播種し、大量かつ均一なサイズと形状の細胞スフェロイドを生成することができる。そのため大規模製造に採用するのに適した技術と考えられる。

ここまでに記述した 4 つの細胞凝集塊形成法の特徴を表 1-2 に示す。本論文では均一な細胞凝集塊の量産化が可能な、マイクロウェル培養器にフォーカスする。

表 1-2 細胞凝集塊形成プロセスの特徴[15]

Cell spheroid generation technology	Desired characteristics of cell spheroid manufacturing process						Minimum requirement for labor and special equipment
	Tight process control	Good reproducibility	Fast turnaround ^a	High throughput ^b	Good scalability	Compatibility with adjacent processes	
Hanging drop	Good	Good	Slow	Medium	Limited	Low	Low
Low adherence substrate	Low	Medium	Slow	High	Limited	Low	Low
Microwells	Good	Good	Slow	High	Limited	Medium	Low
Bioreactor	Low	Medium	Slow	High	Good	Medium	High

^aSlow^a if processes take >1 day in general.

^bUsed with liquid handling station.

1.1.4. 毛髪機能と構造 [21]

毛髪は人間が生まれてから一生涯再生を繰り返す小器官であり、生命維持には必須ではないが、ヒトの見た目の印象に大きく影響するパーツの 1 つである。毛髪を生み出す器官である毛包は発生過程の初期において、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用により誘導される

(図 1-11) [20]。まず胎生期の未成熟な表皮において上皮系細胞層が肥厚し、真皮の間葉系細胞集塊を包み込むことで、毛包発生の原始毛芽（毛包原基）を形成する。この毛包原基では、上皮系及び間葉系の細胞が互いに成長・増殖因子を提供しており、これにより各細胞が分化することで毛包を形成し、毛髪が成長する。

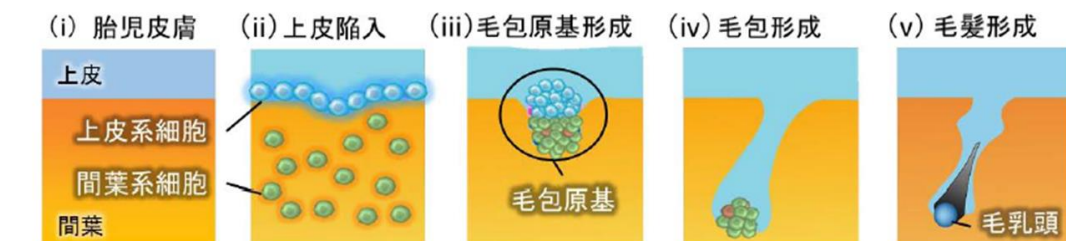


図 1-11 毛髪の発生過程[21]

胎生期に形成された毛髪は一生涯再生し続ける。成長期、退行期、休止期という一定のサイクル（毛周期）を繰り返す(図1-12)[22]。成長期では毛根に存在する毛乳頭細胞上部に位置する毛母細胞が、毛乳頭細胞の指令により活発に細胞分裂を繰り返し、細胞を押し上げることで毛髪を成長させる。退行期では、この毛母細胞が細胞分裂を弱め、毛母や毛乳頭が委縮する。これに伴って毛包が毛髪を成長する働きを停止し、皮膚上部に委縮することで毛髪は抜け落ちる。一般的に、ヒト頭髪では成長期は2~6年程度、退行期は2~3週間程度、休止期は3か月程度と言われている。毛周期は毛髪ごとに異なっているため、頭髪全体で常に一定数が成長期として存在する。

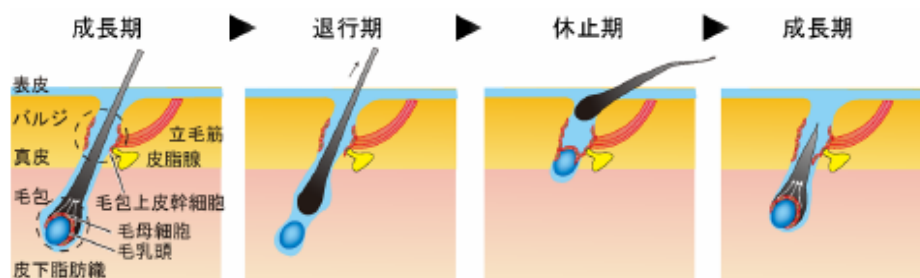


図 1-12 毛包の構造および毛周期[21]

1.1.5. 脱毛症と毛髪再生医療による治療

脱毛症とは、加齢や怪我、ストレス、薬剤治療、病気の副作用などの様々な原因により毛包が縮小もしくは脱落することで毛髪が形成されなくなる症状である。医学的には毛密度が生来の50%以下に低下した場合を指す。脱毛症には脂漏性脱毛症、円形脱毛症、女性型脱毛症など様々な種類が存在するが、最も患者数が多い脱毛症は男性型脱毛症（Androgenic

Alopecia, AGA) であり、世界中で約 106 万人が 1 年間で脱毛改善のために育毛剤や頭髮移植などの治療を受け、このうち約 36 万人が手術的治療を受けたと推定された[23]。国内でも成人男性の約 4 人に 1 人が脱毛症に悩んでおり、脱毛症は社会的な問題として取り上げられるようになった。脱毛症には AGA 以外にも脂漏性脱毛症や円形脱毛症、瘢痕性脱毛症、および薬剤脱毛症などが挙げられる。遺伝やホルモンなど原因や症状により分類され、治療法が開発されてきている。

近年では再生医療を用いた毛髪再生に関わる研究が進められている。その 1 つとして胎児期の毛包発生時の上皮-間葉系細胞の相互作用を *in vitro* で再現し移植用の毛包原基の形成を行うアプローチが取られている [24, 25]。最近の報告では上皮と間葉の細胞ペレットを別々に遠心分離で調製し、移植直前に合体させて上皮-間葉相互作用を誘発するという器官-胚培養法を用いて、マウス皮膚背部の毛包を効率よく再生できることが報告されている [26] (図 1-13)。

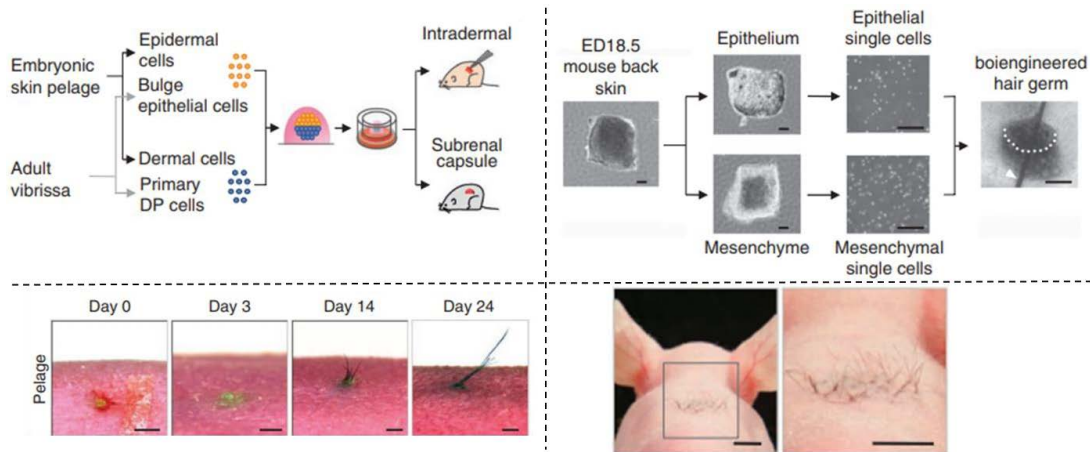


図 1-13 上皮、間葉系細胞による毛包原基の作製とその移植による毛髪再生 [26]

この技術は、毛髪再生医療への新しいアプローチとして期待されている。しかし、現在のところ、顕微鏡下で手作業で毛包原基を作製する必要があるため、この手法には限界がある。一人の患者を治療するためには、数十万個の毛包が必要となるため、このような手間のかかる作業は生産性の観点から現実的ではないためである。

我々は先行研究にて毛包原基の形成にマイクロウェルプレートを用いた培養方法を適用した[27] (図 1-14)。上皮細胞と間葉系細胞を混合して実験室で作製したマイクロウェルプレートへ播種すると、2 種類の細胞は最初はランダムな分布を介して 1 つの凝集体を形成していた。時間経過とともに自発的に互いの細胞が分離し、3 日間後にはダンベル形状に分離した

の毛包原基を形成するようになった。自己相分離した毛包原基は、ヌードマウスに移植すると、ヘアサイクルを繰り返しながら発毛した。

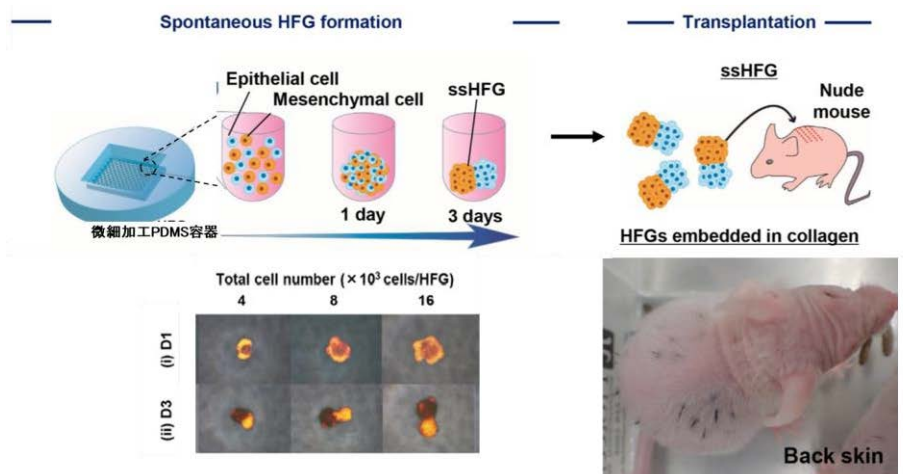


図 1-14 微細加工 PDMS 容器を用いた毛包原基の大量調整法 [27]

マイクロウェルには均一な数の細胞が入るためサイズ制御された凝集塊を大量に形成可能である。しかしながら本研究では再生医療へ適用する際にいくつか課題がある。例えば細胞低接着処理および微細加工 PDMS 容器の構造最適化が挙げられる。細胞低接着材に関して先行研究では **pluronic®-F127** をコーティング材料として使用した。しかしながら本コーティング材料は溶出による生体毒性が見られることや、またコーティング後に乾燥させての保存が出来ないなど、実用化に際しては課題がある。また微細加工 PDMS 容器はマイクロウェルの形状として丸底タイプ以外の構造は検討されていない。マイクロウェル培養器でオルガノイドを培養する際には、ウェル形状によりオルガノイドの形成率が変わることが分かっている。以上のことから新規細胞低接着材料の適用検討およびマイクロウェル培養器の構造の検討が必要と考えられる。

1.1.6. 細胞低接着コーティング材料

先に紹介した通り、培養器を用いて細胞凝集塊を形成する際には、培養容器に細胞低接着処理が行われる。細胞低接着処理としては化学的、物理的処理が挙げられる。特に細胞低接着コーティング材料による化学的処理は、基材の種類や構造が変わった場合でも広く適用可能であることから、盛んに研究が進められている。

一般に細胞接着性には基
材の表面物性（親疎水性お
よびゼータ電位）が密接に
関係することが示されてい
る[28]。細胞は表面に吸着し
タンパクを介して接着す
るが、静電的な相互作用や
疎水性相互作用によりタンパクは基材表面に吸着する(図 1-15)。

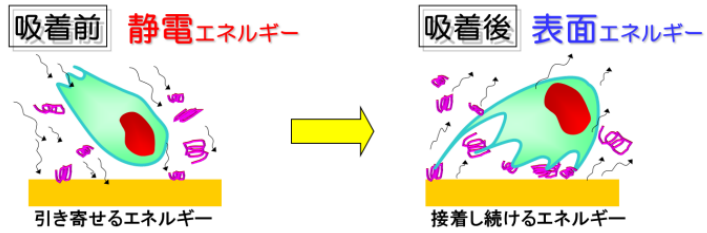


図 1-15 細胞接着に関わる物性

表面電位が正、あるいは負の場合は培養液中に豊富に存在する荷電タンパク質が表面に吸着し、それを足場として細胞が接着・伸展する。一方で表面電位が中和されている場合はタンパク質吸着が抑制され、結果として細胞接着を抑制出来る。また表面の親疎水性に関して、疎水性の表面ではタンパク質や細胞が付着後、疎水性相互作用により表面から脱離しづらく、一方で親水性の表面では疎水性相互作用が弱い
ため、脱離しやすい。これを踏まえると低接着材をコーティングした表面物性としては①表面電荷が中性付近であること②親水性の2点が求められる(図 1-16)。

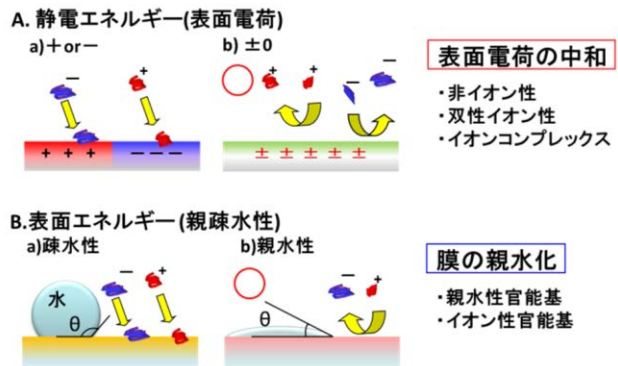


図 1-16 細胞低接着材料に求められる物性

これらの物性を付与するコーティング材料として、様々なポリマーの研究がなされている。非イオン性材料と双性イオン性材料の2つのタイプがある。例えば荷電ユニットを持たない高親水性のノニオン性ポリマーや、電荷中和型のポリマーなどが挙げられる(図 1-17)。代表的なポリマーを下記で紹介する。

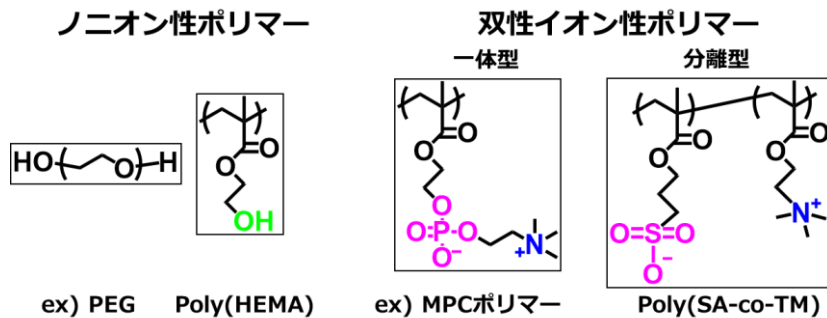


図 1-17 細胞低接着材料の具体例

ノニオン性ポリマー

ノニオン性ポリマーとしては一般に親水性の極性官能基を含む材料が望ましい[29]。代表的な非イオン性親水性材料として、ポリエチレングリコール (PEG) 共重合体が挙げられる[30]。PEG 共重合体のコーティング表面は生体物質付着抑制能に加え、非毒性、非免疫原性などが確認されている。その他の代表的な非イオン性材料としては、Poly(2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (=pHEMA) [31]、N-(2-ヒドロキシプロピ)メタクリルアミド[32]がある。これらのポリマーは、インプラント、バイオセンサー、組織工学用途など、幅広いバイオメディカル用途で使用されている。

両性 (双性) イオンポリマー

電荷中和型の両性イオンポリマーはポリベタインとポリアンフォライトの2種類に大別される[33]。一体型のポリベタインは正負の荷電種が同一モノマー上に存在し、分離型のポリアンフォライトには異なる共重合体上に存在する。両性イオン性の材料は、非イオン性の材料よりも著しく強い水和効果と優れた防汚性を示す[34]。代表的なポリベタインとしては、ポリ(スルホベタイン・メタクリレート)、ポリ(カルボキシベタイン・メタクリレート)、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとのポリマー (MPC ポリマー) [28]が挙げられる。また分離型のポリアンフォライトの荷電モノマーの代表的な組み合わせとしては、正電荷の [2-(メタクリロイルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムクロライドと [2-(アクリロイルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムクロライド、負電荷の 3-スルホプロピルメタクリル酸カリウム塩と 2-カルボキシエチルアクリレートなどが挙げられる。

両性イオンポリマーの中でも MPC ポリマーは、細胞膜を模倣したリン脂質極性基を持ち、細胞に対して全く無害であることから、バイオ医療機器や口腔内への防汚コーティングについて臨床試験を含む広範囲な検討が行われている[35]。

細胞低接着能に加え、実用化に向けてはいくつかの他の要因が重要な役割を果たす[36]。例えば、コンフォーマルと均一コーティング、ガンマ線滅菌、保存安定性、生体適合性、およびコストなどが含まれる。

1.1.7. 微細加工容器の表面修飾法

先述した通り、マイクロウェル培養器を用いた細胞凝集塊形成は均一サイズの凝集塊を大量調製する方法として有効な手法である。一方でマイクロウェル培養器は数百 μm サイズの微細加工がなされており、細胞低接着材料を塗布する際に課題が見られる。具体的には簡便

な塗布法であるキャスト法（コーティング溶液を注ぎ乾燥）等の方法では段差に追従して薄膜で均一塗布する（コンフォーマル薄膜塗布）ことが困難とされる[37]。そこで極薄膜のコーティングを達成する手法として、表面開始-原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP)、自己組織化単分子膜 (SAM)、蒸着など様々なアプローチが研究されている。

具体的には、ATRP は非イオン性の親水性ユニットまたは両性イオン性ユニットからなる高密度で均一なポリマーブラシを超薄膜（～30 nm）で作製するのに用いられる。例えば SI-ATRP により双性イオンポリマーのポリカルボキシベタインメタクリレート (Poly(CB)) のポリマーブラシを作製すると、25 nm 以下の極薄膜で高親水性を示し生体物質の付着を抑制可能である(図 1-18) [38]。

SAM の一例としてはオリゴエチレングリコールで終端したアルカンチオール SAM が使用されている。また、蒸着法も極薄のポリマー層で表面をコーティングする方法の 1 つであり、電材用途でも広く使用されている[39]。上記の方法で改質した表面は、タンパク質の吸着とその後の細胞接着が著しく減少した[40]。上記のアプローチを用いることでは薄膜でのコンフォーマル塗布および細胞接着抑制能を付与可能であるが、一方で複雑なプロセスや有害な触媒の使用、高価な装置や材料が必要など、再生医療分野での実用化に向けてはいくつかの課題がある。したがって、簡便で生体適合性の高いコーティングプロセスにより、マイクロウェル上に極薄の層を形成可能なコーティング材料が望まれている。

1.1.8. オルガノイド形成時の細胞培養器の設計と培養プロセス

マイクロウェルの構造には半球状や U 底、逆ピラミッド型、円錐型 (conical)、鉛筆型 (semispherical) など様々な形状が挙げられ、また深さや開口広さなども様々なパターンのもが存在する。例えば EZSPHERE™, AggreWell™, Elplasia などのプレートが市販されている(図 1-19)。

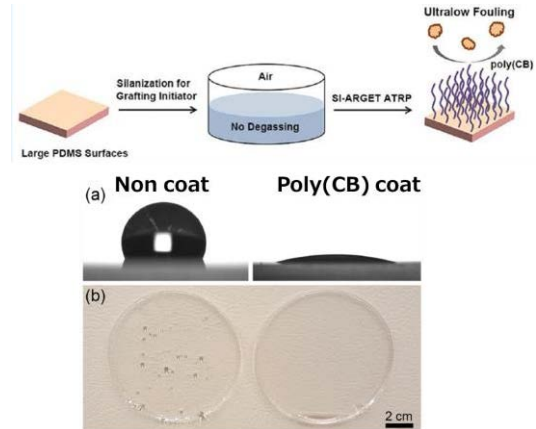


図 1-18 SI-ATRP で作製した薄膜ポリマーブラシのバクテリア付着抑制[38]

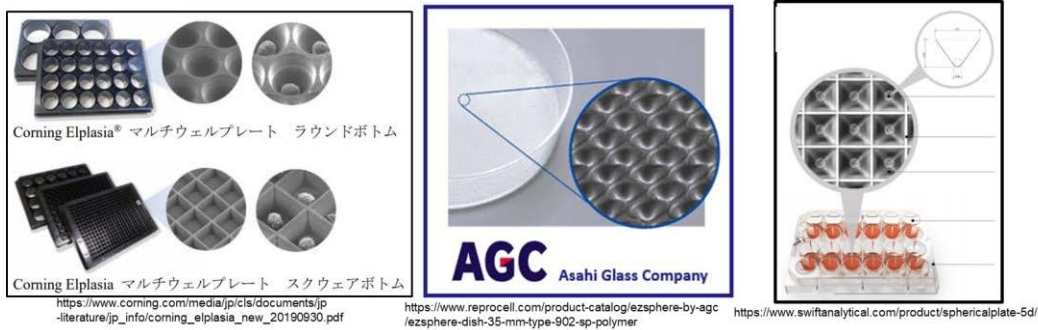


図 1-19 市販されている様々なマイクロウェル培養器

マイクロウェル培養器で培養する際にはアプリケーションやスケールに合わせて適切なマイクロウェル構造を選択する必要がある。例えばマイクロウェルのウェル構造を変えることでがん細胞でのスフェロイドの形成効率やサイズが制御できることが報告されている(図 1-20)[41]。

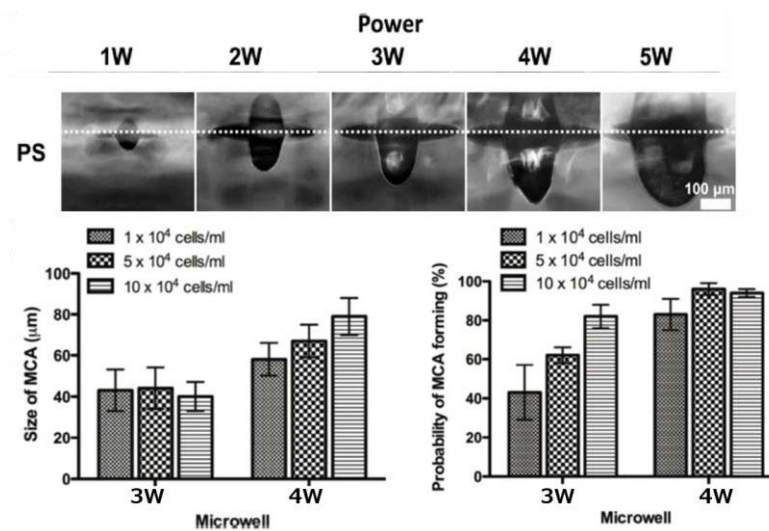


図 1-20 マイクロウェル形状によるスフェロイドサイズおよび形成率制御 [41]

