

■報告書■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## 生体工学のための感光性表面修飾剤の開発

山口和夫<sup>1,4</sup> 前田瑞夫<sup>2</sup> 横山昌幸<sup>3</sup>

### Development of Photosensitive Surface Modifying Agents for Bioengineering

Kazuo Yamaguchi<sup>1,4</sup>, Mizuo Maeda<sup>2</sup> and Masayuki Yokoyama<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293

<sup>2</sup> Bioengineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198

<sup>3</sup> Kanagawa Academy of Science and Technology, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012

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

**Abstract:** The caged cell-culturing substrate is composed of a glass substrate coated with an alkylsiloxane monolayer having a photocleavable 2-nitrobenzyl group. In the present study, we examined the effect of terminal functional groups on the efficiency of photoactivation for cell adhesion. Among four tested substrates terminating with different functional groups, the photoactivation of cell adhesion was the most effective on that terminating with an amino group. We succeeded in preparing single-cell arrays on this substrate without using fibronectin.

**Keywords:** photosensitive silane coupling agent, 2-nitrobenzyl ester, self-assembled monolayer, surface modification

#### 序論

我々はこれまでに、光分解性の 2-ニトロベンジルエステルで保護したシランカップリング剤 **1** を合成し、無機材料表面への修飾、光照射を行い、カルボキシ基の導入を接触角、XPS の測定などにより確認している<sup>1,2)</sup>。さらに **1** で処理して得られるガラス基板上の感光性単分子膜を用いて、標準的な蛍光顕微鏡下で細胞接着性を制御する方法を開発している<sup>3)</sup>。この方法では、基板表面に吸着させた細胞接着を抑制するウシ血清アルブミン (BSA) を、2-ニトロベンジルエステルの光分解によって表面から解離させ、露出したカルボキシ基に細胞接着を促進させるフィブロネクチン (FN) を吸着させることで表面を細胞接着性へと変換する。本研究では Fig. 1 に示すように、FN を用いることなく細胞接着性を制御する方法を開発することを目的とする。感光性シランカップリング剤として、光照射によりカルボキシ基、アミノ基、チオール、ヒドロキシ基を表面に露出する

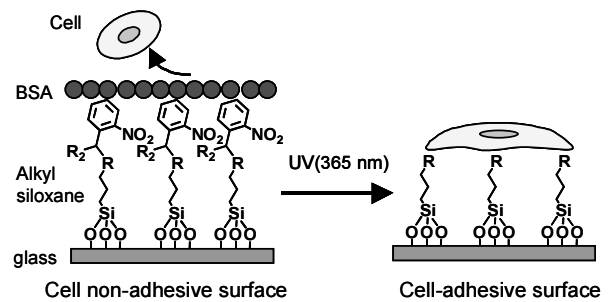
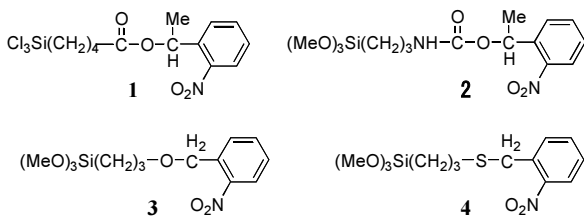


Fig. 1. Schematic illustration of photoactivation of cell adhesion.

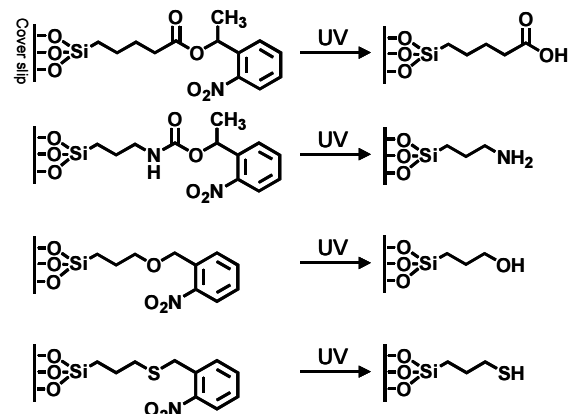
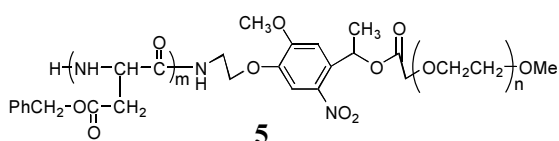


Fig. 2. Photoactivation of alkylsiloxanes having caged functional groups used in this study.

