

# 福岡工業大学 学術機関リポジトリ

## ナノシート液晶/高分子複合異方性ゲル上での細胞培養

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-12-19 キーワード (Ja): キーワード (En): anisotropic gel, liquid crystal, cell culture 作成者: 宮元, 展義, 稲富, 巧, 桑原, 順子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11478/00001737">http://hdl.handle.net/11478/00001737</a>

# ナノシート液晶/高分子複合異方性ゲル上での細胞培養

宮元 展義 (工学部生命環境化学科)

稲富 巧 (工学部生命環境化学科)

桑原 順子 (工学部生命環境化学科)

## Cell Culture on Anisotropic Gel Films of Liquid Crystalline Nanosheet/Polymer Nanocomposite

MIYAMOTO Nobuyoshi (Department of Life, Environment and Applied Chemistry, Faculty of Engineering)

INADOMI Takumi (Department of Life, Environment and Applied Chemistry, Faculty of Engineering)

KUWAHARA Junko (Department of Life, Environment and Applied Chemistry, Faculty of Engineering)

### Abstract

The techniques to assemble cells into desired integrated shapes, that is known as 'tissue engineering', is important for regenerative therapies. Especially, anisotropic structure formation is key for many applications. Here, anisotropic nanocomposite hydrogel film that consist of liquid crystalline fluorohectorite nanosheets and poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAm) was investigated as the cell culture medium. Melanoma cells cultured on a glass plate or a polystyrene plate possessed spherical shape with the size of around 10  $\mu\text{m}$ , which is generally found for melanoma cells. In contrast, the melanoma cells cultured on the pNIPAm and FHT/pNIPAm composite hydrogels possessed elongated shapes with the length of more than 50  $\mu\text{m}$ , indicating strong adhesion to the gel. Based on the present results, future development of a facile tissue engineering technique for anisotropic cell assembly is expected.

**Keywords** : anisotropic gel, liquid crystal, cell culture

### 1. 緒言

細胞培養技術はウイルスワクチンの製造、バイオ医薬品、再生医療などにおいて、重要で不可欠なものとなっている。特に、再生医療では単に細胞を培養するだけでなく、細胞を組織化してシート形状や生体組織の形状にする「ティッシュエンジニアリング」が重要であり、そのために様々な手法が提案されている<sup>1</sup>。

岡野らは<sup>2</sup>、温度応答性ポリマーであるポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド (pNIPAm) ヒドロゲルを活用することによって高品質の「細胞シート」を得る技術を開発した。pNIPAm は、低い温度では親水性であるが、37°C以上では疎水性となる。細胞に適合する温度領域で物性が変化することを利用して、ゲル膜表面での培養後に温度を変化させることで、細胞シートを無傷で基材から剥離して回収することができる。これに対して、通常の培養皿などで細胞を培養した場合、細胞をシート状に培養できたとしても、タンパク分解酵素で培養皿から剥離して回収する際に形状が保たれないことになる。このような細胞シートは、すでに心臓、肺、角膜などさまざまな臓器の再生医療に有効であることが実証され、更なる発展が望まれている。

このような高分子ゲルを活用した細胞培養技術は、高分子ゲル素材自体を改良するという観点から、さらなる高度化が期待される。原口らは、pNIPAm とヘクトライトナノシートを複合化することで、元来脆弱な pNIPAm ゲルの力

学物性を著しく向上できることを明らかにした<sup>3</sup>。さらには、ヘクトライトナノシートが有する負電荷によって、細胞の付着性が向上し、細胞培養の足場材料としての有用性がさらに向上することを報告した<sup>4</sup>。

一方、我々は、液晶状態となっている無機ナノシートが cm スケールで巨視的に配向し、pNIPAm ゲル中に分散して固定化されたナノシート液晶/pNIPAm ナノコンポジットゲルを世界で初めて報告した<sup>5</sup>。種々の検討を進めた結果、ゲルのマクロスコピックな構造異方性に起因して、異方的な物質拡散<sup>5,6</sup>、異方的な力学物性<sup>7</sup>、光や熱の刺激による異方的な変形<sup>8</sup>などの特異な挙動が確認されてきた。そこで、我々は、このような異方性ゲルを、細胞培養の基材として用いることで、ナノシートの配向方向に沿った異方的な形状の細胞組織体が得られるのではないかと発想を得た。生体内では例えば肝臓、腱、靭帯などは細胞が異方的に組織化された線維構造を有しており、これが生体機能発現に寄与している。再生医療の分野において細胞組織の配向制御は極めて重要である。また、細胞ベースの人工デバイス作成などへの応用も期待され、例えば、配向制御された心筋細胞組織を簡易に作成できれば、細胞ベースのアクチュエータデバイスへの応用も可能となる。