1.2 本研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では毛髪再生医療の実用化に向けた毛包原基形成用の微細加工培養器の最適化を目的とした (図 1-21)。

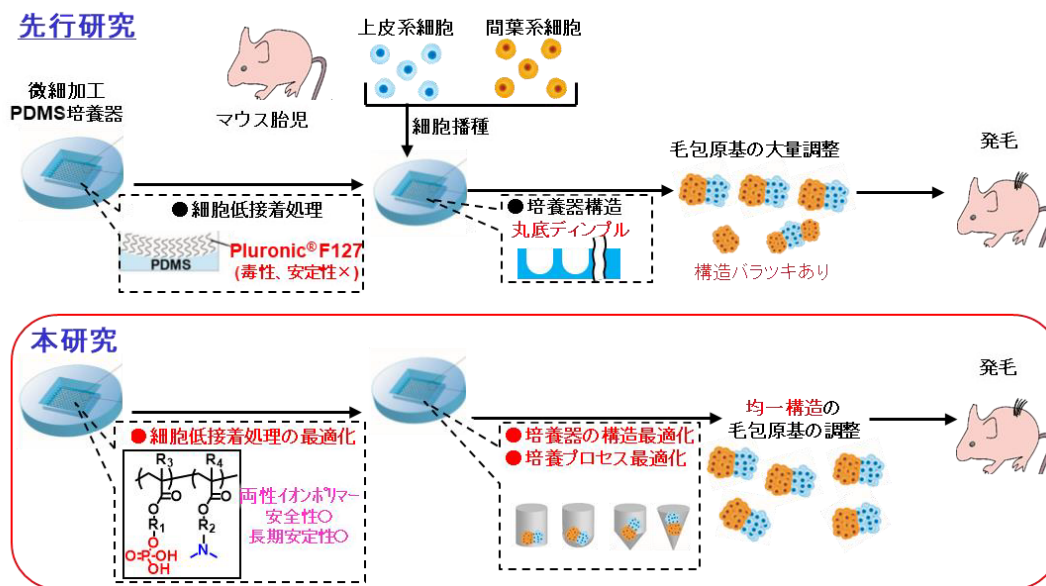


図 1-21 本研究の先行研究との比較

先行研究において微細加工 PDMS 培養器を用いた毛包原基の大量調整が報告されている。課題として再生医療に適用可能な安全性、安定性を有する細胞低接着処理材の開発、培養容器の構造最適化、および均一性の高い毛包原基の形成が挙げられる。本研究では本課題の解決に向け、細胞低接着コーティング材料の開発、微細加工 PDMS 培養器の構造検討、および培養プロセスの検討を行う。以上の一連の検討において、作製した毛包原基の構造や遺伝子発現を評価すると共に、移植試験による発毛効果を評価する。

1.3 本論文の構成

本論文は六章から構成されており、各章の概要は以下の通りである（図 1-22）。

第2章 両性イオンポリマーを用いた細胞低接着処理

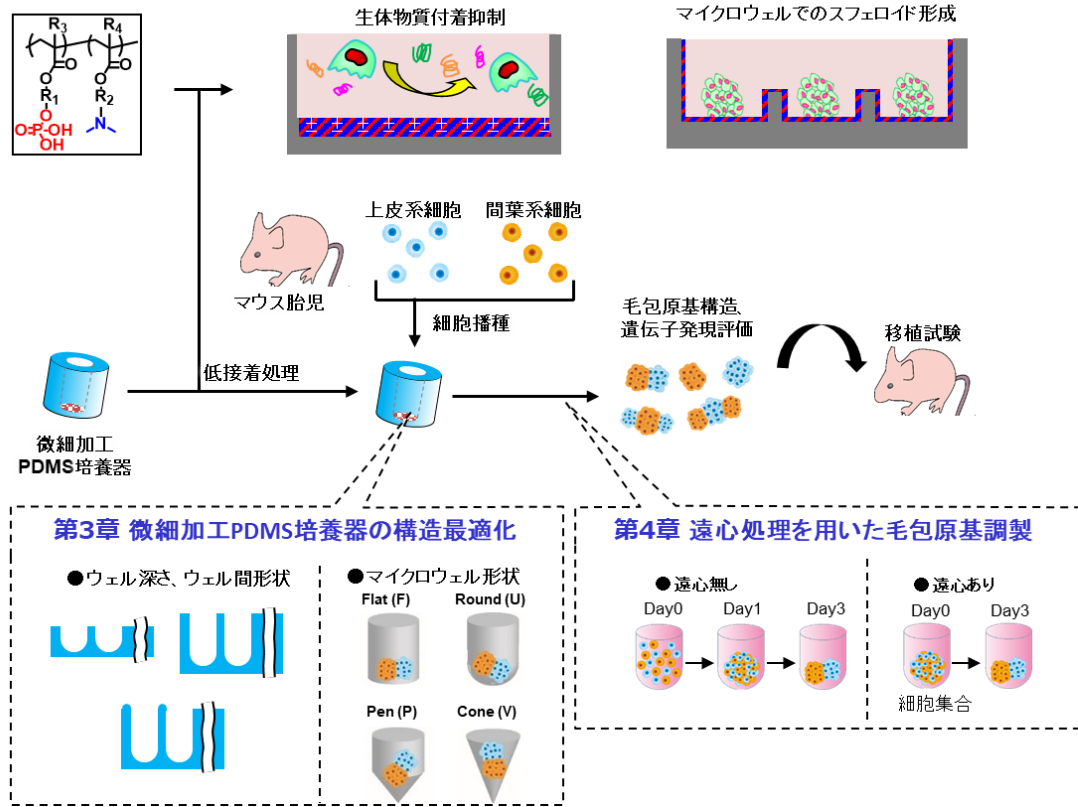


図 1-22 本論文の構成

第一章 序論

本章では、再生医療において三次元細胞構造体が重要であることを示し、その中でもスフェロイドやオルガノイド（器官原基）などの細胞凝集塊に着目し、その製造方法に関して整理した。また脱毛症に対する最先端の治療法として期待されている毛髪再生医療のアプローチについて説明した。先行研究の中でも微細加工 PDMS 培養器を用いた毛包原基の大量調整に関する研究に着目し、その課題として再生医療に適用可能な細胞低接着材料の開発および培養器構造最適化であることを指摘した。本課題を解決するために細胞低接着材料の設計にかかわる物性や実例、コーティング方法を示し、また培養器の形状および培養プロセス検討の意義について説明した。以上を以て毛包原基形成用の微細加工培養器の最適化を目的として明示した。

第二章 両性イオンポリマーを用いた細胞低接着処理

本章では、本研究の基盤技術の 1 つとなる細胞低接着コーティング材料について詳しく述べた。本研究では市販品の poly(HEMA)や MPC ポリマーとの比較検討の結果、両性イオン

ポリマーprevelexを用いることで、高い細胞接着抑制効果が示された。特に微細加工基材に対してもコンフォーマルに極薄膜で塗布が出来、基材本来の特性を保持できる点が優れていた。更に滅菌耐性や保存安定性、安全性の観点からも再生医療分野での使用が可能であることが示された。

第三章 微細加工技術を用いた培養器の構造最適化

本章では、毛包原基培養用の酸素透過性 PDMS 微細加工培養器の構造について詳しく述べた。マイクロウェルの深さや形状、ウェル間の形状など様々なパラメータを変化させ、細胞凝集塊の形成率等を指標として最適化を行った。その結果マイクロウェルの深さやウェル間形状を決定した。また細胞の集合を促進する Pen 型のマイクロウェル構造とすることで、毛包原基形成率が高くなることを見出した。更に毛包原基形成率と相関して発毛効率の指標となる Versican の発現向上が認められた。更に毛包原基の免疫不全マウスへの移植試験を行い、発毛が確認された。

第四章 遠心処理プロセスを用いた毛包原基の調製

本章では、培養プロセスの 1 つとして細胞の集合を促進する方法として遠心処理法を検討した。そこで遠心処理により細胞の初期集合を促進した場合の毛包原基形成率や遺伝子発現を評価した。その結果、遠心処理をすることで毛包原基の形成率が増加することが見出された。また毛包原基形成率の増加に伴い Versican の発現量も増加する傾向が示された一方で、マイクロウェル構造により毛包原基への培地の供給が不十分となると毛包原基の成熟が妨げられ遺伝子発現量が低下することが示された。

第五章 結論

本章では、本論文を総括し、今後の展望について述べた。

参考文献

- [1] 株式会社ヘリオス HP <https://www.healios.co.jp>
- [2] 2020 年度 第 1 回ライフサイエンス・ビジネスセミナー『医療機器・再生医療等製品における承認審査の現状と規制動向』厚生労働省 医薬・生活衛生局 渡利彰浩
- [3] 株式会社 Heartseed HP <https://heartseed.jp/technology.html>
- [4] Miyamoto, Y.; Ikeuchi, M.; Kawano, N. Trends from 2D culture to 3D culture -Historical transition of cell culture technology. *Organ Biology*, 2020, 27, 37-52.
- [5] 尾上 弘晃, 竹内 昌治. ボトムアップ組織工学 (特集 マイクロバイオ技術の潮流と展望: 動物細胞の培養・計測・評価技術への応用), *生物工学会誌* 2014, 92(4), 161-165.
- [6] Takahashi, H.; Shimizu, T.; Nakayama, M.; Yamato, M.; Okano, T. The use of anisotropic cell sheets to control orientation during the self-organization of 3D muscle tissue. *Biomaterials*, 2013, 34, 7372-7380.
- [7] 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 HP
<https://www.twmu.ac.jp/ABMES/research-content/cell-sheet-engineering/>
- [8] 岡本康司. 臨床がんのスフェロイド培養法. 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド: 編集 佐々木博己. 羊土社 (実験医学別冊), 2019, 52-55.
- [9] Takezawa T, Yamazaki M, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K. Morphological and immunocytochemical characterization of a hetero-spheroid composed of fibroblasts and hepatocytes. *Journal of Cell Science*, 1991, 101, 495-501.
- [10] Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. *Nature Medicine*, 1998, 4, 901-907.
- [11] Willyard C. The boom in mini stomachs, brains, breasts, kidneys and more. *Nature*. 2013, 523, 520-522.
- [12] 日本触媒 HP <https://www.shokubai.co.jp/ja/news/news0521.html>
- [13] 慶應大学プレスリリース <https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2020/2/6/28-67426/>
- [14] Itoh, M.; Mukae, Y.; Kitsuka, T.; Arai, K.; Nakamura, A.; Uchihashi, K.; Toda, S.; Matsubayashi, K.; Oyama, J.; Node, K.; Kami, D.; Gojo, S.; Morita, S.; Nishida, T.; Nakayama, K.; Kobayashi, E. Development of an immunodeficient pig model allowing long-term accommodation of artificial human vascular tubes. *Nature communications*, 2019, 10, 1-8.
- [15] Velasco, V., Shariati, S.A. & Esfandyarpour, R. Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsystems & Nanoengineering* 2020, 6, 76-88.
- [16] Liu, D., Chen, S. & Win Naing, M. A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development. *Biotechnology & Bioengineering* 2021, 118, 542-554.

- [17] Prestigiacomio, V.; Weston, A.; Dick, L.S. Rat multicellular 3D liver microtissues to explore TGF- β 1 induced effects, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2020, 101, 106650.
- [18] Kumar, A.; Starly, B. Large scale industrialized cell expansion: producing the critical raw material for biofabrication processes. *Biofabrication*, 2015, 7, 44103.
- [19] Wang, Y., Kim, M. H., Tabaei, S. R., Park, J. H., Na, K., Chung, S., Zhdanov, V. P., Cho, N. J. Spheroid formation of hepatocarcinoma cells in microwells: Experiments and Monte Carlo simulations. *PLOS One*, 2016, 11, e0161915.
- [20] S.E. Millar, Molecular mechanisms regulating hair follicle development., *Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118, 216–225.
- [21] 景山達斗, 毛髪再生医療を目指した毛包原基の大量調製に関する研究. (2017).
- [22] Stenn, K.S.; Paus, R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological Reviews*, 2001, 81, 449-494.
- [23] Relevant Research, Inc., International Society of Hair Restoration Surgery: 2015 Practice Census Results
- [24] Ehama, R.; Ishimatsu-Tsuji, Y.; Iriyama, S.; Ideta, R.; Soma, T.; Yano, K.; Kawasaki, C.; Suzuki, S.; Shirakata, Y.; Hashimoto, K. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. *Journal of Investigative Dermatology* 2007, 127 (9), 2106-2115.
- [25] Ohyama, M.; Veraitch, O. Strategies to enhance epithelial–mesenchymal interactions for human hair follicle bioengineering. *Journal of Dermatological Science* 2013, 70 (2), 78-87.
- [26] Toyoshima, K.-e.; Asakawa, K.; Ishibashi, N.; Toki, H.; Ogawa, M.; Hasegawa, T.; Irié, T.; Tachikawa, T.; Sato, A.; Takeda, A. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nature communications* 2012, 3 (1), 1-12.
- [27] Kageyama, T.; Yoshimura, C.; Myasnikova, D.; Kataoka, K.; Nittami, T.; Maruo, S.; Fukuda, J. Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine. *Biomaterials* 2018, 154, 291-300.
- [28] Spriano, S.; Chandra, V. S.; Cochis, A.; Uberti, F.; Rimondini, L.; Bertone, E.; Vitale, A.; Scolaro, C.; Ferrari, M.; Cirisano, F. How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? *Materials Science and Engineering: C* 2017, 74, 542-555.
- [29] Kakegawa, T., Mochizuki, N., Sadr, N., Suzuki, H. & Fukuda, J. Cell-adhesive and cell-repulsive zwitterionic oligopeptides for micropatterning and rapid electrochemical detachment of cells. *Tissue Engineering Part A* 2013, **19**, 290-298
- [30] Lowe, S., O'Brien-Simpson, N. M. & Connal, L. A. Antibiofouling polymer interfaces: poly(ethylene glycol) and other promising candidates. *Polymer Chemistry* 2015, 6, 198-212.

- [31] Tugulu, S., Silacci, P., Stergiopoulos, N. & Klok, H. A. RGD - Functionalized polymer brushes as substrates for the integrin specific adhesion of human umbilical vein endothelial cells. *Biomaterials* 2007, 28, 2536-2546.
- [32] Rodriguez - Emmenegger, C., Houska, M., Alles, A. B. & Brynda, E. Surfaces resistant to fouling from biological fluids: towards bioactive surfaces for real applications *Macromolecular Bioscience* 2012, 12, 1413-1422.
- [33] Li, M., Zhuang, B. & Yu, J. Functional zwitterionic polymers on surface: structures and applications. *Chemistry: An Asian Journal* 2020, 15, 2060-2075.
- [34] Leng, C., Gibney, K. A., Liu, Y., Tew, G. N. & Chen, Z. In situ probing the surface restructuring of antibiofouling amphiphilic polybetaines in water. *ACS Macro Letters* 2013, 2, 1011-1015.
- [35] Fujiwara, N. et al. 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-polymer suppresses an increase of oral bacteria: a single-blind, crossover clinical trial. *Clinical Oral Investigations* 2019, 23, 739-746.
- [36] Magin, C. M., Cooper, S. P. & Brennan, A. B. Non-toxic antifouling strategies. *Materials Today* 2010, 13, 36-44.
- [37] Khlyustova, A., Cheng, Y. F. & Yang, R. Vapor-deposited functional polymer thin films in biological applications. *Journal of Materials Chemistry B* 2020, 8, 6588-6609.
- [38] Hong, D. et al. Achieving ultralow fouling under ambient conditions via surface-initiated ARGET ATRP of carboxybetaine. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017, 9, 9255-9259.
- [39] Rhodes, C. P., Long, J. W., Doescher, M. S., Fontanella, J. J. & Rolison, D. R. Nanoscale polymer electrolytes: ultrathin electrodeposited poly (phenylene oxide) with solid-state ionic conductivity. *The Journal of Physical Chemistry B* 2004, 108, 13079-13087.
- [40] Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews* 2005, 105, 1103-1169.
- Tu, T. Y., Wang, Z., Bai, J., Sun, W., Peng, W. K., Huang, R. Y., Thiery, J. P., and Kamm, R. D. Rapid prototyping of concave microwells for the formation of 3D multicellular cancer aggregates for drug screening. *Advanced Healthcare Materials* 2014, 3, 609–616.

第二章

両性イオンポリマーを用いた細胞低接着処理

2.1. はじめに

毛包再生の実現には、均一な毛包原基を簡便に調製する技術開発が不可欠である。そのため微細加工されたマイクロウェル培養器が報告されている。本培養器は、表面処理による細胞低接着性の付与が必須である。本章では、再生医療での実用化という観点を踏まえて細胞低接着材料による培養器の表面処理について、詳しく述べる。コストや性能の観点から両性イオンポリマーである **prevelex** を設計・合成し、そのコーティング特性や細胞低接着能などの基礎評価を行った。更に微細加工培養器を用いてコーティング特性やスフェロイド形成能を評価した。この際市販されている細胞低接着コーティング材料であるノニオン性ポリマーの **poly(HEMA)** [1]および両性イオン性ポリマー**MPC** ポリマー[2]を使用して比較した。また再生医療の観点から滅菌耐性、保存安定性の評価を行い、再生医療へ展開可能な性能を持つことを確認した。

2.2. 細胞低接着材料の設計、合成および解析

2.2.1 本項の目的

本項の目的は、細胞低接着ポリマーの設計、合成、およびその解析を行うことである。リン酸とアミンユニットを有する両性イオンポリマーを設計、合成を行い（図 2-1）、ポリマーの基礎物性解析を行った。



図 2-1 本章の検討内容

2.2.2. 実験装置及び試薬

【装置】

・ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC），
Prominence : Shimadzu

・赤外分光光度計(FT-IR), NICOLET iS5 with
ATR iD5 : Thermo Fisher Scientific

・ロータリーエバポレーター：EYELA

・TG-DTA 装置, RG8120：リガク

【試薬】

・prevelex® CC1：日産化学

・ポリエチレンオキシド：Agilent

2.2.3. 実験手順

prevelex の設計、合成

本研究では、タンパク質や細胞に対する耐性に優れている MPC ポリマー骨格を模倣したイオンコンプレックスポリマーを合成した。MPC ポリマーはリン酸とアミンの両性イオンを1つのモノマーユニット内に有するポリマーである。この両性イオンが高親水性と電気的中性を発現し細胞低接着性を付与できる。しかしなが

ら MPC ポリマーの課題の1つとして高コストであることが挙げられる。これを解決するため、カチオン性アミンとアニオン性リン酸ユニットを2つのモノマーユニットに分離した、イオンコンプレックスポリマーprevelexを設計した(図2-2)。prevelexは既報に従い熱ラジカル重合法を用いて合成した[3]。

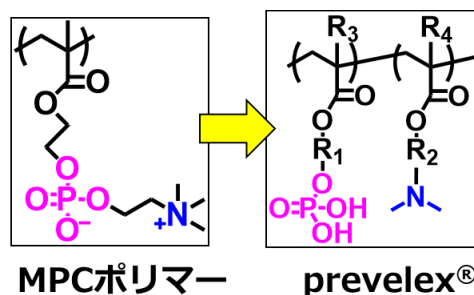


図 2-2 prevelex の設計

prevelex ポリマーの解析

・分子量測定 (GPC 測定)

得られたポリマーの分子量および分子量分布の測定のため、ゲル浸透クロマトグラフィ装置を用いて GPC 測定を行った。溶離液としてイオン性液体を用いた。標準試料としてポリエチレンオキシド、カラムは TSKgel GMPWXL を用い、サンプル濃度は 1.0 mg/mL とした。流速は 1.0 mL/min とした。

・官能基分析 (FT-IR 測定)

得られたポリマー、およびリン酸モノマー、アミンモノマーの官能基同定のため、フーリエ変換型赤外分光光度計を用いて FT-IR 測定を行った。固体試料では KBr 法、液体試料では液膜法を用いた。測定範囲 4000-400 cm^{-1} 、分解能 4 cm^{-1} 、積算回数 128 回の条件で測定を行った。

・熱重量および示差熱分析(TG-DTA)

得られたポリマーの熱安定性の評価のため、TG-DTA 測定を行った。ロータリーエバポレーターを用いて 40 °C で 3 時間蒸発させて溶媒を完全に除去した。アルミニウムパンにポリマー固体を 4.5 mg 秤量した。TG-DTA 装置を用いて、窒素環境下で TG-DTA を実施した。測定温度範囲は 30 °C から 500 °C とし、+10 °C / 分の速度で上昇させた。リファレンスとしてアルミナを用いた。

2.2.4. 実験結果と考察

分子量測定結果

合成したポリマーの GPC 測定による分子量測定結果を図 2-3 に示す。本チャートから、重量平均分子量 $M_w=3.2 \times 10^5$ 、多分散度 $M_w/M_n = 1.78$ であることが示された。

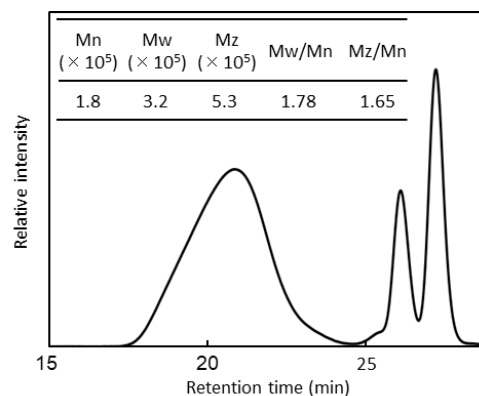


図 2-3 prevelex の GPC 測定結果

官能基分析結果

また FT-IR 測定による官能基分析結果を図 2-4 に示す。アミンモノマーではジメチルアミノ基由来の伸縮振動ピーク (1160 cm^{-1})、およびメタクリル骨格由来の -C=O 伸縮振動 (1750 cm^{-1}) が観察された。リン酸モノマーではリン酸基由来の $\text{-(RO)}_3\text{PO}$ 伸縮振動 ($1000, 1160 \text{ cm}^{-1}$)、 -C=O 伸縮振動、 -O-H 伸縮振動 ($3000\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$) が観察された。また prevelex ではアミンモノマーと同様にジメチルアミノ基由来の伸縮振動ピーク、リン酸モノマーで観察されていた -O-H 伸縮振動のピーク、およびメタクリル骨格由来の -C=O 伸縮振動が観察された。また新たに -PO_4^- 伸縮振動 (960 cm^{-1}) のピークが観察された。一方でリン酸モノマーで観察されたリン酸基由来の $\text{-(RO)}_3\text{PO}$ 伸縮振動 ($1000, 1160 \text{ cm}^{-1}$) のピークは消失していた。これは prevelex がリン酸、アミンの双方の官能基を持ち、また共重合したためにイオン結合によりリン酸基由来のピークが -PO_4^- に変化したためと考えられる。以上 GPC および FT-IT の結果より、合成したポリマーはリン酸ユニットとアミンユニットを持つ共重合体であることが示された。

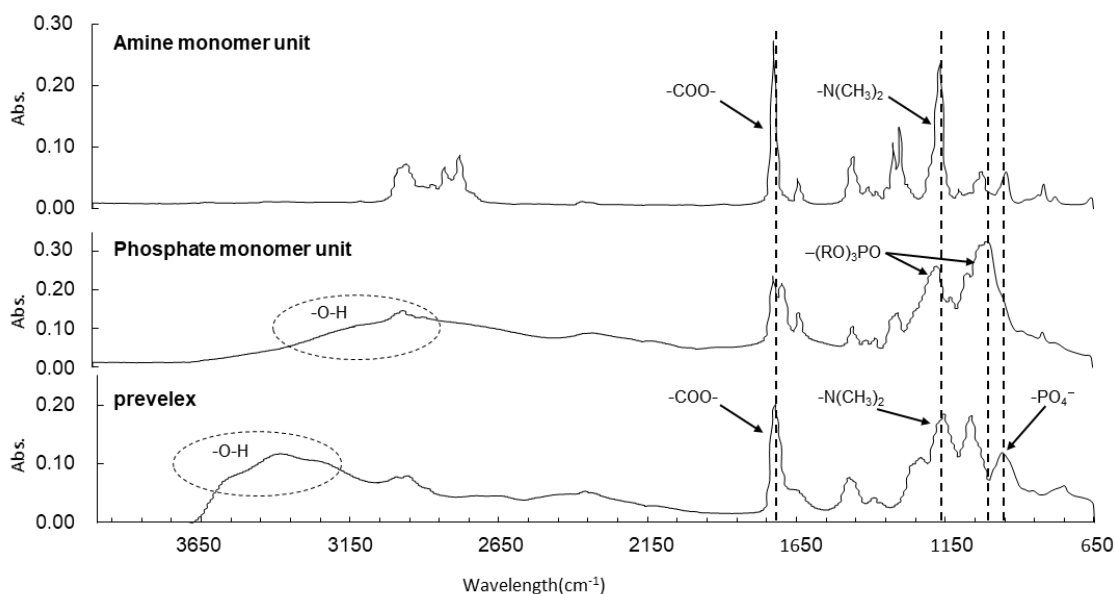


図 2-4 prevelex を構成するリン酸、アミンモノマーおよび prevelex の FT-IR 測定結果

TG-DTA 測定結果

TG-DTA 測定結果を図 2-5 に示す。prevelex の熱化学的な分解挙動を検討した。TG スペクトルから prevelex の重量は 150 °C 付近から減少を開始しており、5 % 重量減温度は 233 °C だった。また 150 ~ 190 °C の範囲に DTA の吸熱ピークが観察された。上記結果から、150 °C を超えると prevelex が分解したことが示された。

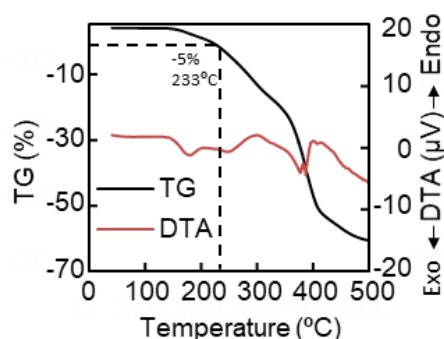


図 2-5 prevelex の TG-DTA 測定結果

2.2.4. 本項のまとめ

本項では、両性イオンポリマーである prevelex を設計・合成した。物性評価の結果、目的構造のリン酸及びアミンユニットを共重合したポリマーが合成されたことが示された。また熱分析の結果 150 °C 以下の温度域であればポリマーが安定に存在することが示された。

2.3. コーティング表面の物性評価

2.3.1. 本項の目的

本項では、前節で作製したポリマーのコーティングによる基板の表面改質を行い、表面物性解析として、細胞低接着性の指標となる濡れ性、ゼータ電位の評価を行うことを目的とした。

2.3.2. 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ X線光電子分光装置, PHI Quantera SXM : ULVAC-PHI
- ・ ソフトプラズマエッチング装置, SEDE-GE, メイワフォーシス
- ・ スピンコーター, Opticoat MS-B100 : MIKASA
- ・ ゼータサイザーナノ : Malvern
- ・ 全自動接触角系, DMC-MC3 : 協和界面化学

【細胞・試薬】

- ・ prevelex[®] CC1 : 日産化学
- ・ ガラス基板, D263Teco : アズワン
- ・ SYLGARD[™] 184 Silicone Elastomer Kit : ダウ・東レ
- ・ 表面ゼータ電位セル, ZEN1020, : Malvern
- ・ ポリスチレン製シャーレ, Asnol Petri Dish : アズワン
- ・ Polymer latex, micromer 1 μm : micromod

2.3.3. 実験手順

基材の準備

- ・ シリコンウエハ : 4 インチのシリコンウエハをカットして使用した。
- ・ PDMS シート : SYLGARD のプレポリマー溶液と硬化剤を 10 : 1 の割合で混合し、金型に入れた。100 °C で 1 時間焼成して PDMS シートを作製した。
- ・ PS 基板 : ポリスチレン製シャーレをカットして使用した。
- ・ ガラス基板 : 購入した基板をそのまま使用した。

コーティング (シリコンウエハ、ポリスチレン基板)

prevelex のポリマーを水/エタノールに溶解させてコーティング溶液を作製した。シリコンウエハに関しては、コーティング溶液を滴下しスピンコーターを用いて 1500 rpm/60sec の条件でコーティングした。ポリスチレン基板、PDMS シート、ガラス基板に関しては、プ

ラズマエッチング装置で 5 mA, /3 min 処理後、prevelex コーティング溶液に 10 秒浸漬した。余分な液を除去し、各基材を 50 °C/24 時間焼成し溶剤を揮発させた。その後、純水で 10 秒間の洗浄を 3 回行い、固着していないポリマーを除去した。

XPS 解析

シリコンウエハに形成されたコーティング膜の XPS 測定を行った。線源は Al(K α 線) (1486.6 eV) を用いた。チャンバー内圧力は $\sim 10^{-9}$ Torr とした。光電子の検出角は 15 °, 30 °, 45 °, 80 °とした。窒素(N $_{1s}$)、リン(P $_{2p}$)、ケイ素(Si $_{2p}$)について測定を行った。

接触角測定

ポリマーをコーティングした PS、PDMS、ガラス基板の表面自由エネルギー(濡れ性)を評価するために、液滴法による大気中の水の静的接触角測定およびキャプティブバブル法による PBS 中における気泡の静的接触角測定を行った。大気中の水の接触角測定では、乾燥状態における表面自由エネルギーを、PBS 中における気泡の接触角測定では、湿潤状態における表面自由エネルギーをそれぞれ評価することができる。大気中での水接触角の測定は、2.0 μ L の純水を滴下し、1 秒以内に測定した。PBS 中の気泡の接触角は特注ホルダーに試料板を取り付けて U 字型針から 2.0 μ L の気泡を導入し、測定した。いずれの測定も各サンプルにおいて 3 点以上測定を行い、その平均値をそのサンプルの接触角とした。また、1 種類の基板につき 3 サンプル以上の測定を行った。

ゼータ電位測定

ポリスチレンシャーレのコーティング膜のゼータ電位をゼータサイザーで測定した。コーティング基板を 1 mm \times 1 mm の切片に切断した。このプレートをゼータ電位測定用ユニットのステージに取り付け、測定セル (10 \times 10 \times 45 mm) にセットした。ゼータ電位移動標準としてポリマーラテックスを使用し、100 倍希釈した PBS 中で測定した。コントロールとしてポリマー未修飾のポリスチレンシャーレを使用した。1 種類の基板につき 4 サンプル以上の測定を行った。

2.3.4. 実験結果と考察

XPS 測定

prevelex をコートしたシリコン基板の XPS 測定結果を図 2-6 に示す。P_{2p} 領域ではリン酸基由来のピークが観察された。また N_{1s} 領域では 400 eV 付近のジメチルアミノ基由来のピークおよび 402 eV 付近の-NH₄⁺のピークが観察された。これよりジメチルアミノ基とリン酸基がイオン性錯体を形成していることが示された。また N_{1s} に関して入射角を変えて測定深さを変えた場合でも同様に 2 種類のピークが観察されたことから、膜表面から内部までイオン架橋していることが示された。

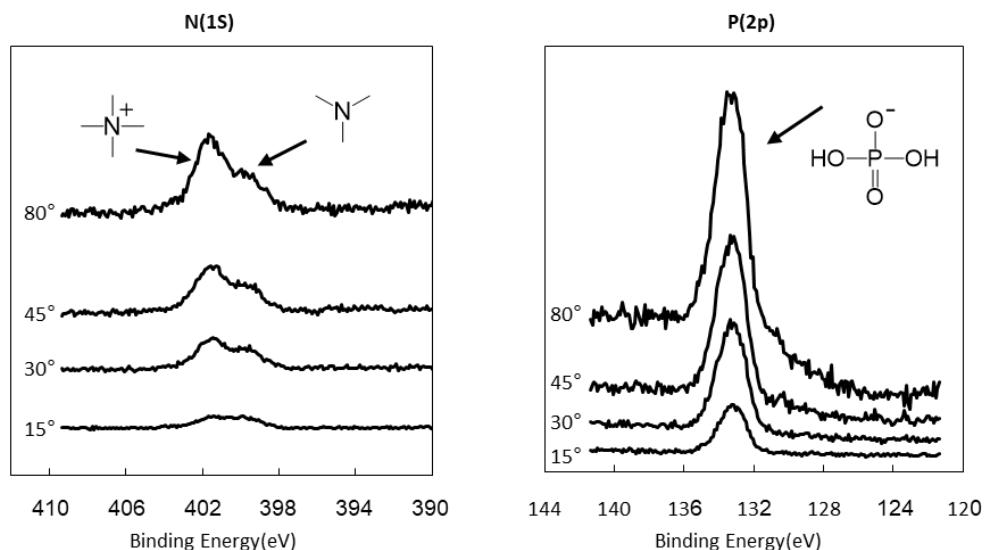


図 2-6 prevelex コーティング基材の XPS 測定結果

prevelex コーティング基材の表面特性評価

生体物質との相互作用は、基材の表面濡れ性やゼータ電位と密接に関係している[4]。一般に高親水性で表面ゼータ電位が中性に近い条件で生体物質の付着を防止できる。本項では prevelex を種々基材にコーティングし、静的接触角と表面ゼータ電位を測定した。図 2-7 に示すように、気泡接触角は、non coat の基材の元の値にかかわらず、prevelex コーティングによって約 20° に著しく減少した。一方で水の接触角の変化はコーティングの前後で一貫していなかった。これは、大気中で膜内部に存在していた親水性のリン酸およびアミノユニットからなる prevelex ポリマー側鎖が、水溶液の環境下で基材表面へと配向したためと考えられる。一般に細胞培養の分野では基材は水溶液環境下で使用されるため、水溶液中での気泡接触角が付着防止能の重要な指標となる。今回 prevelex コート表面は高い親水性を示すことが示された。

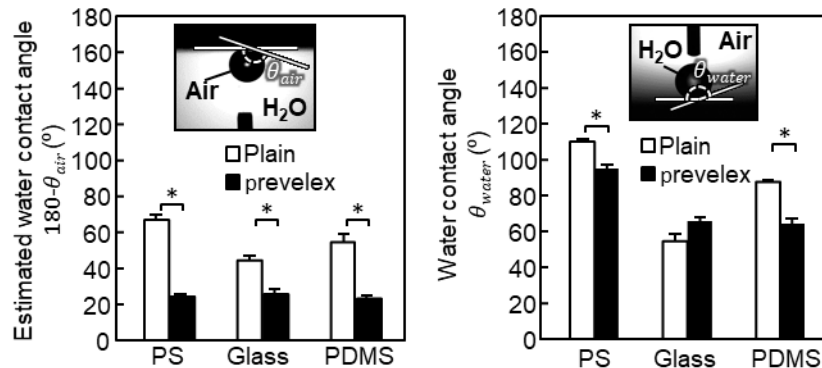


図 2-7 prevelex をコーティングした種々基材の接触角測定

続いてコーティング前後のポリスチレン基板のゼータ電位を図 2-8 に示す。コーティング前の PS 表面は負に帯電していた。一方コーティング後は電気的に中性な表面となった。以上の結果より、prevelex コートにより液体/基材界面における疎水相互作用、静電相互作用が抑制され、生体分子や細胞の非特異的吸着を防止するために有用であることが示された。

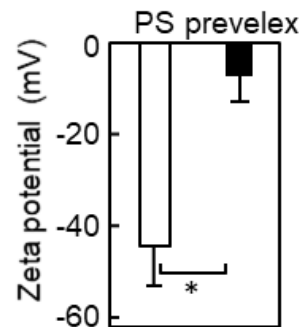


図 2-8 prevelex をコーティングした PS 基材のゼータ電位測定結果

2.3.5 本項のまとめ

本項では前項で合成した prevelex をコーティングして表面物性を評価した。XPS 測定から prevelex のポリマーが基材表面に固着していることが示された。また接触角測定およびゼータ電位測定の結果、prevelex コート表面は高い親水性と電気的中性であることが示された。その結果細胞低接着性の表面となることが示唆された。

2.4. prevelex コーティング表面の生体物質付着抑制能の評価

2.4.1. 本項の目的

本項では、prevelex でコーティングした基板の生体物質付着抑制能の評価を目的とした。QCM-D や IgG-HRP 法を用いたタンパク質吸着量および ATP アッセイを用いた細胞接着量評価を行った。更に膜厚測定も行い、細胞接着抑制能と膜厚の関係を明らかにした。またガンマ線照射前後で評価を行うことで、再生医療に耐えうる滅菌耐性を有するか評価した。

2.4.2. 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ スピンコーター, Opticoat MS-B100 : MIKASA
- ・ ソフトプラズマエッチング装置, SEDE-GE, メイワフォーシス
- ・ 分光エリプソメトリー, M-2000 : J. A. Woolam
- ・ 培養顕微鏡, CKX52 : OLYMPUS

【細胞・試薬】

- ・ prevelex® CC1 : 日産化学
- ・ Highly polished silicon wafers : グローバルウエーハズ
- ・ SYLGARD™184 Silicone Elastomer Kit : ダウ・東レ
- ・ ポリスチレン製シャーレ, Asnol Petri Dish : アズワン
- ・ ガラス基板, D263Teco : アズワン
- ・ QCM-金センサー, Biolin Scientific
- ・ リン酸緩衝生理食塩水(PBS) : Sigma-Aldrich
- ・ ポリスチレン, 331651-25G : Sigma-Aldrich
- ・ トルエン : 純正化学
- ・ ウシ胎児血清 : Sigma-Aldrich
- ・ Horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin : Proteintech

- ・ 水晶振動子マイクロバランス(QCM), QSense : Biolin Scientific
- ・ プレートリーダー, Infinite 200 PRO : TECAN
- ・ CO2 インキュベーター : Panasonic
- ・ 遠心分離器, LC-230 : トミー精工
- ・ 位相差顕微鏡, Eclipse TS100 : Nikon

- ・ tetramethylbenzidine peroxidase substrate solution, SureBlue : SeraCare Life Sciences
- ・ stop solution (SureBlue, SeraCare Life Sciences
- ・ 96 ウェルプレート, Falcon #351172 : Corning
- ・ 白色 96 ウェルプレート, Corning#3912 : Corning
- ・ 24 ウェルプレート, SUMILON # MS-80240 : 住友ベークライト
- ・ p(HEMA) ,P3932-25G : Sigma-Aldrich
- ・ C3H10T1/2 マウス線維芽細胞 : DS ファーマプロモ
- ・ 1%ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン : Thermo Fisher Scientific
- ・ トリプシン-EDTA溶液 : PromoCell

2.4.3. 実験手順

ガンマ線照射前後のタンパク質吸着量測定 (IgG-HRP 法)

- ・ 基材の準備

96 ウェルプレートの各ウェルにコーティング溶液を 200 μL ずつ添加した。1 時間静置後溶液を吸引し、50 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間焼成して溶媒を揮発させた。純水 250 μL を添加して 3 回洗浄した。滅菌処理として γ 線 25 kGy を照射した。

- ・ ELISA 法でのタンパク質吸着量の定量

酵素結合免疫吸着検査法(ELISA 法)を用いて、prevelex 層へのガンマ線照射の影響を評価した。100 μL PBS 中のホースラディッシュペルオキシダーゼ標識免疫グロブリンを各ウェルに加え、30 分間インキュベートした。酵素溶液を吸引し、PBS で 3 回洗浄後、100 μL のテトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ基質溶液を添加した。60 秒後に停止液 100 μL を加えて反応を停止させた。プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定し、タンパク質の吸着量を定量した。

焼成温度を変化させた際のタンパク質吸着測定 (QCM 法)

エネルギー散逸型水晶振動子マイクロバランス法(QCM-D)を用いて、ポリマーコーティング基板表面のタンパク質吸着量を定量した。また焼成時の温度を変化させることで、コーティング膜の熱安定性を評価した。

- ・ 基材の準備

基板として QCM-金 センサーを使用した。プラズマエッチング (5 mA, 3 分) を行い洗浄した基板を、アミン SAM 溶液に 1 時間浸漬した後、純水で洗浄した。ポリスチレンをトルエンに溶解させて調整した 1%溶液で 3500 rpm/30 秒間プレコーティングした。prevelex 溶液をスピコーターを用いて 3500 rpm/30 秒間の条件でコーティングした。その後、50 $^{\circ}\text{C}$ から 225 $^{\circ}\text{C}$ の温度範囲で 1 時間焼成した。PBS で 5 分間超音波洗浄し、基板を作製した。

- ・ QCM-D によるタンパク質吸着量の定量

タンパク質溶液として 10%牛血清を添加したイーグル基礎培地(BME)を使用した。流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、23 $^{\circ}\text{C}$ の条件でセンサー基板上に PBS を 10 分間流して安定化後、タンパク質溶液を 30 分間流してタンパク質を吸着させた。再度 PBS を 20 分間流してリンスした。10 分後と 60 分後の共振周波数変化 Δf から、式(1)を用いて単位面積当たりのタンパク質吸着量 Δm を算出した。データは 3 つの独立した実験から収集された。

$$\Delta m = -C \cdot \Delta f / n \dots \text{式 (1) (係数 } C = 17.7 \text{ ng/Hz} \cdot \text{cm}^2 \text{、倍音 } n = 9)$$

コーティング膜の膜厚測定

シリコンウエハを ACT-8 を用いて hexamethyldisilazane (HMDS) で 90 °C/30 秒処理し、疎水性表面へと改質した。p(HEMA) を水/エタノール=5/95 (w/w%)溶液に溶解させ、0.1 %、0.5 %、3.6 %溶液を調製した。この p(HEMA)溶液と prevelex 溶液を HMDS 処理シリコンウエハに 1500 rpm/60 秒間スピコートした。分光エリプソメトリーを用いて乾燥膜厚を測定した。解析は Cauchy の式(式 2)を用いて算出した。データは 3 つの独立した実験から収集された。

$$n = A+B/\lambda^2+C/\lambda^4 + \dots \text{式 (2)}$$

Poly(HEMA)および prevelex コーティング表面の細胞接着量の定量

・コーティングプレートの作製

上記で使用した prevelex と poly(HEMA)溶液をコーティングした表面の細胞接着量を比較した。各コーティング溶液を non treatment の 24 ウェルプレートに 200 μ L 分注した。1 時間後、コーティング溶液を吸引し、50 °C で 24 時間焼成した後純水 300 μ L で 3 回洗浄した。

・細胞の調製

細胞はマウス線維芽細胞 10T1/2、培地は 10 %FBS および 1 %PSG を添加した BME を用いた。細胞は、5 %CO₂/37 °C インキュベーター内で、直径 10 cm のシャーレ (培地 10mL) を用いて 3 日間培養した。引き続き、本細胞を PBS3 mL で洗浄した後、トリプシン-EDTA 溶液 3 mL を添加して室温で 3 分間静置し細胞を剥離した。上記培地を 7 mL 添加して細胞を回収した。本懸濁液を遠心分離機で 200 g /3 分間遠心後、上清を除いた。上記の培地を添加して 10T1/2 の細胞懸濁液を調製した。

・細胞培養試験

ポリマーコートした 24 ウェルプレートに 8×10^4 cells / well / 500 μ L で播種した。4 日間培養後、培地を吸引した。各ウェルを 500 μ L の培地で 3 回リンスし、非接着細胞を除去した。培地を添加し位相差顕微鏡を用いて付着細胞を観察した。

・ATP-assay

付着細胞数を定量するために、製造元のプロトコールに基づきアデノシン三リン酸 (ATP) アッセイを行った。ATP アッセイでは接着した生細胞を溶解させて放出される