本研究ではこのような研究に向けた基礎的知見を得るため、pNIPAm と液晶性ナノシートが複合化されたゲル膜上での、細胞の培養を試みた。細胞としては、取り扱いが容易で増殖速度も早いメラノーマ細胞を用いた。

## 2. 実験方法

まずナノシート液晶と複合化された pNIPAmゲルを、既報に従って合成した<sup>8</sup>。モノマーには *N*-イソプロピルアクリルアミド(NIPA; 和光)を用い、使用の前にトルエン/ヘキサン混合溶液からの再結晶によって、重合禁止剤を除去した。化学架橋剤 *N,N*-メチレンビスアクリルアミド(和光)と光重合開始剤 2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオフェノン(Sigma)は、そのまま用いた。ナノシート液晶であるフルオロヘクトライト/水コロイドは、トピー工業製の合成粘土鉱物フルオロヘクトライトが水に分散したコロイド (NHT-sol-B2)を遠心分離によって精製し、石英などの不純物を除去することで得た<sup>9</sup>。次に、モノマー0.73 g、化学架橋剤 0.01 g、光重合開始剤 10  $\mu$ L、ナノシート液晶 10 g を混合し、1時間攪拌した。その後、ガラス板とシリコンゴムからなる型枠に混合液を封入し、紫外光照射を行うことで重合と架橋の反応を進行させた。これらにより、ナノシート液晶成分であるフルオロヘクトライトを 1 重量%含有する、ナノシート液晶/pNIPAm 複合ゲル膜を得た。

メラノーマ細胞は、JCRB 細胞バンクの B16 melanoma (JCRB0202)を用いた。急速解凍した  $2.0 \times 10^4$  個/mL の細胞を含む細胞液 1 mL と、10% の fetal bovine serum (FBS) を含む 37  $^{\circ}$ C の Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM)培養液 1 mL を混合し、1200 rpm で 5 分遠心分離した後、上澄みを取り除いた。遠心分離・上澄み除去はもう一度繰り返した。その後、再度 E-MEM 培養液を加えて懸濁液とした。

次に、ポリスチレン製培養皿に pNIPAmゲルまたはナノシート液晶/pNIPAmゲルを敷き、その上に細胞の懸濁液を播種した。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>の環境下で 4 日間培養した。この間、1 日おきに培地交換した。比較のため、培養皿のみまたは、ガラス板上での培養も試みた。各ゲルは、事前に 121  $^{\circ}$ C・20 分間の条件でオートクレーブ滅菌し、その後 E-MEM 培養液に浸漬させることで、ゲル内に培養液成分を導入した。培養の様子は、光学顕微鏡 (Olympus LH50A) により観察した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. ガラス基板及びポリスチレンシャーレ上での培養

まず、細胞の培養条件を確認し、またゲル膜上での培養との比較対象とするため、ガラス板上および、ポリスチレンシャーレ上でのメラノーマ細胞の培養を試みた。ガラス基板上 (図 1) では、10  $\mu$ m 程度の大きさの球状の細胞が観察され、4 日経過後には、細胞の数が増加していることが確認された。ポリスチレンシャーレ上でも (図 2)、同様の形状・大きさの細胞が確認された。これらは、一般に報告されているメラノーマ細胞の特徴と一致していた。細胞数の増加は、