ATP 量を定量することで細胞数が定量できる。観察後のプレートの培地を吸引後、培地を 200 μ L/well 添加した。Cell Titer-Glo Reagent を 200 μ L/well 添加した。10 分間攪拌して細胞を溶解させた後、白色 96well プレートへ 100 μ L/well ずつ分注した。遠心機で 1800 rpm/3 分間処理して脱泡した。プレートリーダーを介して 450 nm の吸光度を測定した。Non coat の 24well プレートの吸光度を 100 として細胞接着割合を算出した。

2.4.4. 実験結果と考察

ガンマ線滅菌前後のタンパク質吸着量

続いて生体物質の付着抑制能の評価として ELISA 法を用いてタンパク質吸着量を評価した。なお再生医療用途への展開を考え、滅菌処理した場合の性能を評価した。

図 2-9 に示すようにコーティングした場合ガンマ線照射の有無にかかわらず、未処理のポリスチレンと比較し 20 %以下の吸着量だった。また滅菌処理として再生医療に適用可能な γ 線滅菌 25 kGy を行った場合でもタンパク質吸着量に優位差は見られなかった。以上より γ 線滅菌処理を行った場合でも、タンパク質吸着抑制能を持つことが示された。

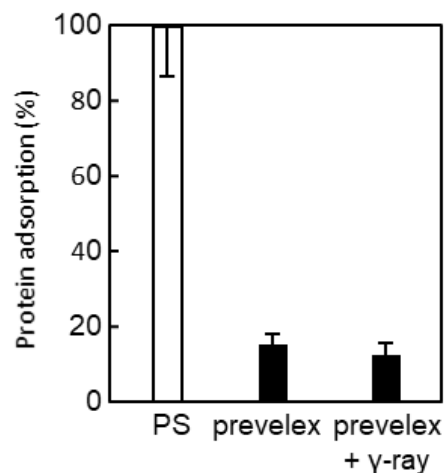


図 2-9 γ 線滅菌前後の prevelex 塗布基板への IgG 吸着量

焼成温度ごとのタンパク質吸着量測定結果

ディップコート工程では、エタノール水溶液に溶解した prevelex をキャストした後、溶媒を蒸発させるために焼成工程が必要。温度が高いほど強固な膜形成と高速処理が可能となるが、ある温度以上になると塗膜を損なうことがある。そこで、水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて、焼成温度がタンパク質吸着に及ぼす影響を評価した。QCM センサーに prevelex をコーティング後、所定温度で 1 時間焼成した。その後 QCM で培地を流した際のタンパク質吸着試験結果を図 2-10 に示す。50~150 $^{\circ}$ C で処理した表面は、未処理のポリスチレンと比較し、タンパク質の吸着量が少なかった。一方で 225 $^{\circ}$ C で焼成した場合は未処理のポリスチレンと同等以上のタンパク質が吸着した。

2.2 のポリマーの TG-DTA 分析で、150 °C以上の温度から重量減が開始し、5 %重量減温度が 230 °C付近で合った結果を踏まえると、150 °Cより高い温度で焼成した場合にはポリマー膜の分解が生じ、性能が低下したと考えられる。

以上より prevelex 層は 150 °C以下の焼成温度であればタンパク質吸着抑制能を示すが示された。これは一般的なオートクレーブによる滅菌処理 (121 °C、20 分) にも prevelex 膜が耐えうることを示唆している。更に低温の 50 °C/1 時間の条件でも膜が固着し性能が発現することから、低温焼成が必要な培養器材 (ポリスチレン等) へも適用できることが示された。

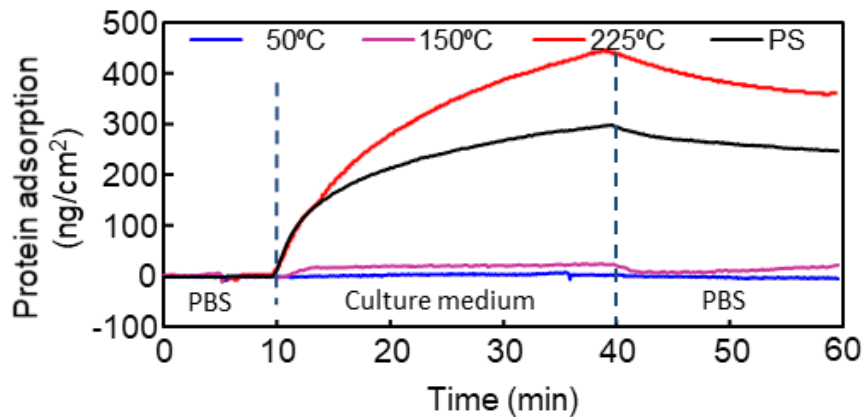


図 2-10 prevelex の焼成時間とたんぱく質吸着量測定結果

prevelex コーティング基材上の細胞接着抑制評価

prevelex および所定濃度の pHEMA をコーティングした表面の細胞接着抑制能を評価した。24well プレートで細胞を 4 日間培養した後、非接着細胞を除去した後の顕微鏡観察結果を図 2-11 に示す。未処理のポリスチレン、および pHEMA の 0.1 %、0.5 % 溶液でコーティングした表面には細胞接着・伸展が確認された。一方で pHEMA の 3.6 % 溶液および prevelex をコートした表面では、接着細胞はほとんど見られなかった。

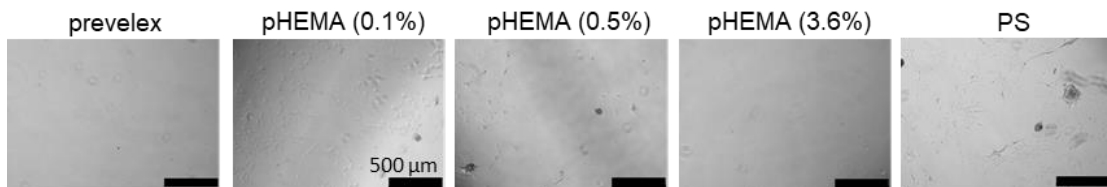


図 2-11 prevelex および pHEMA コーティング基材の細胞接着観察結果

コーティング層の膜厚を、それぞれエリプソメーターと ATP 測定によって定量化した (図 2-12) 。pHEMA の 0.1 %、0.5 % 溶液でコートした膜厚は prevelex の膜厚と同等だ

ったが、付着細胞数は **prevelex** をコーティングした場合に著しく低下した。また **pHEMA** では濃度が増加するほど細胞接着抑制効果が高くなることが示された。3.6%まで増加すると、ほぼ完全に細胞接着を防ぐことができ、**prevelex** のそれと同程度になった。しかし、3.6% **pHEMA** の膜厚は 200 nm 程度と、**prevelex** の膜厚(20 nm 以下)と比較し有意に厚いことがわかった。以上より **pHEMA** コーティング膜では、膜厚に依存して細胞接着性が変化し、膜厚が 200 nm 程度まで厚くしなければ細胞接着を十分に抑制できないことが示された。一方で **prevelex** コーティング膜では膜厚が小さくても細胞接着抑制出来ることが示された。

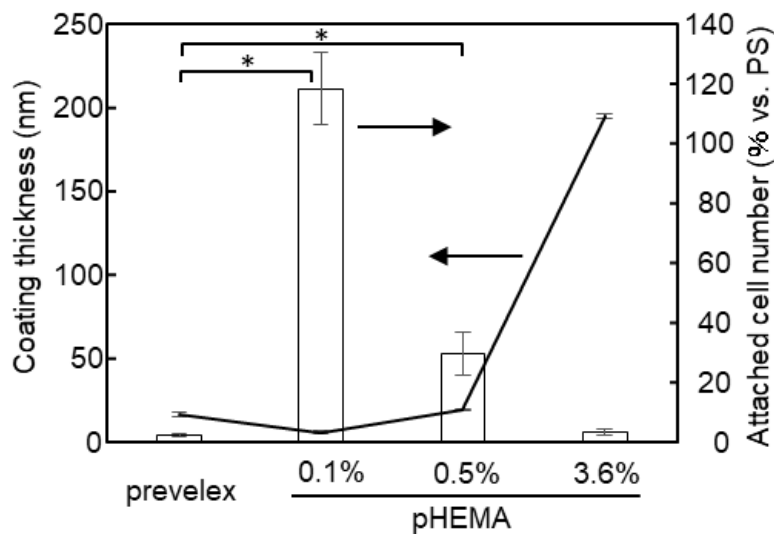


図 2-12 **prevelex** と **pHEMA** の膜厚と接着細胞量の関係

2.4.5 本項のまとめ

本項では **prevelex** コーティング表面の生体物質付着抑制能を評価した。150 °C 以下の焼成温度に置いて **prevelex** は高いタンパク質吸着抑制能を示した。また γ 線 25 kGy 照射前後で性能に有意差が見られなかったことから、再生医療にて使用される滅菌条件が適用可能であることが示された。更に市販のノニオン性ポリマーである **pHEMA** と比較した結果、**prevelex** は 10 nm 以下の極薄膜で高い細胞接着抑制能を示すことが示された。

2.5. 微細加工細胞培養器への適用

2.5.1. 本項の目的

本項では微細加工容器に対する **prevelex** のコーティングを行い、コーティング特性およびスフェロイド形成能を評価することを目的とした。コーティングした微細加工シリコンウ

エハに対する塗布性評価及び膜厚試験を行った。また種々の微細加工基材と細胞を用いてスフェロイド形成評価を行い、prevelexの汎用性について評価を行った。

2.5.2. 装置及び試薬

【装置】

- ・塗布現像装置, ACT 8 : 東京エレクトロン
- ・走査型電子顕微鏡(SEM), S-4800 : 日立ハイテク
テクノロジーズ
- ・原子間力顕微鏡(AFM), Dimention Icon : Bruker
- ・スピコーター, Opticoat MS-B100 : MIKASA
- ・ソフトプラズマエッチング装置, SEDE-GE, メ
イワフォーシス
- ・培養顕微鏡, CKX53 : OLYMPUS
- ・CO₂ インキュベーター : Panasonic
- ・遠心分離器, LC-230 : トミー精工
- ・位相差顕微鏡, Eclipse TS100 : Nikon

【試薬】

- ・シリコンウエハ : Global Wafers
- ・ヘキサメチルジシラザン(HMDS) : 富士フイルム
ム和光純薬
- ・p(HEMA), P3932-25G : Sigma-Aldrich
- ・prevelex® CC1 : 日産化学
- ・AFM チップ, RTESPA-150 : Bruker
- ・MPC
- ・微細加工 PS 製プレート, Elplasia : クラレ
- ・SYLGARD™184 Silicone Elastomer Kit : ダ
ウ・東レ
- ・C3H10T1/2 マウス線維芽細胞 : DS ファーマブ
ロモ
- ・Eagle's basal medium (BME) : 富士フイルム和
光
- ・Aggrewell 400, 800 : Stemcell Technologies
- ・間葉系幹細胞(MSC) : Promocell
- ・ヒト肝癌由来細胞 HepG2 : DS ファーマバイ
オメディカル
- ・human iPSC : Center for iPSC Cell Research
and Application
- ・脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC) : Promocell
- ・間葉系幹細胞用増殖培地 : mesenchymal stem
cell growth medium 2 : Promocell
- ・乳がん細胞株(MCF-7) : JCRB 細胞バンク
- ・リン酸緩衝生理食塩水(PBS) : Sigma-Aldrich
- ・ウシ胎児血清 : Sigma-Aldrich
- ・1%ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミ
ン : Thermo Fisher Scientific
- ・トリプシン-E D T A 溶液 : PromoCell

2.5.3. 実験手順

シリコン微細構造へのポリマーコーティング

2種類のラインパターン（幅/高さ=50 µm / 80 µm と 50 µm / 230 nm）をエッチングして、2種類のマイクロ/ナノパターンシリコン基板を作製した。この基板を ACT-8 でヘキサ

メチルジシラザン(HMDS)で改質し、表面を疎水化した。HMDS 処理したシリコン基板上に、prevelex と 3.6 %p(HEMA)の水/エタノール=5/95 の溶液で 1500 rpm/60 秒間でスピニングした。50 °C/24 時間焼成後、純水で洗浄した。白金を蒸着した後、走査型電子顕微鏡を用いて、加速電圧 1.5 kV で断面像を取得した。

AFM 測定

シリコン基板上的 prevelex の膜厚および表面ラフネスの測定のため、AFM 測定を実施した。シリコンウエハに prevelex を塗布した後、ポリマー層の一部をカミソリで取り除き、AFM で段差の厚さを測定した。測定は周波数 0.4 Hz ~0.8 Hz で行い、タッピングモードで実施した。

微細加工細胞培養デバイスでのスフェロイド形成試験

・ PDMS 製微細加工培養器の作製

直径Φ/深さ=0.5 mm / 0.5 mm の円形マイクロウェルを有する微細加工容器を設計した。PMMA-ジュラルミン基板を用いてモールドを作製した。PDMS 溶液（プレポリマー溶液と硬化剤の 10 : 1 混合液）をポジ型に流し込み、オープン中で硬化させた（1 時間、100 °C）。利用する PDMS 溶液の量を調整することで、マイクロウェル底部の厚さを 1.5 mm に設定した。

・ コーティング

MPC ポリマーを既報に従って合成した。Elplasia および作製した PDMS プレートに酸素エッチング装置で洗浄後、prevelex、3.6 % p(HEMA) の水/エタノール=5/95 溶液および 0.5 % MPC ポリマーのエタノール溶液を添加した。1 時間静置後廃液し、50 °C/24h 焼成した。純水で 3 回洗浄して未固着のポリマーを除去した。

・ スフェロイド形成確認試験

10 %FBS、1 %PSG 入りの BME に懸濁した 10T1/2 を Elplasia および PDMS 容器に播種した。播種密度は 0.2×10^4 cells/well とした。37 °C/5 %CO₂ のインキュベーターで 4 日間培養した。位相差顕微鏡を用いてスフェロイド形成の有無を確認した。

prevelex をコートした微細加工細胞培養デバイスでの種々細胞のスフェロイド形成試験

- ・ PDMS 製微細加工培養器の作製

直径 Φ /深さ $h=1\text{ mm} / 2\text{ mm}$ の円形マイクロウェルを有する PDMS 製の微細加工容器を、前項と同様の方法で設計・作製した。

- ・ コーティング

AggreWell400, 800、Elplasia および作製した PDMS プレートに酸素エッチング装置で洗浄後、prevelex を添加した。1 時間静置後廃液し、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}/24$ 時間焼成した。純水で 3 回洗浄して未固着のポリマーを除去した。

- ・ スフェロイド形成確認試験

prevelex の適用可能性を評価すべく、種々細胞と種々培養器でのスフェロイド形成試験を行った。培養プレート、細胞種、細胞播種密度の組み合わせは以下の通りである。

Aggrewell 400, 800 は MSC および 10T1/2 (60×10^4 cells/well)、Elplasia は HepG2、およびヒト iPSC (1.0×10^4 cells/well)、直径 0.5 mm の PDMS プレートは ADSCs (10×10^4 cells/well)、直径 1 mm の PDMS プレートは、HepG2 および MCF-7 (30×10^4 cells/well) で使用した。所定期間培養後、実体顕微鏡および位相差顕微鏡でスフェロイド形成を確認した。

2.5.4. 実験結果と考察

微細加工基材への prevelex のコーティング評価

微細構造へのコーティング特性を調べるため、3.6 % pHEMA と prevelex をマイクロ/ナノ加工したシリコン基板にコーティングし、断面を走査型電子顕微鏡で観察した (図 2-13(a))。pHEMA 層の厚さは、凹凸面上の位置によって大きく異なり、上面では 1 nm 以下、底面では約 $4\text{ }\mu\text{m}$ であった。prevelex は上面、下面とも 5~6 nm 程度で均一な膜厚であることが示された。また pHEMA では凹部のエッジ部分に厚い層が形成されるが、prevelex の場合はそのような部分にもコンフォーマルに極薄の層が形成されることが示された (図 2-13(b))。

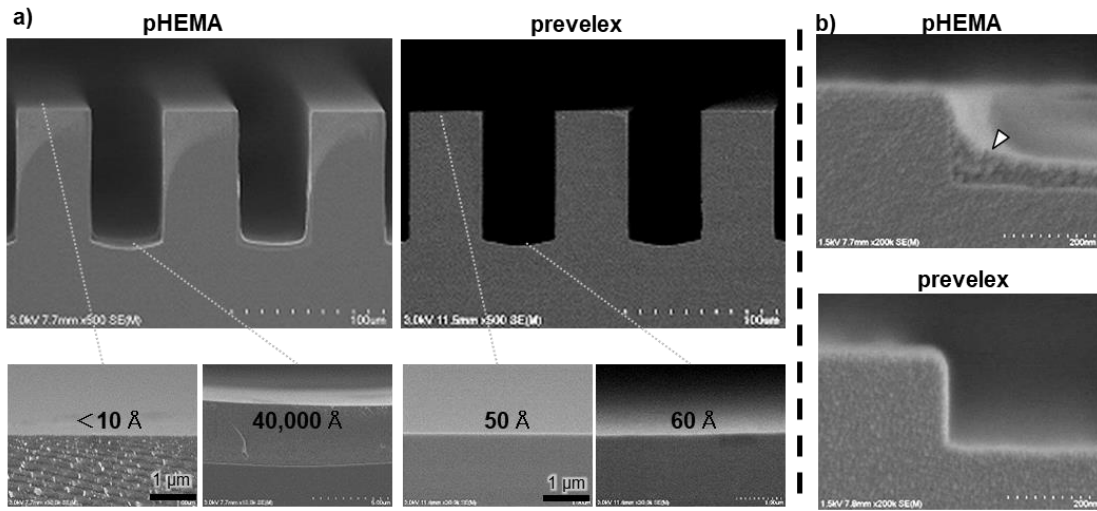


図 2-13(a) 微細加工シリコン基板上的のコーティング膜の SEM 観察

(b) 微細加工シリコン基板上的のエッジ部分のコーティング膜の SEM 観察

さらに物理的な手法として AFM を用いて、平坦なシリコン基板の上にコーティングされた prevelex の膜厚を定量化した。その結果、図 2-14(a)に示すように膜厚は 6.6 nm となり SEM 観察から測定した結果と同等の膜厚になった。さらに膜の平坦性を評価するため走査距離 10 μm での表面ラフネスを測定した結果、下図 2-14(b)に示すようにラフネスは約 0.26 nm だった。膜厚に対して十分に小さく、平坦な膜を形成していることが示された。

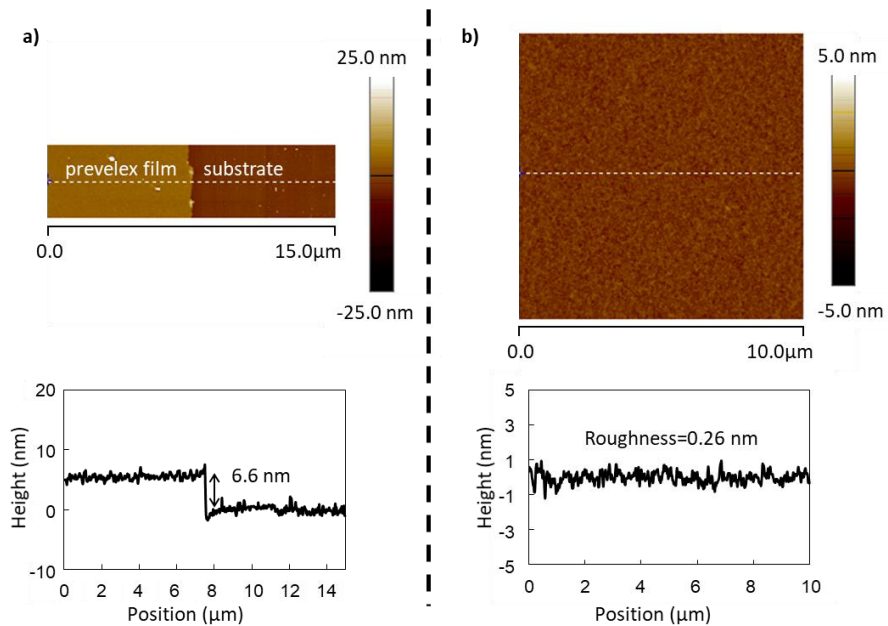


図 2-14 AFM によるシリコン基板上的の prevelex コーティング膜の観察

(a) 膜厚評価、(b)ラフネス評価

prevelex のコンフォーマルな薄膜コーティングは、ポリマー分子間およびポリマー分子と基材表面の間の静電相互作用に起因していると考えられる。prevelex は、親水性のアニオン性リン酸ユニット、カチオン性のジメチルアミノユニット、疎水性のアルキル骨格から構成されている。そのため、PS のような帯電した表面に静電的に吸着し、表面の電荷が十分に中和されるまで膜が積み重なる。これよりナノメートルオーダーの微細構造体上に超薄膜で均一な層を形成することができる。逆に、pHEMA はコーティングと乾燥の工程で、水酸基間の分子間水素結合により厚い層を形成し、洗浄工程後も膜厚が保たれる。前項で示したように、pHEMA の膜厚は細胞接着抑制能と相関がある。従って、不均一なコーティング膜は不安定な性能へつながる。

微細加工細胞培養デバイスでのスフェロイド形成確認

スフェロイドやオルガノイドなどの細胞構造体の培養は、一般的に非細胞接着性の微細加工デバイスを用いて行われてきた[5]。種々コーティングを施した平底マイクロウェルを有する PS 製培養器 Elplasia、および U 底マイクロウェルを有する PDMS 製培養器で、10T1/2 を 1 日間培養した後の観察結果を図 2-15 に示す。

コーティングなしの場合、いずれの培養器でも細胞が接着、伸展していた。また疎水性の高い PDMS 培養器では一部のマイクロウェルに気泡が残っていた（白矢印）。pHEMA を塗布した PS 培養器では、スフェロイド形成が観察された。しかし、ほとんどのマイクロウェルで細胞は表面全体に接着して広がっていた。また PDMS デバイスでは、コートしたポリマーが不均質な膜を形成しており（黒矢印）、一部スフェロイドが形成された一方で細胞接着も観察された。

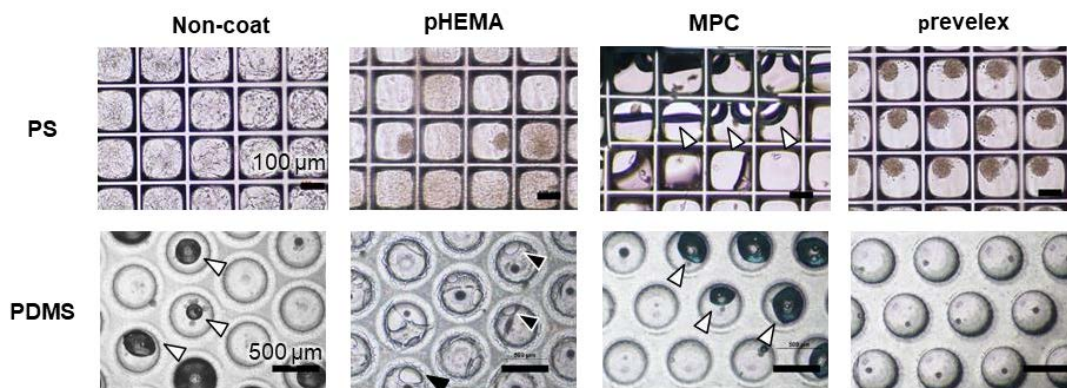


図 2-15 各材料を塗布した各マイクロウェル培養器上でのスフェロイド形成確認

前項に示した通り pHEMA では細胞接着抑制能の膜厚依存性があることから、細胞培養条件下では膜厚ムラに起因する細胞接着ムラが生じたと考えられる。MPC ポリマーでコーティングした場合、PS および PDMS デバイスのほぼすべてのマイクロウェルに気泡が残った（白矢印）。これは、MPC ポリマーが約 70 %の疎水性メタクリル酸ブチルユニットを持ち、乾燥条件下で高い疎水性を持つためであると考えられる[6]。prevelex でコーティングすると気泡は消え、細胞は PS と PDMS デバイスのすべてのマイクロウェルでスフェロイドが形成された。また pHEMA で見られたような膜厚ムラは観察されなかった。

以上より prevelex はマイクロウェルを有する PS 製や疎水性の高い PDMS 製培養器に対してコンフォーマルに薄膜でコートでき、細胞接着を抑制してスフェロイドを形成することが示された。なおディップコートされた MPC ポリマー層は～50 nm であると報告されている[7]。prevelex と比較して MPC ポリマー層の膜厚が厚くなるが、これは 70 %含まれている疎水性ユニット（メタクリル酸ブチル）による疎水性相互作用が生じるためと考えられる。

更に prevelex が適用可能な細胞種や培養容器の種類を確認するため、異なる種類の細胞を、異なる prevelex コーティングされたマイクロウェルアレイデバイスに播種した。細胞は、MSC、10T1/2、HepG2、iPSC、ADSC、MCF-7 を用いた。各マイクロウェル内でのスフェロイド形成は、本研究で用いた細胞種とマイクロウェルアレイデバイスのすべての組み合わせで観察された（図 2-16）。

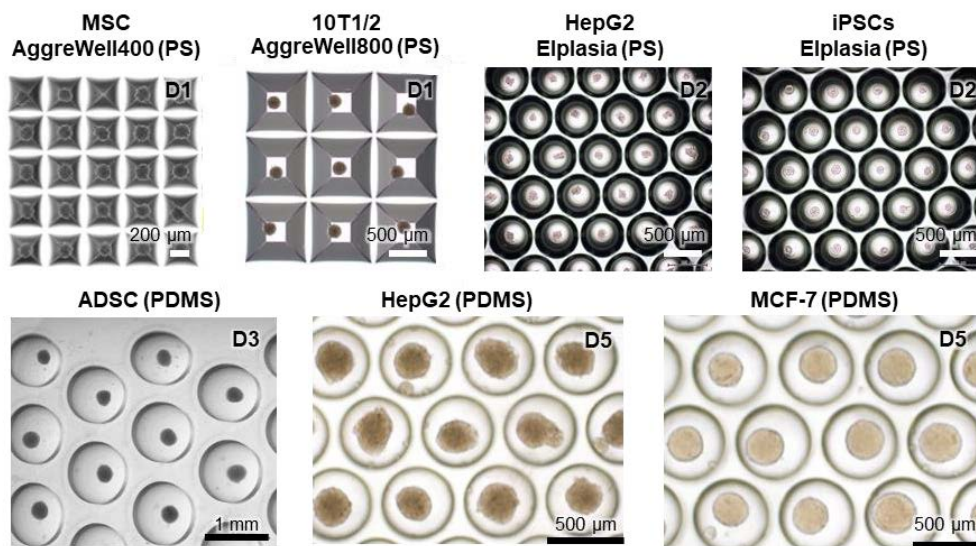


図 2-16 prevelex をコートしたマイクロウェル培養器での種々細胞のスフェロイド形成確認

以上より **prevelex** は様々な材質や形状のマイクロウェルプレートにコーティングでき、また様々な細胞を用いた場合でもスフェロイド形成出来ることが示された。

2.5.5 本項のまとめ

本項では微細加工基板に対して **prevelex** のコーティング特性評価を行った。また種々細胞および培養器を検討し、**prevelex** の適用可能性を評価した。その結果 **prevelex** は極薄膜でコンフォーマルに微細加工基材のコーティングが出来ることが示された。種々細胞および種々培養器でのスフェロイド形成を評価した。その結果、細胞種や培養容器の種類、形状に依らず細胞接着を抑制し、スフェロイドを形成することが示された。

2.6 本章のまとめ

本章では、両性イオンポリマーである **prevelex** を合成し、基礎物性、コーティング特性、および生体物質付着抑制能を中心に評価した。**prevelex** は基板上に親水性かつ電気的に中性な膜を提供し、生体物質付着抑制能を持つことが示された。また微細加工基材での検討の結果、**prevelex** は段差に追従して 10 nm 以下のコンフォーマルな極薄膜が形成された。**pHEMA** や **MPC** ポリマーでコーティングした場合、マイクロウェル内の気泡残留やコーティングしたポリマー膜の偏在の課題が見られたが、**prevelex** を用いた場合はこれらの課題は解決され、種々の基材、細胞を用いた場合でもスフェロイドを形成することが示された。

量産化の観点から見た場合、**prevelex** のコーティングはディップコーティングで行うことができ、従来微細加工基材へのコンフォーマル塗布を達成するために検討されてきた煩雑なプロセスが不要だった。また比較的低いプリベーク温度 (50~150 °C) で成膜が出来、更に再生医療で適用可能な 25 kGy のガンマ線滅菌にも耐えうることが示された。以上から **prevelex** は毛包原基形成用の微細加工 PDMS 培養器の表面処理材料として適用可能と結論付けた。

参考文献

- Zhao, C., Li, L., Wang, Q., Yu, Q. & Zheng, J. Effect of film thickness on the antifouling performance of poly(hydroxy-functional methacrylates) grafted surfaces. *Langmuir* 2011, 27, 4906-4913,
- [2] Ishihara, K.; Nomura, H.; Mihara, T.; Kurita, K.; Iwasaki, Y.; Nakabayashi, N. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* 1998, 39, 323-330.
- Hiroi, Y., Otani, A., Kishioka, T., Nishino, T. & Ozawa, T. Ion complex material having function of inhibiting adhesion of biological substance and method for manufacturing the same. United States patent US20160122576A1 (2014).
- Spriano, S.; Chandra, V. S.; Cochis, A.; Uberti, F.; Rimondini, L.; Bertone, E.; Vitale, A.; Scolaro, C.; Ferrari, M.; Cirisano, F. How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials? *Materials Science and Engineering: C* 2017, 74, 542-555.
- [5] Wilson, C. J.; Clegg, R. E.; Leavesley, D. I.; Percy, M. J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue engineering* 2005, 11, 1-18.
- [6] Ishihara, K.; Ishikawa, E.; Iwasaki, Y.; Nakabayashi, N. Inhibition of fibroblast cell adhesion on substrate by coating with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 1999, 10, 1047-1061.
- [7] Ishihara, K. Blood-compatible surfaces with phosphorylcholine-based polymers for cardiovascular medical devices. *Langmuir* 2019, 35, 1778-1787.

第三章

微細加工技術を用いた培養器の構造最適化

3.1 はじめに

底面にマイクロウェルを備えた培養器は、スフェロイドなどの細胞凝集塊の培養のために作製されてきた。主に作製上の都合から、マイクロウェルの形状は、丸底や逆ピラミッド型、V底、などが存在している。先行研究では丸底のマイクロウェルを備えた培養器を用いて毛包原基が自発的に形成されることを示してきた。しかしこれまでマイクロウェル形状が毛包原基の形成や機能に及ぼす効果については検討されていない。本章では、PDMSのマイクロウェル形状やウェルの高さ、ウェル間形状などの観点から培養器の構造を最適化することを目的とした(図3-1)。ウェル形状としてはFlat, Round bottom, Pen, Cone

(F,U,P,V)の4種類を設計・作製した。さらに第2章で検討した細胞低接着材料prevelexのコーティングを行い、毛包原基形成試験を行った。ことで、マイクロウェル形状と毛包原基の構造均一性を評価した。更に得られた毛包原基の構造均一性や遺伝子発現量を比較することで、最適なマイクロウェル形状を検討した。

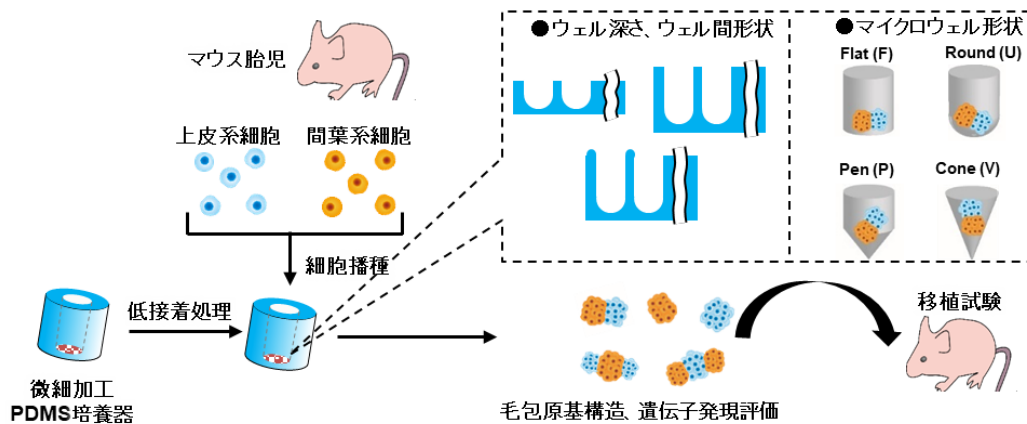


図 3-1 本章の検討内容

3.2 微細加工 PDMS 培養器の設計、作製

3.2.1 本項の目的

本項では、PDMS の構造検討に向け、ウェルの深さやウェル間形状、およびマイクロウェル形状を変えた培養器を設計、作製することを目的とした。

3.2.2 実験装置及び試薬

【試薬】

・ SYLGARD™184 Silicone Elastomer Kit : 東レ
ダウコーニング

・ PMMA-ジュラルミン製金型 : 日産化学株式会社

3.2.3 実験手順

HFG チップの作製

4 種類のマイクロウェル形状『Flat (F), Round (U), Pen (P), Cone (V)』の HFG チップをモールド成形で作製した。まず直径 7 mm の円の領域に直径 1 mm のマイクロウェル 19 個が規則的に三角配置されているアレイを設計した (図 3-2)。マイクロウェルの深さは 1 mm あるいは 2 mm とし、ディンプル間の隔壁形状は平坦またはなだらかタイプとした (図 3-

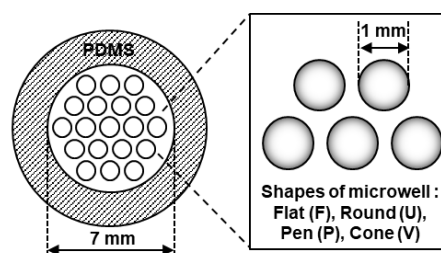


図 3-2 24well インサート用 PDMS 製
マイクロウェル培養器の概要

3)。PMMA-ジュラルミン基材を用いてポジ型の金型を作製した。SYLGARD のプレポリマー溶液と硬化剤を 10 : 1 の割合で混合し、金型に入れた。オープン中で 100 °C で 1 時間硬化させた。PDMS 溶液量を調整することで、マイクロウェル底部の PDMS 基板の厚さを 1.5 mm に設定した。

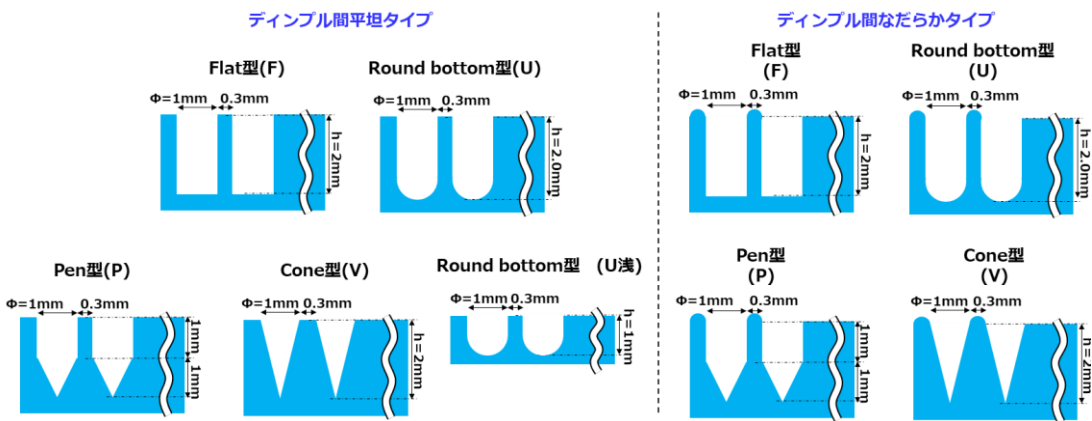


図 3-3 PDMS マイクロウェル培養器の設計概要

3.2.4 実験結果と考察

底面にマイクロウェルを備えた培養器は、スフェロイドなどの細胞凝集塊の培養のために作製されてきた。主に作製上の都合から、マイクロウェルの形状は、Round-bottom 底や逆ピラミッド型、Cone 底、などが存在している。そこで、PDMS のマイクロウェル形状が Flat, Round bottom, Pen, Cone (F,U,P,V) の 4 種類の容器



図 3-4 24well プレートにインサート容器をセットした様子

にインサートして使用できる (図 3-4)。深さ 2 mm の各形状のマイクロウェルを有する培養器をカットして断面を確認した写真を図 3-5 に示す。各マイクロウェル形状を持つ容器が成型されていることが示された。

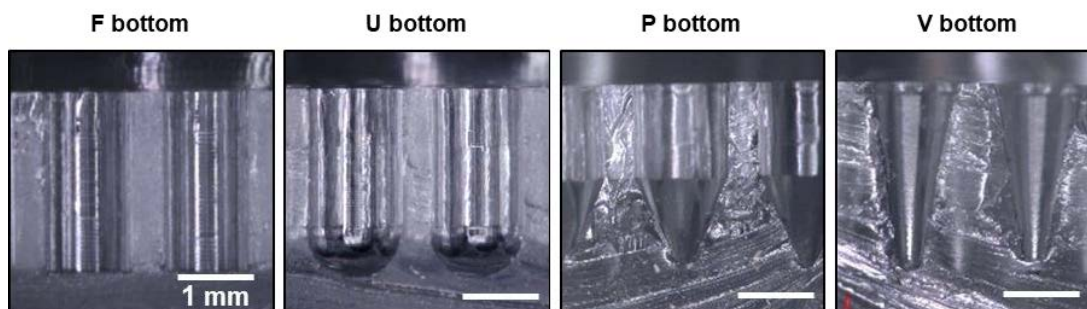


図 3-5 ディンプル構造を変えて作製した培養器の断面写真

3.2.5 本項のまとめ

本項では微細加工 PDMS 培養器として、種々の構造の培養器を設計・作製した。作製した培養器の一部について断面写真を撮影し、設計通りの構造の場合容器が形成していることが示された。

3.3 細胞低接着コーティングおよびスフェロイド形成確認

3.3.1 本項の目的

本項では前項で作製した種々構造の異なる培養器を用いてスフェロイドの形成能を評価することを目的とした。prevelex を用いて細胞低接着処理を行い、マイクロウェルの深さおよびウェル間形状の異なる培養器において細胞培養試験を行い、適した構造を評価した。

3.3.2 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ エッチング装置：メイワフォーシス
- ・ 走査型電子顕微鏡, JSM-7400F : 日本電子
- ・ 実体顕微鏡：キーエンス社
- ・ 培養顕微鏡, CKX53 : OLYMPUS

【試薬】

- ・ prevelex CC1 : 日産化学
- ・ トリプシン-E D T A 溶液 : PromoCell
- ・ ヒト間葉系幹細胞(hMSC) : PromoCell
- ・ イオン液体, HILEM IL1000 : 日立ハイテクノロジーズ
- ・ ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC) : PromoCell
- ・ PBS (Phosphate Buffered Saline) 10× : Gibco
- ・ 間葉系幹細胞用培地, : PromoCell

3.3.3 実験手順

細胞低接着コーティング

プラズマエッチング装置で 5 mA, /3 min 処理後、prevelex 溶液を注ぎ 1 時間浸漬した。その後廃液して、各基材を 50 °C/24 時間焼成し溶剤を揮発させた。その後純水で 3 回洗浄し、固着していないポリマーを除去した。基板は 25 kGy のガンマ線照射により滅菌した。

HFG チップ上でのスフェロイド形成試験

hMSC を用いてスフェロイド形成試験を実施した。培養 3 日目の細胞を 0.25 %トリプシンで 37 °C、5 分間処理して回収し、作製した Round bottom 型の HFG チップに 1×10^4 cells/

容器で播種した。1日培養後、培地を吸引し、純水で5%に希釈したイオン液体に置換した。室温で3日間乾燥後、走査型電子顕微鏡を用いて、加速電圧1.0 kVで断面画像を得た。

HFGチップのマイクロウェル深さの検討

ADSCを用いてスフェロイド形成試験を実施した。培養3日目の細胞を0.25%トリプシンで37℃、5分間処理して回収した。マイクロウェル深さが1 mm、2 mmのRound bottom型の培養器に 19×10^4 cells / 200 μ L / 容器で播種した。1日培養後、150 μ Lの培地を吸引し、200 μ Lの新しい培地を添加した。培地交換前後に位相差顕微鏡にてスフェロイドを観察した。

HFGチップのマイクロウェル間の隔壁形状の検討

ADSCを用いてスフェロイド形成試験を実施した。マイクロウェル間の隔壁形状が平坦およびなだらかなタイプのRound bottom型の培養器に 19×10^4 cells / 200 μ L / 容器で播種した。1日培養後、位相差顕微鏡にてスフェロイドを観察した。

3.3.4 実験結果と考察

prevelexコートした丸底マイクロウェル容器でのスフェロイド形成

作製したprevelexコート済みHFGチップに細胞を播種してスフェロイド形成されるか評価した。prevelexコートした丸底マイクロウェルに播種したADSCは培養1日後にスフェロイドが形成された。形成したスフェロイドのSEM観察を行った。生体試料のSEM観察には、導電性とSEM試料室内の真空条件への耐性を持たせるための処理が必要である。そこで先行研究を参考にイオン液体で処理して、SEM観察を行った[1]。その結果、図3-6に示すように直径約100 μ mの球状のスフェロイドがマイクロウェル底面部に形成していた。以上よりprevelexコーティングによりPDMS培養器に細胞低接着表面が形成され、スフェロイドが形成された。

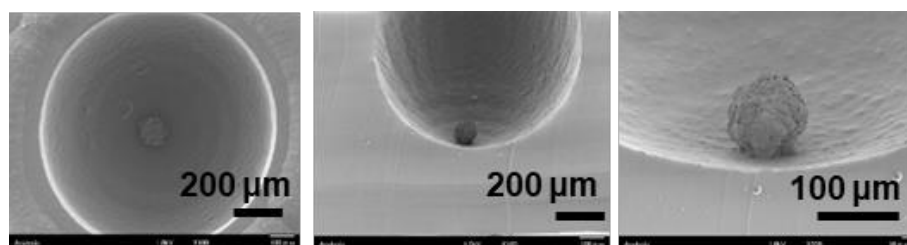


図3-6 U底ディンプル容器でのスフェロイド形成のSEM観察

HFG チップのマイクロウェル深さの検討

マイクロウェルの深さが浅い場合、培地交換による対流や操作時の揺れにより形成したスフェロイドが移動することがある。これは観察性の観点や別のスフェロイドとの融合によるサイズのばらつきが生じることから好ましくない。また作製の容易さを考えると、深さにも制限がある。そこで適切なマイクロウェル深さの設計に向けた検討を行った。1 mm, 2 mm と深さを変えた HFG チップでスフェロイドを形成し、培地交換による移動を調べた。深さが 1 mm、2 mm のいずれの場合も培地交換前では各マイクロウェルに 1 個ずつ ADSC のスフェロイドを形成していた(図 3-7)。ここで培地交換を行うと、深さが 1 mm のものでは形成したスフェロイドが移動し、別のマイクロウェル内やマイクロウェル間の壁の部分に存在していた。一方で深さが 2mm のものではスフェロイドは移動せず全てマイクロウェル内にとどまっていた。

マイクロウェル深さを深くすると気液界面からの距離が離れるため、一般には酸素供給量が低下する。しかしながら、酸素透過性の PDMS を用いるこのデバイスでは、培養基底面からも酸素が供給されるため深いマイクロウェルでもそのような懸念が生じない。スフェロイドをマイクロウェル内に保持するため毛包原基培養時は栄養供給のため培地交換が必要であることから、安定に観察するために以降の評価実験ではマイクロウェルの深さを 2 mm とした。