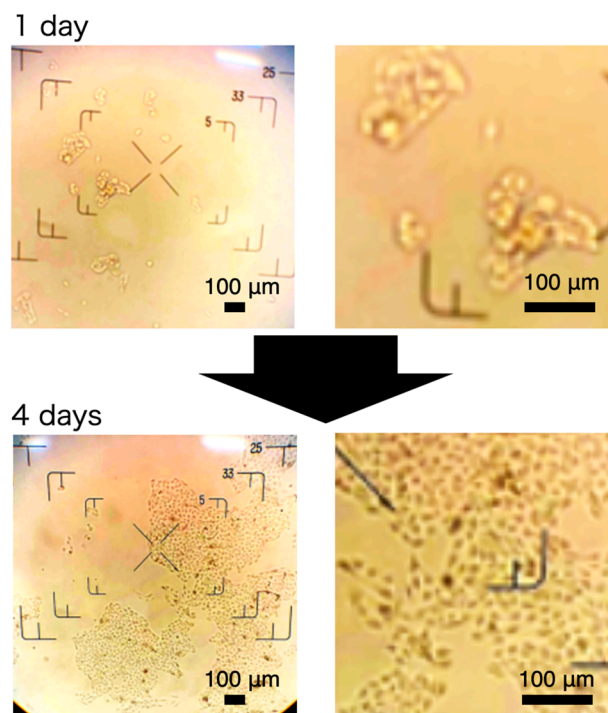


図 1. ガラス板上で 1~4 日培養したメラノーマ細胞の光学顕微鏡像。右列は、拡大図。

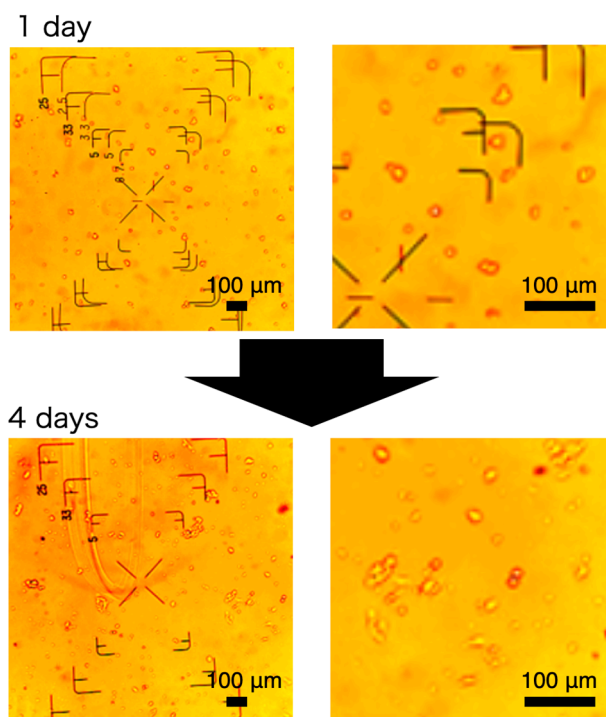


図 2. ポリスチレンシャーレ上で 1~4 日培養したメラノーマ細胞の光学顕微鏡像。右列は、拡大図。

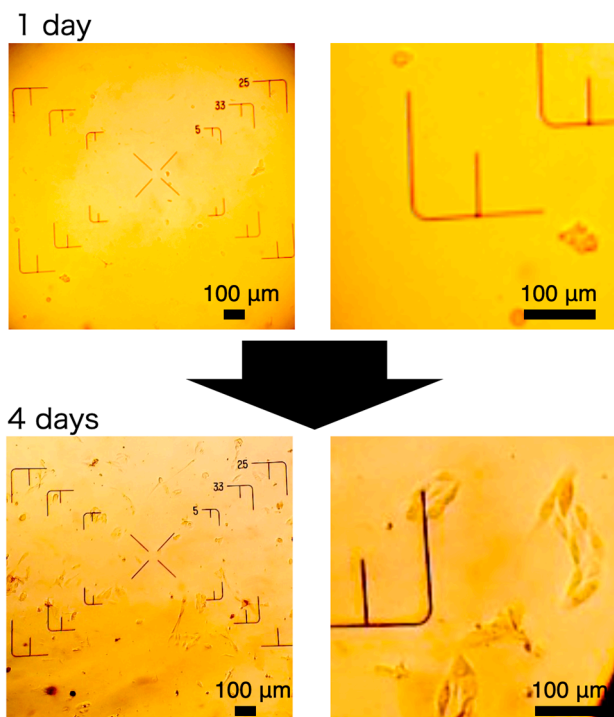


図 3. ナノシート液晶/pNIPAm ナノコンポジットゲル膜上で 1~4 日培養したメラノーマ細胞の光学顕微鏡像。右列は、拡大図。

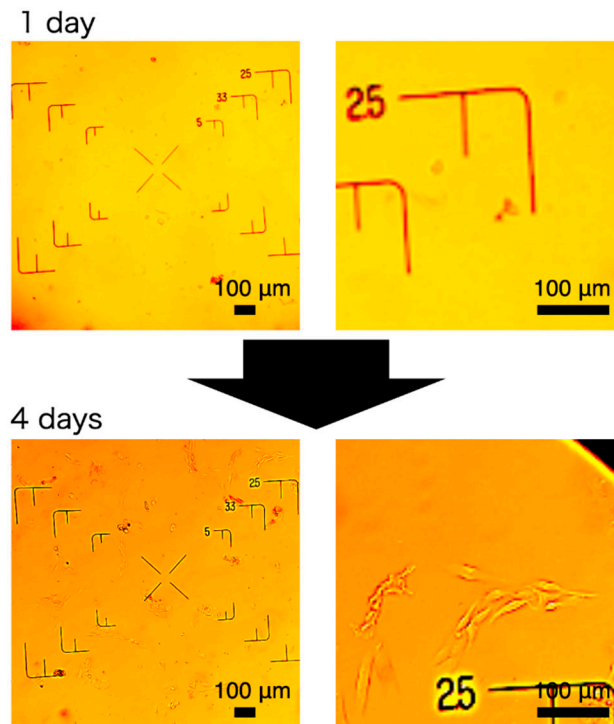


図 4. pNIPAm ゲル膜上で 1~4 日培養したメラノーマ細胞の光学顕微鏡像。右列は、拡大図。

ガラス基板の場合よりもポリスチレンシャーレの方が少なかった。

### 3.2. pNIPAm ゲルおよびナノシート液晶/pNIPAm ナノコンポジットゲル上での培養

次に、2種類のゲル膜状での細胞培養を行った。図3に、ナノシート液晶/pNIPAmナノコンポジットゲル膜上で培養したメラノーマ細胞の顕微鏡像を示した。培養1日目では10 μm程度の球状のメラノーマ細胞がまばらに存在している。4日目になると、細長い形状の細胞が多数観察され、また大きさも50 μm以上のものが観察された。一方、ナノシート液晶を含まないpNIPAmゲルを用いた場合(図4)も、ほぼ同様の結果となった。以上の結果より、ナノシートは、細胞毒性を有しておらず、培養に悪影響を与えることが明らかとなった。

メラノーマ細胞は、一般的には球状であるが、培養基材に接着して成長すると細長い形状になることが知られている。本系では、ナノシート液晶/pNIPAmナノコンポジットゲル上およびpNIPAmゲル上での培養では、長細い形状の細胞が観察されたことから、pNIPAmゲルはガラスやポリスチレンに比べて、メラノーマ細胞の接着性が高く培養に適していることがわかった。

## 4. 結論

液晶性無機ナノシートとpNIPAmが複合化されたナノコンポジットゲル上での細胞培養に初めて成功した。ナノシートが細胞培養に悪影響を与えないことが明らかとなった。また、ガラスやポリスチレンを基材として用いた培養に比べ、細胞とゲルの接着性が高く、得られる細胞の形状も異なることが示された。今後、異方的な構造を持つ細胞シートを簡便に作成するための新しいティッシュエンジニアリング手法としての発展が期待される。

## 5. 謝辞

本研究の一部は、福岡工業大学総合研究機構(科研費リトライ支援制度)および物質エネルギーデバイス研究センター(文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業#S1511036L)の支援を受けて実施されました。ここに記して、御礼申し上げます。

## 文 献

- (1) Shimizu, T., Development and Future of Cell Sheet-Based Tissue Engineering. *Drug Delivery Systems*, 36-1, 18-27 (2021).
- (2) Yamada, N.; Okano, T.; Sakai, H.; Karikusa, F.; Sawasaki, Y.; Sakurai, Y., Thermo-responsive polymeric surfaces: control of attachment and detachment of cultured cells. *Macromol. Chem., Rapid Commun.*, 11, 571-576 (1990).