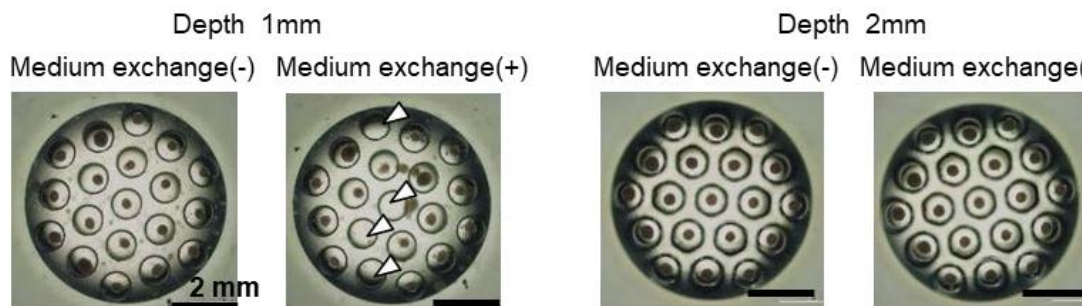


図 3-7 深さの異なる U 底ディンプル容器でのスフェロイドの移動評価

HFG チップのマイクロウェル間の隔壁形状の検討

マイクロウェル間の隔壁形状の検討を行った。隔壁が平坦、なだらかな培養器でスフェロイドが形成された。隔壁が平坦形状の場合、マイクロウェル以外に隔壁部分にも細胞や小さなスフェロイドが形成された。(図 3-8)。一方で隔壁がなだらかな形状の場合、スフェロイドはマイクロウェル内のみに存在した。形成したスフェロイド個数と平均直径、および誤差を表 3-1 に示した。なだらかな形状とすることでディンプル間に存在する細胞が全てマイクロウ

エルに落下したことが示された。隔壁が平坦な場合は多数の細胞が隔壁上に残り、多数のスフェロイドが形成された。また小さなスフェロイドが多く形成したことからサイズ誤差が大きかった。一方で隔壁がなだらか形状の場合は、マイクロウェル数と同じ 19 個のスフェロイドが形成され、サイズ誤差が 10 %程度と小さかった。

以上より隔壁をなだらか形状とすることで、培養時にディンプル間に存在する細胞が全てマイクロウェルに落下し、目的個数のスフェロイドを高いサイズ均一性で作製できることが示された。以降の検討ではディンプル隔壁をなだらか形状のものを使用した。

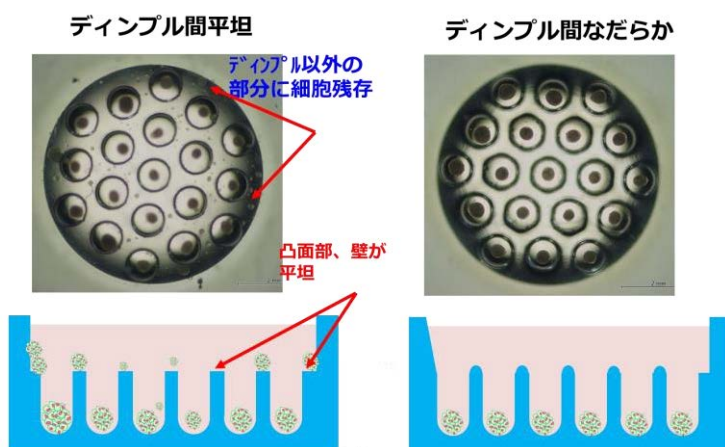


図 3-8 ディンプル間形状を変えた U 底ディンプル容器でのスフェロイド形成評価

表 3-1 ディンプル間形状とスフェロイドの個数、サイズデータ

ディンプル間	スフェロイド 個数	平均直径 (μm)	誤差 (%)
平坦	> 50	206	61
なだらか	19	403	12

3.3.5 本項のまとめ

prevelex コーティングにより Round bottom(U 型)形状の培養器でスフェロイド形成することを示した。また培地交換の観点からマイクロウェル深さを検討し、深さ 2 mm とすることで、培地交換の影響を受けずに培養が可能であることを示した。更にマイクロウェル間の隔壁の形状を検討し、なだらか形状とすることで全細胞がマイクロウェルに集合し、均一性の高いスフェロイドを目的個数作成できることを示した。

以上の結果より、次節以降の毛包原基形成検討では、マイクロウェル深さが 2 mm、マイクロウェル間の隔壁形状がなだらかなものを使用して検討を行うこととした。

3.4 毛包原基の形成試験

3.4.1 本項の目的

前節ではマイクロウェルおよびマイクロウェル間の隔壁構造を検討し、スフェロイド培養に適した容器を決定した。本項ではマイクロウェル構造の異なる容器を用いて毛包原基を形成することを目的とした。

3.4.2 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ 蛍光顕微鏡, BZ-X700 : キーエンス社製
- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX IX-71

【試薬・器具】

- ・ 妊娠マウス C57BL/6jcl 胎齢 18 日 : 日本クレア
- ・ イソジン : Meiji Seika Meiji Seika ファルマ
- ・ Collagenase type I : WAKO
- ・ Dispase II : ROCHE
- ・ 細胞培養ペトリディッシュ (φ 40mm) : TPP
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Cell strainers Cell strainers φ 40 μm : CORNING
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA
- ・ Penicillin -Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ HuMediaHu-KG2 : KURABO
- ・ 0.25%トリプシン : Thermo Fisher Scientific
- ・ Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific

3.4.3 実験手順

既報の論文に従ってマウス胎児より間葉系および上皮系細胞を分離した[2]。全体的な操作の流れを以下に示す。

細胞採取

E18 マウス胎児背部皮膚より上皮系細胞と間葉系細胞を採取した。

ディスペルゼ処理

採取した皮膚を4.8 U/mLのディスペルゼで1時間4 °C、20 rpmで振盪しながら処理した。

上皮組織、間葉組織の分離

ピンセットを用いて上皮組織と間葉組織を分けた。

コラゲナーゼ処理

上皮組織および間葉組織の100 U/mLコラゲナーゼ処理（80分, 37 °C）を行った。

トリプシン処理

さらに上皮組織を 37 °Cで 100 U/mL のコラゲナーゼを含む 0.25%トリプシンで 10 分処理したのち、上皮細胞と間葉細胞にそれぞれセルストレイナーを用いて単一化処理を行った。

細胞播種

遠心によりそれぞれの細胞を回収し、1 : 1 の割合で培地中に混合し、細胞懸濁液を調製した。PDMS 容器に培地を 100 μ L 添加して泡抜きのため遠心処理(3000 rpm / 1 分間) した。調製した細胞懸濁液を 9.5×10^4 cells / 100 μ L/容器で播種した。培地は間葉細胞培養培地 (DMEM+10%FBS+1 %P/S) と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。

μ 。

観察

37 °Cインキュベーターで 3 日間培養し、蛍光差顕微鏡にて位相差観察を行った。更に長期培養が可能かを評価するため 14 日間培養を継続し、定期的に写真撮影を行った。

3.4.4 実験結果と考察

マイクロウェル形状が毛包原基形成に及ぼす効果

マイクロウェル形状が毛包原基形成への効果を評価するため、マイクロウェル形状が Flat, Round bottom, Pen, Cone (F,U,P,V)) である 4 種類の HFG チップへ、マウス皮膚から採取した上皮系および間葉細胞を播種し、毛包原基を形成させた (図 3-9) 。F 底タイプの容器では 1 つのマイクロウェルに複数の細胞構造体が存在していた一方で、残りの U、P、V 型の形状のものに関しては 1 つのマイクロウェルに 1 つの構造体が形成していた。

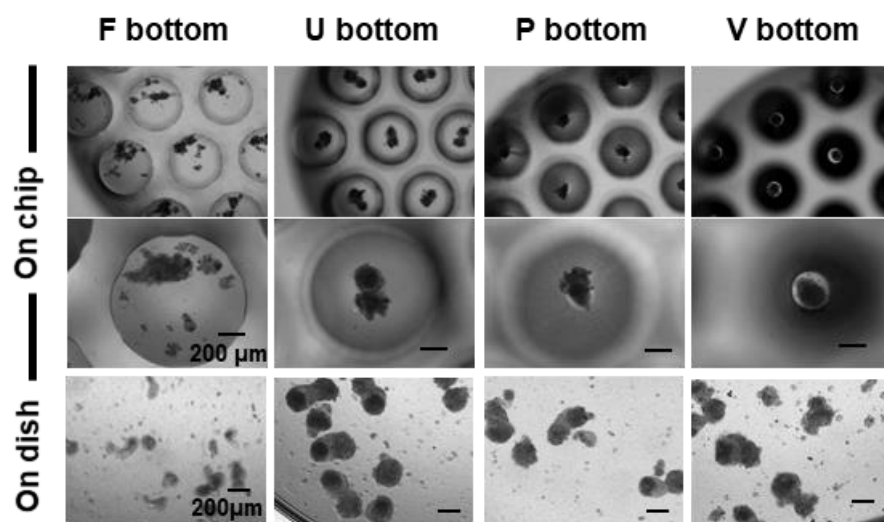


図 3-9 ディンプル構造の異なる培養器での毛包原基形成評価

また 96well プレートに取り出して構造体の形状を観察したところ、図 3-10 に示すように毛包原基の特徴となる上皮系と間葉系が分離したダンベル形状の毛包原基の形成は U,P,V 型では多数形成していた。以上より細胞が底面で集合しやすい U,P,V 型のマイクロウェル構造では、毛包原基が形成しやすいことが示された。

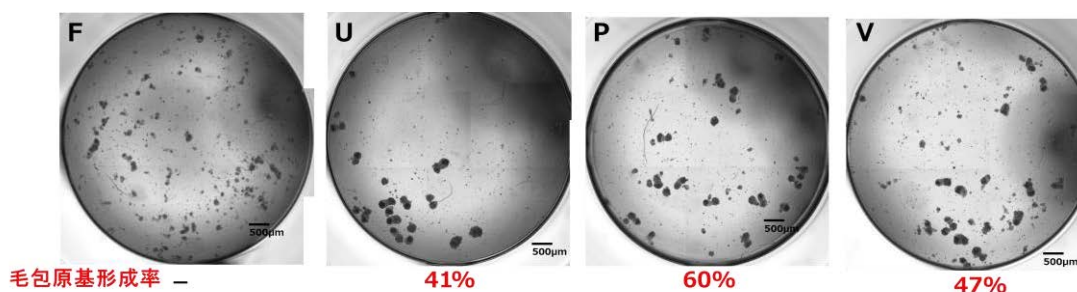


図 3-10 96well プレート上に取り出した際の観察写真と毛包原基の形成割合

毛包原基の長期培養での安定性

毛包原基での毛髪再生時には、*in vitro* で 2 週間以上の長期培養を行うことで毛管様構造を形成する手法がとられることがある[3]。そこで 15 日間培養した際の毛包原基の様子を観察した。培養 4 日で形成された毛包原基は、培養日数が長くなった場合でも培養器へ接着することはなく、構造が維持された(図 3-11)。以上より、prevelex コーティング表面の長期安定性を確認することができた。

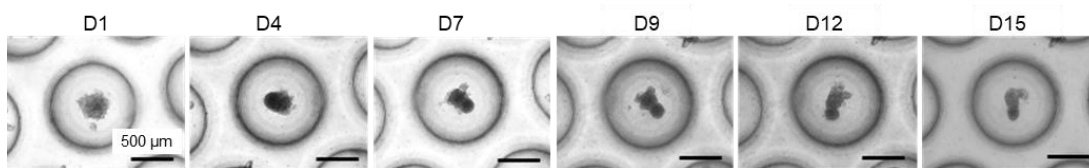


図 3-11 毛包原基の長期培養時のタイムラプス観察

3.4.5 本項のまとめ

本項ではマイクロウェル形状を変えて毛包原基の形成試験を行った。細胞の集合を促進する U,P,V 型のマイクロウェルにて毛包原基の形成が確認され、ウェル構造により毛包原基の形成割合に差が確認された。更に U 型マイクロウェルにて長期培養試験の行い、15 日間培養した場合でも細胞低接着性を維持して毛包原基培養が可能であることが示された。

3.5 毛包原基の形状評価

3.5.1 本項の目的

前節では prevelex をコートした培養器で毛包原基が形成された。本項では形成した毛包原基の形状評価を行い、マイクロウェルの形状の影響を評価することを目的とした。

3.5.2 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ 蛍光顕微鏡：キーエンス社製
- ・ インキュベーター, MCO-170AICUVD : phcbi
- ・ 遠心機

【試薬・器具】

- ・ 妊娠マウス C57BL/6jcl 胎齢 18 日：日本クレア
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- ・ HuMedia-KG2 : KURABO
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Vybrant™ Cell-labeling Solutions : Molecular probes
- ・ Fetal bovine serum (FBS) :SIGMA
- ・ 96 well plate : SUMILON

3.5.3 実験手順^[4]

全体的な操作の流れを以下に示す。

細胞採取

E18 マウス胎児背部皮膚より上皮系細胞と間葉系細胞を採取し、単離した。

間葉系細胞の染色

間葉系細胞の 1 mL 懸濁液に Vybrant™ Cell-labeling Solutions を 5 μ L 加え、20 分間インキュベートした。

細胞播種

遠心によりそれぞれの細胞を回収し、1 : 1 の割合で培地中に混合したのち作製した PDMS 容器に播種した。培地は間葉細胞培養培地 (DMEM+10 %FBS+1 %P/S) と HuMedia-KG2 の 1 : 1 混合培地を用いた。培地を 100 μ L 添加して泡抜きのため遠心処理 (3000 rpm / 1 分間) した。細胞懸濁液を 9.5×10^4 cells / 100 μ L / 容器 (= 0.5×10^4 cells/マイクロウェル) で播種した。

観察、形状評価

37 $^{\circ}$ C インキュベーターで 3 日間培養し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。形状評価のため、形成した毛包原基を 96well プレートへ移し、蛍光観察を行った。毛包の形状は、既報に従い、ImageJ を用いた画像解析により解析した[5]。まず Vybrant で染色されていない構造体の周囲を手作業でトレースするとともに、Vybrant 染色部と非染色部の接触した部分をトレースした。各条件で上記の比率を計算し、断面接触比 α を得た。

3.5.4 実験結果と考察

得られた細胞構造体の均一性を画像解析により評価した (図 3-12)。F 型に関しては形状ばらつきが大きく様々な構造体が形成されていることが示された。一方でそれ以外のマイクロウェル形状のものでは α 値の小さいダンベル形状の構造体が多数存在していた。中でもマイクロウェル形状が P 型のもので特に毛包原基の構造均一性が高いことが示された。これはマイクロウェル形状に依存して細胞の集合しやすさが変化するためと考えられる。マイクロウェルの底面構造と体積を考えると細胞は F<U<P<V の順に集合しやすくなると考えられる。基本的に集合しや

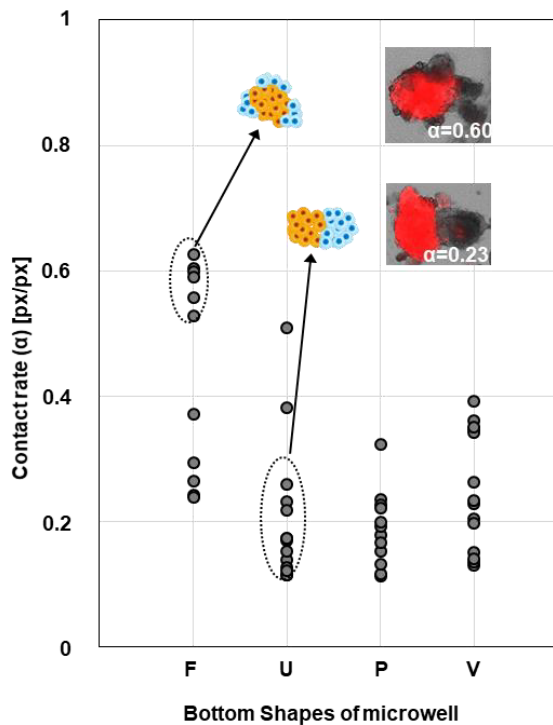


図 3-12 ディンプル構造と毛包原基の形状ばらつき評価

すいほど、細胞同士の相互作用が促進されるためダンベル形状の毛包原基が形成しやすくなると考えられる。

一方でマイクロウェル部分の培養液量が減少し、かつ底面では培養液の循環が起きづらいことから栄養供給が不足する。そのため特にV型のような狭い構造のマイクロウェルでは細胞数に対する培養液量が不足し、細胞へのダメージにより細胞間相互作用が抑制され、構造均一性が低下したと考えた。

3.5.5 本項のまとめ

本項では形成した細胞凝集塊の構造を画像解析により評価した。F型以外のマイクロウェル形状の培養器で培養した場合はダンベル形状の毛包原基様の構造体が多く観察された。特にP型の容器にて最も多く毛包原基が形成しており、また構造均一性が高かった。マイクロウェルの形状による細胞集合性の差と培養液の循環の差を考慮すると、細胞の集合を促進しつつも培養液からの栄養供給を妨げないP型の形状が毛包原基の形成の観点において最適と結論づけた。

3.6 毛包原基の機能評価

3.6.1. 本項の目的

前項では毛包原基の構造均一性の観点からマイクロウェル構造の及ぼす影響について議論した。本項では毛包原基の機能評価としてPCRによる遺伝子発現試験を行い、マイクロウェル構造の及ぼす影響を評価し、構造均一性との相関を確認することを目的とした。

3.6.2. 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ 微量サンプル分光光度計 : Nano Drop One, Thermo Fisher Scientific
- ・ 蛍光顕微鏡 : キーエンス社製
- ・ Real time PCR system : Step One TM, Applied Biosystems

【試薬・器具】

- ・ 妊娠マウス C57BL/6jcl 胎齢 18 日 : 日本クレア
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS) :SIGMA

- Penicillin-Streptomycin (P/S) : GIBCO
- HuMedia-KG2 : KURABO
- 96 well plate : SUMILON
- Buffer RLT
- 70 %エタノール
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase free water
- QIA スピンカラム
- RNeasy スピンカラム
- Nuclear free water : Qiagen
- QuickGene : KURABO
- SYBRGreen Real-Time PCR Master Mixes :
Thermo Fisher Scientific

3.6.3. 実験手順^[4]

RNA抽出

- a) 培養 3 日目の毛包原基を 1.5 mL チューブに回収した。
- b) 遠心分離機に a) のマイクロチューブを設置し、4 °C、15000 rpm、1 min で遠心した。上澄みを除去し、PBS を 1mL 入れて同様に遠心処理、上澄み除去を 3 回行った。この操作は、残った培地の除去のため細胞およびスフェロイドを沈殿させると同時に、遠心機内の予冷のために行った。
- c) 上澄みを捨てた後、Buffer RLT を 350 μ L マイクロチューブに入れ、マッシャーを用いて毛包原基をすり潰した。よくピペッティングした後に、その溶液を QIA Shredder スピンカラム（紫）に回収し、4 °C、15000 rpm、2 min で遠心した。
- d) QIA Shredder スピンカラム（紫）の上部を捨て、コレクションチューブ内の溶液に 70 % エタノールを 350 μ L 加え、RNeasy スピンカラム（ピンク）に移した後、4 °C、10000 rpm、15 s で遠心した。
- e) コレクションチューブ内の濾液を捨て、Buffer RW1 を 700 μ L 入れた後、4 °C、10000 rpm、15 s で遠心した。
- f) コレクションチューブ内の濾液を捨て、Buffer RPE を 500 μ L 入れた後、4 °C、10000 rpm、15 s で遠心した。
- g) コレクションチューブ内の濾液を捨て、Buffer RPE を 500 μ L 入れた後、4 °C、10000 rpm、2 min で遠心した。
- h) 新しい 2 mL コレクションチューブにピンクのカラムを移し、4 °C、10000 rpm、1 min で遠心した。

i) 1 mL マイクロチューブにピンクのカラムを移し、RNase free water を 30 μ L 入れた後、4 $^{\circ}$ C、10000 rpm、1 min で遠心した。

j) i)で回収した NFA30 μ L を入れ 4 $^{\circ}$ C、10000 rpm、1 min で遠心した。

RNA 濃度測定・希釈

a) Nano Drop One の電源を付け、RNA を選択。

b) 70 %エタノールで拭いた後、RNase free water 2 μ L を測定板の中心に滴下し、ベースラインを得た。

c) サンプル 2 μ L を測定板の中心に滴下し、測定ボタンを押した。

d) サンプルの RNA 濃度を Nuclear free water で希釈した（試験に合わせて終濃度設定）。

逆転写

a) RNA を 65 $^{\circ}$ C、5 分間、インキュベートし、その後氷上で冷却した。

b) マイクロチューブに下記の試薬を加え、透明フィルムで覆った。

<u>試薬・試料</u>	<u>容量</u>
Nuclear free water	0 μ L
5 \times RT Buffer	4 μ L
Primer mix	1 μ L
Enzyme mix	1 μ L
RNA	14 μ L
<u>Total</u>	<u>20 μL</u>

c) PCR 装置にセットし、37 $^{\circ}$ C、15 分間、98 $^{\circ}$ C、5 分間で逆転写を行った。

RT-PCR

a) マイクロチューブに下記の試薬を適量加え、透明フィルムで覆った。

<u>試薬・試料</u>	<u>容量</u>
TB Green Premix Ex Taq II	10 μ L
Forward Primer	0.4 μ L
Reverse Primer	0.4 μ L
ROX Reference Dye	0.4 μ L
Nuclear free water	7.8 μ L

DNA サンプル	1 μ L
<u>Total</u>	<u>20 μL</u>

Forward Primer, Reverse Primer は下記の配列を用いた[6,7]。

	Forward Primer	Reverse Primer
Versican	GACGACTGTCTTGGTGG	ATATCCAAACAAGCCTG
GAPDH	AGAACATCATCCCTGCATCC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
CD34	TGGGTCAAGTTGTGGTGGGAA	AAGAGGCGAGAGAGGAGAAATG

b) PCR 装置にセットし、95 $^{\circ}$ C、5 秒間、60 $^{\circ}$ C、60 秒間)×45cycle で PCR を行った。

3.6.4. 実験結果と考察

遺伝子発現、形状評価との相関確認

毛包原基の構造と遺伝子発現の相関を確認した (図 3-13)。発毛効率の指標となる間葉系細胞の **Versican** についてダンベル形状の毛包原基が形成しなかった F 型が最も発現量が低かった。U、V 底が同程度で、構造体の均一性が高かった P 型のものが最も発現量が高かった。

また未分化性の指標となる上皮系細胞のマーカーの **CD34** に関しては F 型以外はほぼ同等の発現量となっていた。F 型では毛包原基様の構造が形成されず脱分化が促進された一方で、その他のマイクロウェル形状で形成された毛包原基では未分化性が一定レベル保たれていることから、毛包原基の形成により未分化性が保持できることが示された。これより移植後に周辺環境の影響を受けて分化が進行し、毛髪再生を誘導する能力があると考えられる。

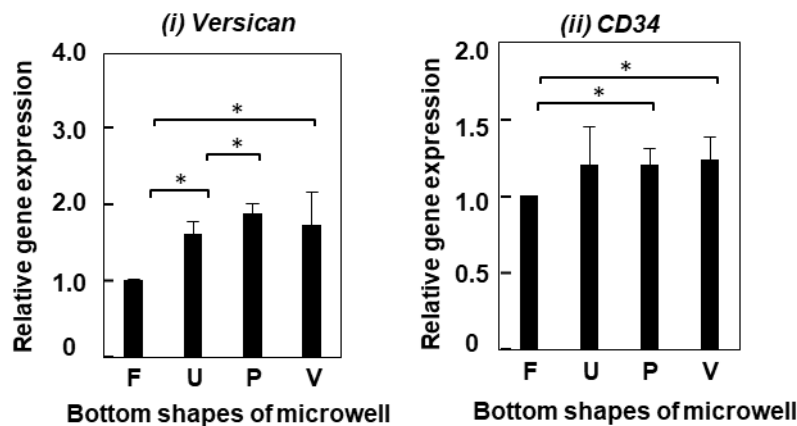


図 3-13 各ディンプル構造で作製した毛包原基の遺伝子発現評価

3.6.5 本項のまとめ

本項では調製した毛包原基の機能評価として、RT-PCR 法により遺伝子発現量を評価した。マイクロウェル構造を変え、細胞の集合性を変化させることで発毛効率の指標となる **Versican** の発現量が変化した。**Versican** の発現量は前項の毛包原基の形成個数と相関が確認された。**CD34** は毛包原基が形成されたマイクロウェルにて発現量が高かった。本検討から P 型構造で調製した毛包原基が最も高い性能を持つことが示された。

3.7 調製した毛包原基の毛包再生能

3.7.1. 本項の目的

本項では得られた毛包原基をパッチ法により免疫不全マウスへ移植し、毛包再生能を評価することを目的とした。マウスへの移植試験に用いた 2 つの方法についていかに記述する。

チャンバー法 (図 3-14 a,b)

免疫不全マウスの背部皮膚を丸く切り取り、そこにシリコーン製のチャンバーを取り付けて移植床 (**wound bed**) を作製し、そこに細胞を注入することで細胞がホストに定着し、乾燥や汚染を防ぎながら毛包を含む皮膚の再構築が出来る。細胞を注入して 1 週間後にチャンバーをはずし、飼育を続けると傷口が閉じ、再生した皮膚表面から発毛が観察される[9]。

パッチ法 (図3-14 c,d)

より簡便な毛包再構築の方法として、パッチ法が考案され、現在では広く用いられている。これは、免疫不全マウスの皮膚内 (間葉～脂肪組織の領域) にシリンジ等でスペース (パッチ) を作製し、そこに細胞を注入する方法である。注入された細胞はパッチ内で毛包を形成し、移植した部分の皮下から毛の形成が観察される [10]。黒毛マウスの細胞を注入すれば、ホストの皮膚から皮下に再生した毛髪が色の変化で確認できる。

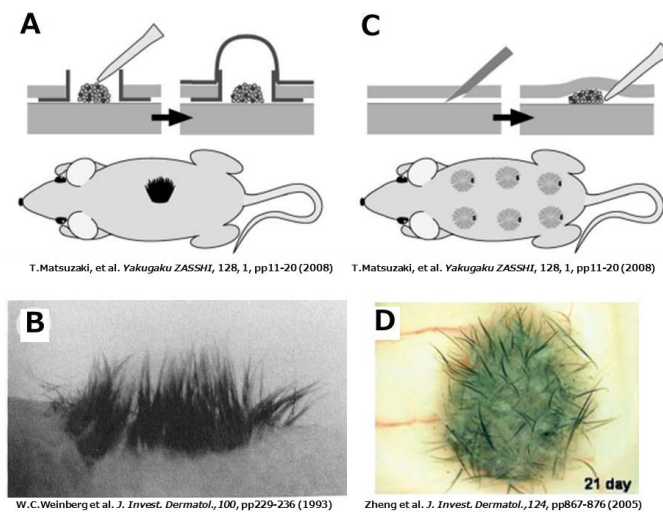


図 3-14 A : チャンバー法での細胞移植法[8]、B : チャンバー法により免疫不全マウスから再生した毛[9]、C : パッチ法での細胞移植法[8]、D : パッチ法により免疫不全マウスから再生した毛[10]

3.7.2. 実験装置及び試薬

【装置】

・小動物用イソフルラン麻酔器：バイオリサーチセンター株式会社

【試薬】

・妊娠マウス (C57BL/6jcl 妊娠 18 日) マウス：日本クレア
 ・ICR ノードマウス 5 週齢♂：オリエンタル酵母
 ・18 G V ランス：日本アルコン
 ・Prime surface 96 U plate：住友ベークライト社製

・倒立型蛍光顕微鏡, DP-71 : OLYMPUS
 ・デジタルマイクロスコープ : KEYENCE
 ・デジタルカメラ, Tough : Olympus
 ・ローダミン-ファロイジン : Cytoskeleton
 ・シリコンチャンバー : 日産化学
 ・4%パラホルムアルデヒド : 富士フイルム和光純薬
 ・DAPI : Sigma Aldrich
 ・共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700; Carl Zeiss)

3.7.3 実験手順

パッチ法での毛包原基の移植試験

・細胞採取

E18 マウス胎児背部皮膚より上皮系細胞と間葉系細胞を採取し、単離した。

・細胞播種

遠心によりそれぞれの細胞を回収し、1:1の割合で培地中に混合したのち作製した PDMS 容器に播種した。培地は間葉細胞培養培地 (DMEM+10 %FBS+1 %P/S) と HuMedia-KG2 の 1:1 混合培地を用いた。播種細胞数は 19×10^4 cells/容器 (= 1.0×10^4 cells/マイクロウェル) とした。

・パッチ法での毛包原基の移植試験

3日間培養して毛包原基を作製した。イソフルランによる呼吸麻酔をかけたICRヌードマウス皮下に20 GオフサルミックVランスで移植穴を作製した。1つの移植穴につき各容器で作製した毛包原基を19個をマイクロピペット (20 -0.5 μ L) 移植した。毛包原基を移植したマウスは、移植28日目に顕微鏡を用いて観察した。

チャンバー法での毛包原基の移植試験

・細胞採取

移植片の細胞を移植先の組織と区別するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するトランスジェニック胎児から細胞を単離した (図 3-15)。E18 マウス胎児背部皮膚より上皮系細胞と間葉系細胞を採取し、単離した。

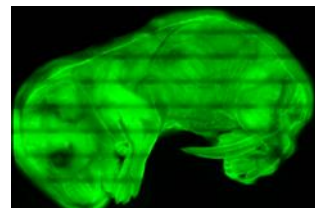


図 3-15 GFP 発現マウス胎児の蛍光画像

・細胞播種

GFP で標識した胚性上皮細胞と間葉系細胞の混合細胞懸濁液を、prevelex でコートした PDMS 製 U 底マイクロウェル培養器に播種した。遠心によりそれぞれの細胞を回収し、1:1の割合で培地中に混合したのち作製した PDMS 容器に播種した。培地は間葉細胞培養培地 (DMEM+10 %FBS+1% P/S) と HuMedia-KG2 の 1:1 混合培地を用いた。播種細胞数は 19×10^4 cells/容器 (= 1.0×10^4 cells/マイクロウェル) とした。

・毛包原基移植

毛包原基の毛髪誘導能は、先行研究と同様の方法でチャンバー法を使用して試験した [11]。イソフルラン麻酔下で、5 週齢の ICR nu/nu マウスの背部皮膚に全厚の創傷 (直径 4-6 mm) を外科的に作製した。C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスから解離した GFP 標識上皮・間葉系細胞を用いて調製した HFG を、挿入したシリコンチャンバーに 250 個/チャンバ

一の集積密度で移植し、筋膜に縫着させた。移植 1 週間後に上部チャンバーを、1 週間後に下部チャンバーを取り外し、4 週間発毛を観察した。移植部位はすべてデジタルカメラで観察した。移植した皮膚は小さく切り、移植 4 週間後に 4 %パラホルムアルデヒドで固定した。皮膚の小片をローダミン-ファロイジンと DAPI で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

3.7.4 実験結果と考察

パッチ法での毛髪再生試験

各マイクロウェル形状の培養器で調製した毛包原基を各 19 個ずつ 3 箇所のパッチ法により移植した。移植 28 日後に形成した毛の様子を図 3-16 に示す。毛包原基移植部では黒い塊となって毛が形成しており、黒塊内からは大量の毛が観察された。毛の再生本数に関してはサンプル間で有意差は確認されなかった。

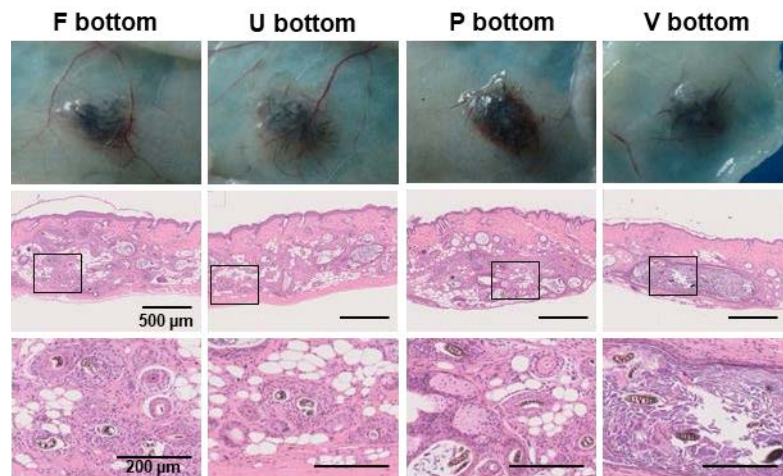


図 3-16 パッチ法での毛髪再生評価

チャンバー法での毛髪再生試験

培養 3 日目に形成した 250 個の毛包原基を、マウスの背部皮膚にシリコンチャンバーを用いて外科的に作成した傷口に移植した (図 3-17(b))。移植後 28 日目に移植部位で大量の発毛が観察された (図 3-17(c))。共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、GFP で標識された移植組織由来の細胞が移植先の組織と生着し、毛包を形成していることが確認された。

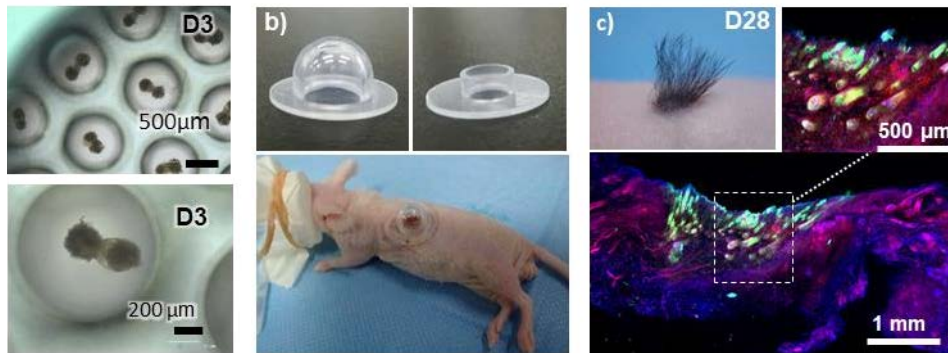


図 3-17 GFP 発現マウス細胞で作製した毛包原基のチャンバー法での移植試験結果

3.7.5 本項のまとめ

本項ではパッチ法による毛包原基の移植試験を行い、マイクロウェル構造に依らず発毛が確認された。またチャンバー法による移植試験を行った結果、移植組織由来の細胞が移植先の組織へ生着し、毛包原基を形成していることが示された。

3.8 本章のまとめ

本章では、微細加工 PDMS 容器の構造最適化について述べた。マイクロウェル深さおよびウェル間形状を検討し、深さ 2 mm, ウェル間をなだらか形状とすることで、培地交換を含む汎用的な培養プロセスで各マイクロウェルに 1 つずつ細胞凝集塊を形成出来ることが示された。更にマイクロウェル形状を検討して、毛包原基の形成効率、遺伝子発現量評価、および移植試験を行った。その結果、細胞が集合しやすい U,P,V 型の構造で毛包原基形成率が高く、発毛効率の指標となる **Versican** の発現量が高くなることが示された。特に細胞の集合を促進しつつ、培養液の栄養が不足しない P 型容器で最も高い **Versican** の発現量が確認された。また **CD34** の発現量から毛包原基の形成率が高い場合未分化性が維持されていることが示された。更に調製した毛包原基を移植したところ免疫不全マウスへ生着し毛髪再生することを確認した。以上から培養容器の構造を変えることで、毛包原基の形成率や機能を制御でき、特に P 型の容器で調製した毛包原基は構造均一性が高く、発毛効率が高いと結論付けた。

参考文献

Joubert, L.-M.; McDonald, K. SEM visualization of biological samples using Hitachi Ionic Liquid HILEM® IL 1000: a comparative study. *Microscopy and Microanalysis* 2016, 22, 1170-1171.

[2] Kageyama, T.; Yoshimura, C.; Myasnikova, D.; Kataoka, K.; Nittami, T.; Maruo, S.; Fukuda, J. Spontaneous hair follicle germ (HFG) formation in vitro, enabling the large-scale production of HFGs for regenerative medicine. *Biomaterials* 2018, 154, 291-300.

再生毛包原基の集合体の製造方法、毛包組織含有シート、及び毛包組織含有シートの製造方法 JP2016/081747 (2016).

[4] 景山達斗, 毛髪再生医療を目指した毛包原基の大量調製に関する研究. (2017).

[5] Hoeffcker, I. T.; Iwata, H. Manipulation of cell sorting within mesenchymal stromal cell-islet cell multicellular spheroids. *Tissue Engineering Part A* 2014, 20, 1643-1653.

[6] Kishimoto, J.; Ehama, R.; Wu, L.; Jiang, S.; Jiang, N.; Burgeson, R. E. Selective activation of the versican promoter by Epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96, 7336-7341.

[7] Kageyama, T.; Yan, L.; Shimizu, A.; Maruo, S.; Fukuda, J. Preparation of hair beads and hair follicle germs for regenerative medicine *Biomaterials* 2019, 212, 55-63.

Matsuzaki, T. Technologies for Hair Reconstruction and Their Applicability for Pharmaceutical Research *Yakugaku ZASSHI* 2008, 128, 11-20.

Weinberg, W. C.; Goodman, L. V.; George, C.; Morgan, D. L.; Ledbetter, S.; Yuspa, S. H.; Lichti, U. Reconstitution of Hair Follicle Development In Vivo: Determination of Follicle Formation, Hair Growth, and Hair Quality by Dermal Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 1993, 100, 229-236.

Zheng, Y.; Du, X.; Wang, W.; Boucher, M.; Parimoo, S.; Stenn, K. S. Organogenesis From Dissociated Cells: Generation of Mature Cycling Hair Follicles From Skin-Derived Cells *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, 124, 867-876.

[11] Nakajima, R., Tate, Y., Yan, L., Kageyama, T. & Fukuda, J. Impact of adipose-derived stem cells on engineering hair follicle germ-like tissue grafts for hair regenerative medicine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2021, 131, 679-685.

第四章

遠心処理プロセスを用いた毛包原基の調製

4.1 はじめに

前項で示した通り、培養器のマイクロウェル形状を制御することで得られる毛包原基の構造や機能に差が生じることが示された。これはマイクロウェル形状により細胞の集合性が変化するためと推測した。これより細胞の集合性を促進することで、更に構造均一性や機能の高い毛包原基が調製できることが期待される。細胞集合を促進させる1つの手法として遠心処理法が考えられた。先行研究において

96well plate に細胞を播種し遠心処理により短時間でスフェロイドを形成することが示されている。遠心処理以外に化学的手法として基底膜成分抽出物であるマトリゲルを培地に添加して培養する方法が報告されている[1]。

再生医療に適用するにあたり、生物由来原料基準を満たす必要があり、マウス由来のマトリゲルは使用できない。また化学的手法として用いる添加物は細胞への残存も課題となる。

そこで本章では物理的な手法である遠心処理法を検討し、細胞の集合性を制御することで毛包原基の構造均一性や機能に影響があるかを評価することを目的とした。そこで ADSC を用いてマイクロウェル構造を変化させて遠心処理を行い、細胞の集合性を評価した。更に遠心処理を行って毛包原基の形成試験を行い、構造均一性や遺伝子発現評価を行った。

4.2 遠心処理による細胞の集合確認

4.2.1. 本項の目的

本項では ADSC を用いて播種後の遠心処理によりマイクロウェル中への細胞集合が促進されるか評価することを目的とした。

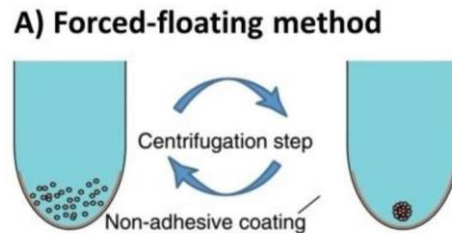


図 4-1 遠心処理を用いたスフェロイド形成法 [1]

4.2.2. 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ 蛍光顕微鏡：キーエンス社製
- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX-71 : OLYMPUS
- ・ 培養顕微鏡, CKX52 : OLYMPUS
- ・ 遠心分離器, LC-230 : トミー精工

【試薬・器具】

- ・ prevelex® CC1 : 日産化学
- ・ SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit : ダウ・東レ
- ・ 脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC) : Promocell
- ・ ウシ胎児血清 : Sigma-Aldrich
- ・ 1%ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン : Thermo Fisher Scientific
- ・ トリプシン-EDTA 溶液 : PromoCell
- ・ 間葉系幹細胞用増殖培地 : mesenchymal stem cell growth medium 2
- ・ リン酸緩衝生理食塩水(PBS) : Sigma-Aldrich
- ・ 24 ウェルプレート, SUMILON # MS-80240 : 住友ベークライト

4.2.3 実験手順

HFG チップの作製

マイクロウェル間の隔壁形状がなだらかタイプ、マイクロウェル深さ 2mm の F、U、P 型の培養器を作製し、prevelex コーティングを行った。

細胞の調整、播種

ADSC を用いてスフェロイド形成試験を実施した。培養 3 日目の細胞を 0.25 % トリプシンで 37 °C、5 分間処理して回収した。作製した培養器に 19×10^4 cells / 200 μ L / 容器で播種した。5 分以内に 1000 rpm、1 分間の遠心分離を行い、顕微鏡観察により細胞の分布を観察した。比較として遠心処理なしの条件での観察を行った。

4.2.4 実験結果と考察

遠心処理による細胞凝集化の検討

U 型タイプの HFG チップに ADSC を播種後、遠心処理 (±) の条件でマイクロウェルの底面と上面に焦点を合わせて観察した。その結果、図 4-2 に示すように遠心処理したサンプルでは細胞はマイクロウェル上面にはほとんど存在せず、ほぼ全ての細胞がマイクロウェル底面に集合した。一方で遠心処理なしの場合はマイクロウェル間の壁の部分を含め全体的に

細胞が分散しており、マイクロウェル底面に細胞が集合している様子は観察されなかった。以上のことから遠心処理プロセスを導入することで、細胞播種直後に細胞を集合させ、細胞同士の相互作用を促進可能と考えられる。

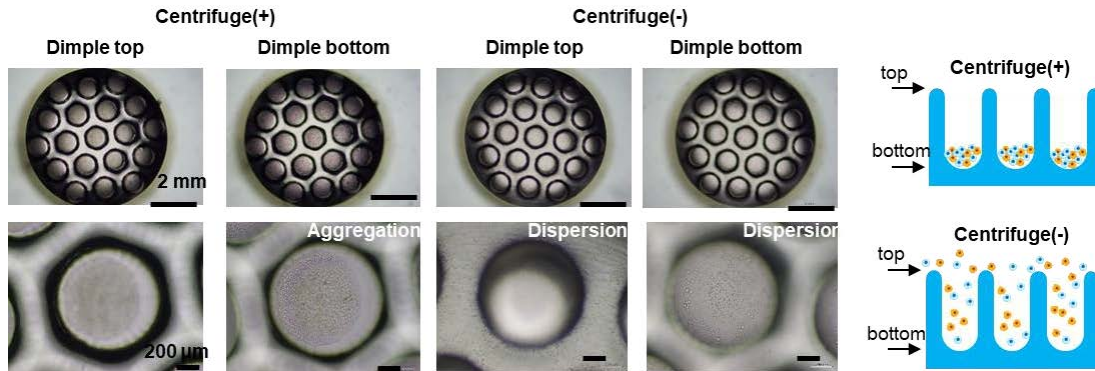


図 4-2 U 型 HFG チップでの遠心処理有無による細胞集合性の違い

続いて、遠心処理した場合のマイクロウェル形状による細胞集合性の差を評価するため、F 型および P 型タイプ培養器で同様の試験を実施した。F 型の場合、遠心処理なしと比較しマイクロウェル上面に存在する細胞が低減し、ウェル底面に細胞が集合している様子が観察された (図 4-3)。これは U 型とほぼ同等の集合性だった。また P 型の場合、遠心処理を行うと、細胞がマイクロウェル底面に集合するだけでなく強く凝集化している様子が確認された (図 4-4)。