- (3) Haraguchi, K.; Takehisa, T., Nanocomposite Hydrogels: A Unique Organic-Inorganic Network Structure with Extraordinary Mechanical, Optical, and Swelling/De-swelling Properties. *Adv. Mater.*, *14*, 1120-1124 (2002).
- (4) Haraguchi, K.; Takehisa, T.; Ebato, M., Control of Cell Cultivation and Cell Sheet Detachment on the Surface of Polymer/Clay Nanocomposite Hydrogels. *Biomacromolecules*, *7*, 3267-3275 (2006).
- (5) Miyamoto, N.; Shintate, M.; Ikeda, M.; Hoshida, Y.; Yamauchi, Y.; Annaka, M., Liquid Crystalline Inorganic Nanosheets for Facile Synthesis of Polymer Hydrogels with Anisotropies in Optical Property, Structure, Swelling/Deswelling, and Ion Transport/Fixation. *Chem. Commun.*, *49*, 1082-1084 (2013).
- (6) Shintate, M.; Inadomi, T.; Yamamoto, S.; Kuboyama, Y.; Ohsedo, Y.; Arimura, T.; Nakazumi, T.; Hara, Y.; Miyamoto, N., Anisotropic self-oscillating reaction in liquid crystalline nanosheets hydrogels. *J. Phys. Chem. B*, *122*, 2957-2961 (2018).
- (7) Inadomi, T.; Urayama, K.; Miyamoto, N., Unusual actuation of precisely designable two-layer poly(N-isopropylacrylamide) gel films composited with asymmetrically aligned liquid crystalline nanosheet. *ACS Appl. Polym. Mater.*, published online (2022).
- (8) Inadomi, T.; Ikeda, S.; Okumura, Y.; Kikuchi, H.; Miyamoto, N., Photo-Induced Anomalous Deformation of Poly(N-Isopropylacrylamide) Gel Hybridized with an Inorganic Nanosheet Liquid Crystal Aligned by Electric Field. *Macromol. Rapid Commun.*, *35*, 1741-1746 (2014).
- (9) Miyamoto, N.; Iijima, H.; Ohkubo, H.; Yamauchi, Y., Liquid crystal phases in the aqueous colloids of size-controlled fluorinated layered clay mineral nanosheets. *Chem. Commun.*, *46*, 4166-4168 (2010).