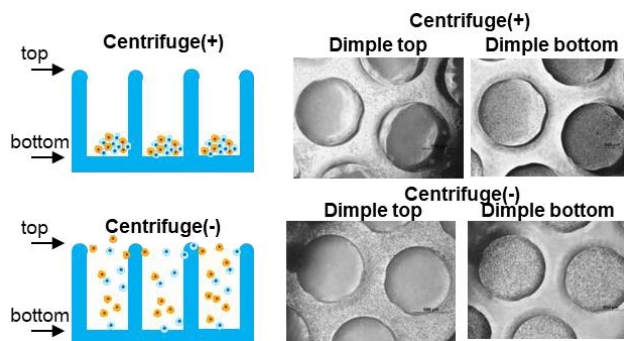


図 4-3 F 底 HFG チップでの遠心処理有無による細胞集合性の違い

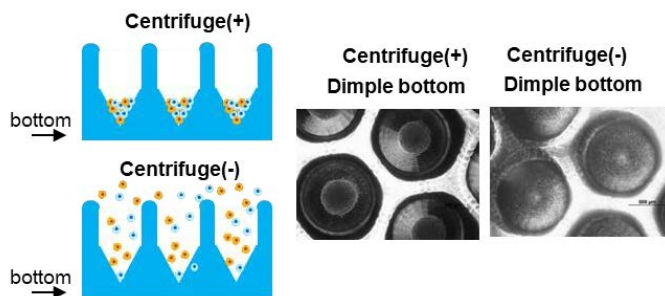


図 4-4 P 型 HFG チップでの遠心処理有無による細胞集合性の違い

4.2.5 本項のまとめ

本項では遠心処理によるマイクロウェルへの細胞集合性を評価した。ADSC を播種後 1000 rpm/1 分間の遠心処理を行うことで細胞がマイクロウェル底面へ集合していることが示された。またマイクロウェルの構造により細胞集合性に差があることが示された。

4.3 遠心処理による毛包原基の形成試験

4.3.1. 本項の目的

本項では、遠心処理有りの条件で毛包原基を形成検討を行い、細胞集合性と毛包原基の形成率の関係を明らかにすることを目的とした。

4.3.2. 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ 蛍光顕微鏡：キーエンス社製
- ・ 遠心機
- ・ 倒立型位相差顕微鏡, IX IX-71 :

OLYMPUSLYMPUS

【試薬・器具】

- ・ 妊娠マウス C57BL/6jcl 胎齢 18 日：日本クレア
- ・ Cell strainers Cell strainers ϕ 40 μ m :
- ・ イソジン：Meiji SeikaMeiji Seika ファルマ
- ・ CORNING
- ・ Collagenase type I : WAKO
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM) : SIGMA
- ・ Dispase II : ROCHE
- ・ 細胞培養ペトリディッシュ (ϕ 40mm) :
- ・ TPP
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high

- | | |
|--|--|
| glucose (DMEM) : SIGMA | • 0.25%トリプシン : Thermo Fisher Scientific |
| • Fetal bovine serum (FBS) : SIGMA | • Phosphate buffered saline (PBS) : Thermo Fisher Scientific |
| • Penicillin -Streptomycin (P/S) : GIBCO | |
| • HuMediaHu-KG2 : KURABO | |

4.3.3 実験手順

細胞採取

マウス胎児より間葉系および上皮系細胞を分離した。

細胞播種

遠心によりそれぞれの細胞を回収し、1:1の割合で培地中に混合したのち作製した PDMS 容器に播種した。培地は間葉細胞培養培地 (DMEM+10 %FBS+1 %P/S) と HuMedia-KG2 の 1:1 混合培地を用いた。播種細胞数、播種数を下記に示す。

播種細胞数は 9.5×10^4 cells/容器 (= 0.5×10^4 cells/マイクロウェル) とした。培地を 100 μ L 添加して泡抜きのため遠心処理(3000 rpm, 1 分間) した。細胞懸濁液を 9.5×10^4 cells / 100 μ L / 容器で播種した。播種後 1000 rpm / 1 分間条件で遠心処理を行った。

観察、形状評価

37 °Cインキュベーターで 3 日間培養し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。形状評価のため、形成した毛包原基を 96well プレートへ移し、蛍光観察を行った。毛包の形状は、既報に従い、ImageJ を用いた画像解析により解析した。

4.3.4 実験結果と考察

遠心処理による毛包原基形成試験

遠心処理による毛包原基形成への影響を評価するため、マイクロウェル形状が F,U,P,V 型の 4 種類の HFG チップへ、マウス皮膚から採取した上皮系および間葉細胞を播種し、遠心処理を行った後に培養し毛包原基を形成させた (図 4-5)。F 型タイプの培養器に関して、遠心処理していない場合は毛包原基はほぼ形成されなかったが、遠心処理した場合は毛包原基様の構造体が形成された。また他のマイクロウェル形状の培養器についても、毛包原基様の構造体が形成していた。

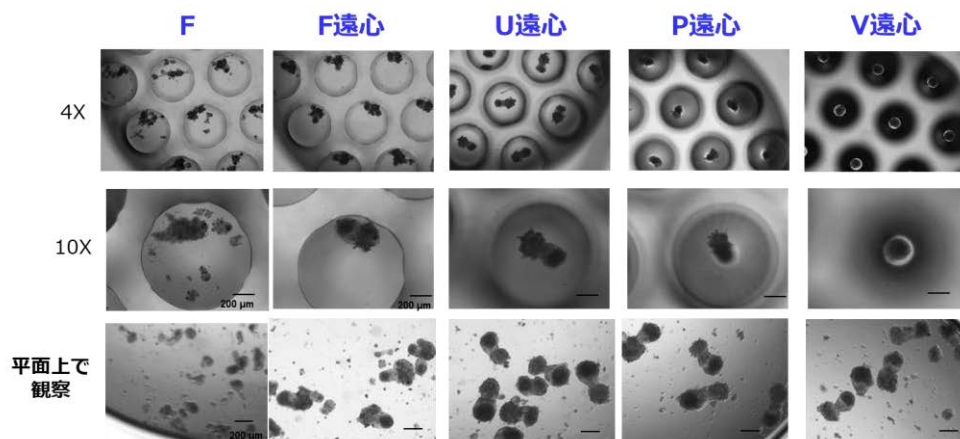


図 4-5 各マイクロウェル培養器で遠心処理した場合の毛包原基形成確認

また 96well プレートに取り出して毛包原基の形成個数をカウントした。遠心処理することで F 底容器においても毛包原基が複数形成された。また U, P, V 型の全ての容器について、遠心処理することで処理なしの場合と比較し、毛包原基の形成率が増加した(図 4-6)。以上より遠心処理することで培養開始直後から細胞が集合し、間葉系細胞と上皮系細胞の相互作用が促進され、細胞選別現象が効率よく進行して毛包原基の形成が促進されたと考察した。

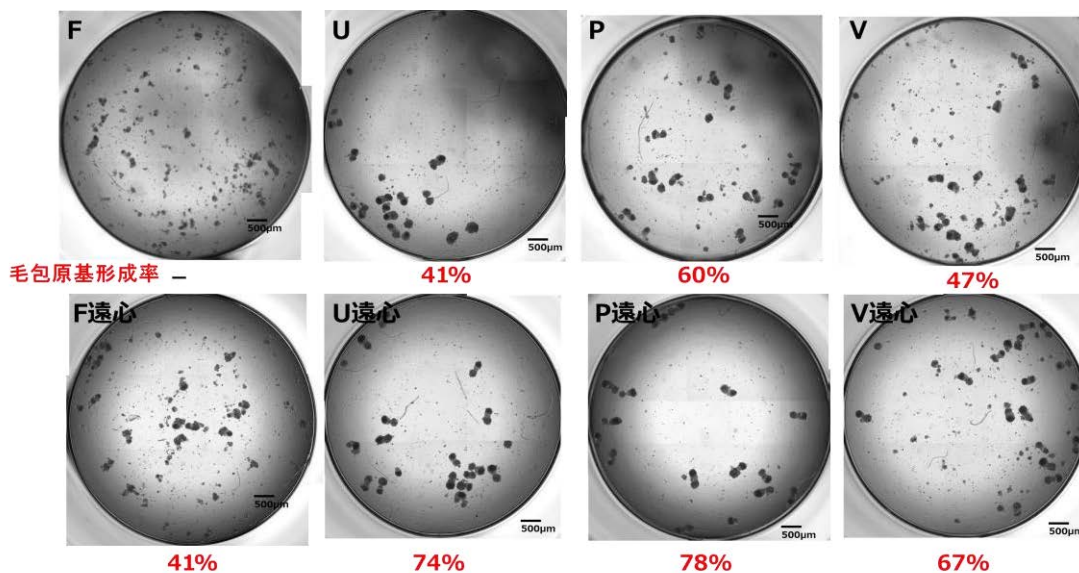


図 4-6 各マイクロウェルでの遠心有無での毛包原基形成個数の確認

毛包原基の構造評価

得られた細胞構造体の均一性を画像解析により評価した（図 4-7）。毛包原基の形成率が高い U 型および P 型で調製した毛包原基で評価を行った。U 型で遠心処理していない場合は $\alpha=0.2$ 付近の毛包原基様の構造以外にも $\alpha=0.4, 0.6$ 付近に異なる形状の構造体が形成していた。一方で遠心処理した場合には毛包原基様の構造が効率よく形成していることが示された。また P 型に関しては遠心処理なしの場合でも構造体の均一性が高く、多くの毛包原基が形成していたが、遠心処理をした場合も同様に均一性の高い毛包原基が形成されたことが示された。

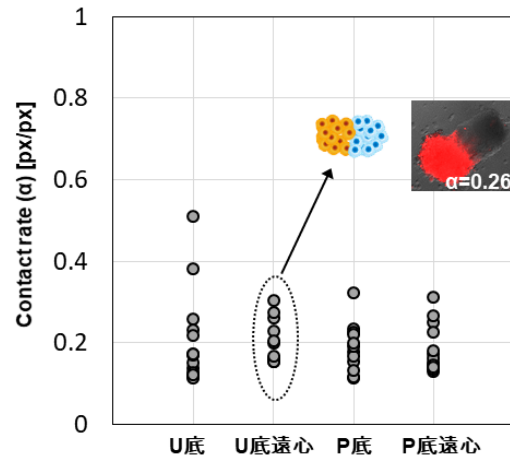


図 4-7 遠心処理により形成した毛包原基の構造解析

第 3 章ではマイクロウェル形状に着目しており、細胞の集合が促進され、かつ培養液の循環を妨げない P 型容器が細胞の集合を促進して毛包原基の形成率が高くなると考察した。一方で遠心処理を用いた場合には、ディンプル形状を P 型とせずに U 型を用いた場合でも、均一性の高い毛包原基を形成出来ることが示された。

4.3.5 本項のまとめ

本項では細胞播種後に遠心処理を行った場合に毛包原基が形成することが示された。全てのマイクロウェル構造で播種直後に遠心処理を行うことで毛包原基の形成個数が増加した。また得られた毛包原基の形状を評価したところ、遠心処理により構造均一性が高くなることが確認された。

4.4 遠心処理による毛包原基の遺伝子発現評価および毛包再生能

4.4.1. 本項の目的

本項では遠心処理を用いて調製した毛包原基の機能評価として、遺伝子発現評価および移植による発毛を確認することを目的とした。

4.4.2. 実験装置及び試薬

【装置】

- ・ 蛍光顕微鏡：キーエンス社製
- ・ Real time PCR system：Step One TM, Applied Biosystems
- ・ 微量サンプル分光光度計：Nano Drop One, Thermo Fisher Scientific
- ・ 冷却遠心機：トミー精工

【試薬・器具】

- ・ 妊娠マウス C57BL/6jcl 胎齢 18 日：日本クレア
- ・ Dulbecco's modified eagle medium high glucose (DMEM)：SIGMA
- ・ Fetal bovine serum (FBS)：SIGMA
- ・ Penicillin-Streptomycin (P/S)：GIBCO
- ・ HuMedia-KG2：KURABO
- ・ 96 well plate：SUMILON
- ・ Buffer RLT
- ・ 70 %エタノール
- ・ Buffer RW1
- ・ Buffer RPE
- ・ RNase free water
- ・ QIA スピンカラム
- ・ RNeasy スピンカラム
- ・ Nuclear free water：Qiagen
- ・ QuickGene：KURABO
- ・ SYBRGreen Real-Time PCR Master Mixes：Thermo Fisher Scientific

4.4.3 実験手順

RT-PCR

マイクロウェル培養器で3日間培養後、3.6.3項と同様の実験手順でRNAを抽出し、逆転写を行った後、RT-PCRにて遺伝子発現解析を行った。Forward Primer、Reverse Primerとして以下の配列を用いた。

	Forward Primer	Reverse Primer
Versican	GACGACTGTCTTGGTGG	ATATCCAAACAAGCCTG
GAPDH	AGAACATCATCCCTGCATCC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
CD34	TGGGTCAAGTTGTGGTGGGAA	AAGAGGCGAGAGAGGAGAAATG

パッチ法での毛包原基の移植試験

3日間培養して毛包原基を作製した。イソフルランによる呼吸麻酔をかけたICRヌードマウス皮下に20 GオフサルミックVランスで移植穴を作製した。1つの移植穴につき各容器で作製した毛包原基を19個をマイクロピペット (20 -0.5 μ L) 移植した。毛包原基を移植した

マウスは、移植28日目に顕微鏡を用いて観察した。

4.4.4 実験結果と考察

遺伝子発現評価

遠心処理（±）の条件で調製した毛包原基を用いて遺伝子発現量を評価した（図 4-8）。ウェル構造が F,U 型の場合、遠心処理を行うことで **Versican** の発現量が増加した。一方で P,V 型の場合は、遠心処理の有無による有意差は見られなかった。前項の結果と合わせると、全ての構造のマイクロウェルにて遠心処理を行うと毛包原基の形成率が増加したものの、**Versican** の発現量は必ずしも関連しなかった。

前項に示した通り F 型や U 型の場合は遠心処理した直後、細胞は集合するものの積極的に凝集化はしない。一方で P 型の場合は遠心処理直後に細胞が集合するだけでなく強く凝集している様子が観察された。よりマイクロウェルの体積が小さい V 型でも同様の現象が起きると想定される。細胞が初期で凝集すると凝集体の内部に培養液の栄養や酸素が供給されづらく形成した毛包原基が十分に成熟しなかったと考察した。

また未分化性の指標となる **CD34** に関しては遠心処理によりマイクロウェル構造に依らず増加する傾向が見られたものの、有意差は確認されなかった。未分化性が一定レベル保たれていることから、毛包原基の形成により未分化性が保持できることが示された。これより移植後に周辺環境の影響を受けて分化が進行し、毛髪再生を誘導する能力があると考えられる。

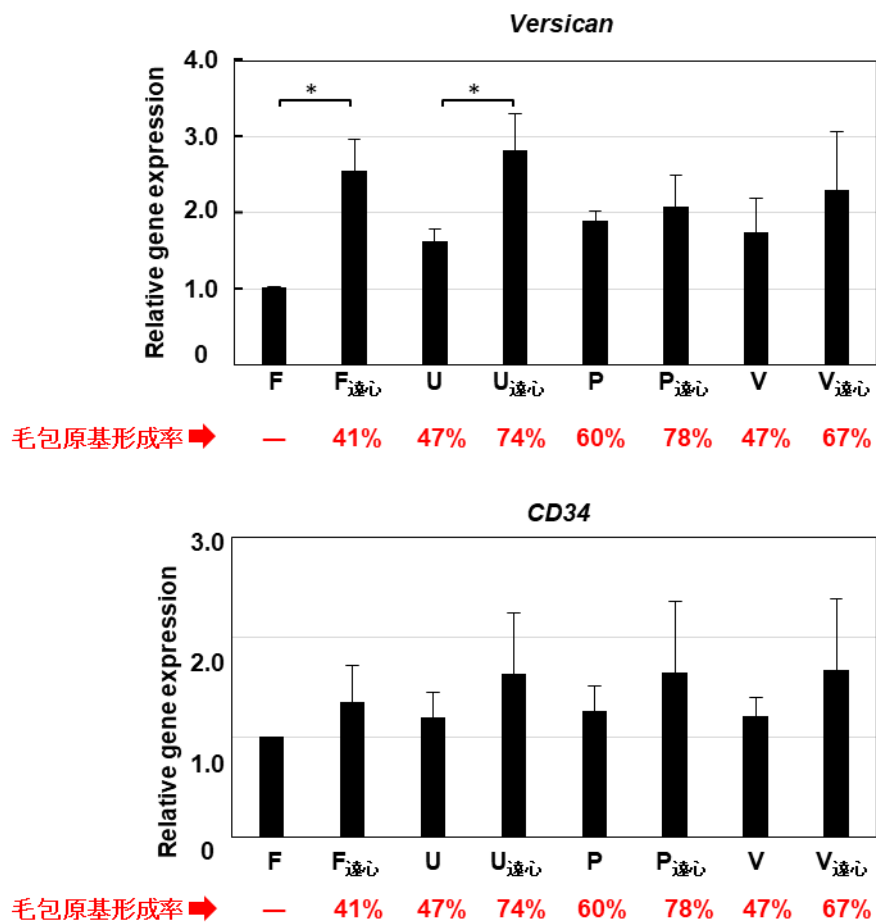


図 4-8 遠心処理により形成した毛包原基の遺伝子発現確認

パッチ法での毛髪再生試験

追記予定。

4.4.5 本項のまとめ

本項では遠心処理して調製した毛包原基の機能評価として、遺伝子発現量の評価及び移植試験を行った。遠心処理により毛包原基の形成率が優位に増加した。一方で遺伝子発現量は毛包原基の形成率と一部相関が取れなかった。遠心処理による細胞の集合と、培養液の供給不足の双方の影響が遺伝子発現に影響を与えたと結論付けた。

4.5 本章のまとめ

本章では、微細加工 PDMS 容器での毛包原基培養への遠心処理法の適用について述べた。遠心処理することで培養初期の細胞集合を促進でき、またマイクロウェルの構造により集合性が異なることを示した。続いて毛包原基の培養時に遠心処理を導入したところ、毛包原基の形成率が優位に増加することが示され、毛包原基の形状均一性が高くなる傾向が確認された。得られた毛包原基の機能評価として遺伝子発現量を評価し、F 型、U 型では **Versican** の発現量が優位に増加することを示した。一方で P 型、V 型では遠心処理をした場合に毛包原基の形成率は増加したものの、**Versican** の発現量に有意差は見られなかった。遠心処理により細胞を集合させることで均一性の高い毛包原基を形成することが可能だが、それと同時に培養液からの栄養供給も考慮する必要があると結論付けた。

参考文献

- [1] Breslin, S.; O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today* 2013, 18, 240-249.

第五章

結論、総括

5.1 本研究の結論と今後の展望

第一章では、再生医療において三次元細胞構造体が重要であることを示し、その中でもスフェロイドやオルガノイド（器官原基）などの細胞凝集塊に着目し、その製造方法に関して整理した。また脱毛症に対する最先端の治療法として期待されている毛髪再生医療のアプローチについて説明した。先行研究の中でも微細加工 PDMS 培養器を用いた毛包原基の大量調整に関する研究に着目し、その課題として再生医療に適用可能な細胞低接着材料の開発および培養器構造最適化であることを指摘した。本課題を解決するために細胞低接着材料の設計にかかわる物性や実例、コーティング方法を示し、また培養器の形状および培養プロセス検討の意義について説明した。以上を以て毛包原基形成用の微細加工培養器の最適化を目的として明示した。

第二章では、本研究の基盤技術の1つとなる細胞低接着コーティング材料について詳しく述べた。本研究では市販品の poly(HEMA)や MPC ポリマーとの比較検討の結果、両性イオンポリマー prevelex を用いることで、高い細胞接着抑制効果が示された。特に微細加工基材に対してもコンフォーマルに極薄膜で塗布が出来、基材本来の特性を保持できる点が優れていた。更に滅菌耐性や保存安定性、安全性の観点からも再生医療分野での使用が可能であることが示された。

第三章では、毛包原基培養用の酸素透過性 PDMS 微細加工培養器の構造について詳しく述べた。マイクロウェルの深さや形状、ウェル間の形状など様々なパラメータを変化させ、細胞凝集塊の形成率等を指標として最適化を行った。その結果マイクロウェルの深さやウェル間形状を決定した。また細胞の集合を促進する Pen 型のマイクロウェル構造とすることで、毛包原基形成率が高くなることを見出した。更に毛包原基形成率と相関して発毛効率の指標となる Versican の発現向上が認められた。更に毛包原基の免疫不全マウスへの移植試験を行い、発毛が確認された。

第四章では、培養プロセスの1つとして細胞の集合を促進する方法として遠心処理法を検討した。そこで遠心処理により細胞の初期集合を促進した場合の毛包原基形成率や遺伝子発現を評価した。その結果、遠心処理をすることで毛包原基の形成率が増加することが見出された。また毛包原基形成率の増加に伴い **Versican** の発現量も増加する傾向が示された一方で、マイクロウェル構造により毛包原基への培地の供給が不十分となると毛包原基の成熟が妨げられ遺伝子発現量が低下することが示された。

今後、ヒトから採取した上皮系細胞と間葉系細胞を用いて、ヒト毛包原基の大量培養について検証する予定である。毛包原基の調製工程以外にも毛包原基を構成する原料となる間葉系および上皮系細胞等の大量調整、毛髪再生効率の向上、毛髪再生時の審美性など解決すべき課題は多く存在する。これらの課題に1つずつ取り組み、高い毛髪再生能を有する毛包原基を大量調整する技術を構築していきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、懇切丁寧なご指導ならびに助言を頂きました横浜国立大学 工学研究科、福田淳二教授に心より感謝致します。

学位審査にあたり、懇切丁寧なご指導ならびに助言を頂きました横浜国立大学 工学研究科、武田 穰 教授、丸尾 昭二 教授、飯島 一智 准教授、新田見 匡 准教授に心より感謝致します。

そして研究全般や研究室活動において助言、協力して下さった皆様、特に景山達斗助教に感謝申し上げます。社会人生活との両立で研究室に頻繁に訪れることが出来なかった中でも温かく接して頂き研究生活を有意義にしてくれた皆様に感謝致します。

最後に、研究に専念できる生活環境を与え、温かく見守ってくれた家族、友人、同僚に心から感謝致します。

2022年9月 鈴木康平

業績リスト

(1) 学術雑誌等に発表した論文(査読あり 2 報)

- 1) **K. Suzuki**, Y. Hiroi, N. Abe-Fukasawa, T. Nishino, T. Shouji, J. Katayama, T. Kageyama, and J. Fukuda, Cell-repellent polyampholyte for conformal coating on microstructures. **Scientific Reports**, 2022, 12, 10845..
- 2) **K. Suzuki**, Y. Hiroi, T. Kageyama, and J. Fukuda, Optimized microwell array device for preparation of hair follicle germ-like aggregates. **AATEX**, (6/13 accepted).

(2) 特許(申請中1件)

[1] 特願 2022-042418, 出願人：横浜国立大学, 発明者：鈴木康平、広井佳臣、福田淳二