1-4 で修飾した基板を用いて検討した (Fig. 2)。

親水性、疎水性成分からなる両親媒性ブロック共重合体は、細胞接着性を制御する表面修飾剤として用いられており、さらに疎水性あるいは親水性薬物を内包できるポリマーミセルやポリマーソームなどの薬物送達システム (DDS) としての利用も検討されている。本研究では、光分解性基で連結された両親媒性ブロック共重合体の合成を試みた。このような共重合体を得られれば、上記のシランカップリング剤に代わる細胞接着性を光で制御する新たな表面修飾剤として期待されるだけでなく、光で放出を制御する新しい DDS の構築も可能であると予想される。本研究では、親水性成分としてポリエチレンオ



キシド (PEO)、疎水性成分としてポリベンジルアスパルテートを連結させたブロック共重合体 **5** の合成を試みた。両成分を直接連結させたブロック共重合体は、薬物を内包するポリマーミセルを形成し、DDS としての実用化が検討されているものである<sup>4)</sup>。

## 材料と方法

### 1-4 で修飾した基板を用いた一細胞アレイの作製

1-4 のベンゼン溶液にガラス基板を投入し、1 時間還流させ修飾ガラス基板を得た。修飾基板を 10mg/mL の BSA 水溶液に 1 時間浸漬後、波長 365 nm の光を 10 秒間照射した。無血清培地中でサル腎臓由来 COS7 細胞を播種し、30 分後に培地交換して細胞を観察した。光照射領域は、OHP シートに印刷したフォトマスクを蛍光顕微鏡の視野絞りに挿入することで制御した。

### 光分解性ブロック共重合体 **5** の合成

Scheme 1 に示す方法で、合成を行なった。

## 結果と討論

### 1-4 で修飾した基板を用いた一細胞アレイの作製

COOH 基、NH<sub>2</sub> 基、SH 基、OH 基を露出する 1-4 で修飾したガラス基板に対して円形領域に光照射を行って COS7 細胞の接着性の光変換効率を比較した。その結果、NH<sub>2</sub> 基を露出する基板のみで光照射領域に対応した細胞接着が確認された (Fig. 3)。

この NH<sub>2</sub> 基を露出する基板を用いて一細胞アレイを作製した。細胞を接着させるアレイスポットの大きさと細胞播種濃度について最適条件を探索した。

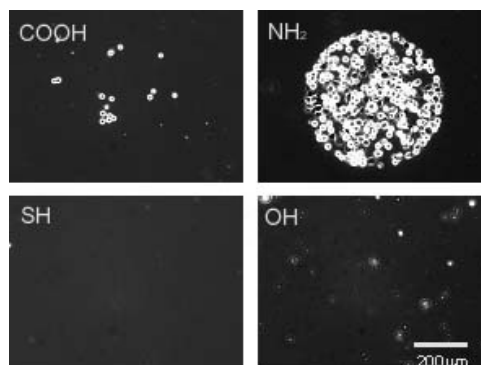


Fig. 3. Formation of cell-adhesive spots in response to light on the alkylsiloxanes having caged functional groups.

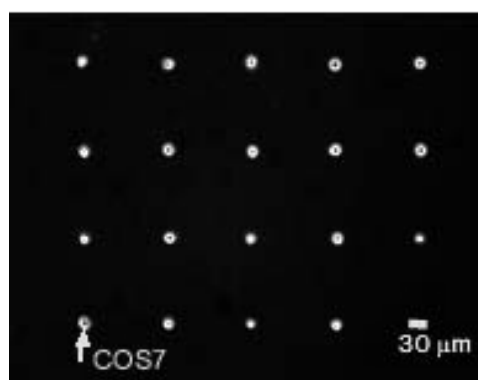


Fig. 4. A single-cell array of COS7 cells on a substrate having caged amino groups.

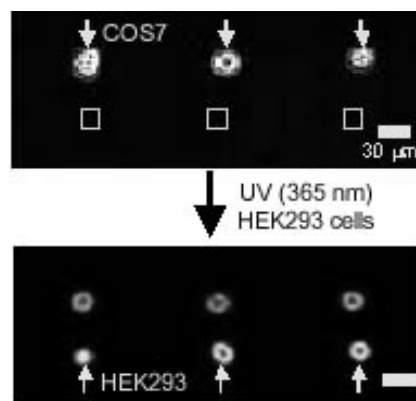


Fig. 5. Positioning of HEK293 cells in the proximity to COS7 cells. Squares represent the irradiated regions.

その結果、1つのスポットサイズが 18 μm × 18 μm、細胞播種濃度が 8 × 10<sup>5</sup> 個/ml の場合に、光照射したスポットの大部分に一細胞が接着することが明らかになった (Fig. 4)<sup>5)</sup>。

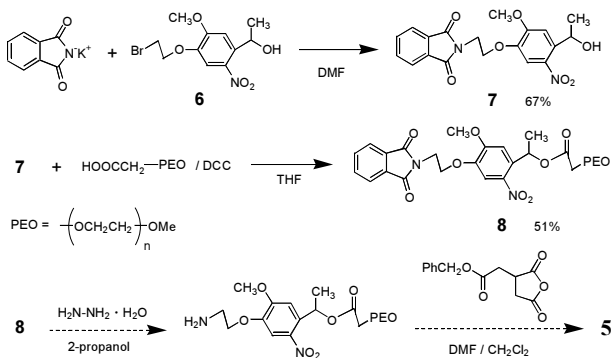
続いて、上記の方法で作製した COS7 細胞アレイの近接した領域に再び光照射を行い、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞を新たに播種した。その結果、一細胞のすぐ横に異種の一細胞を配置することに成功した (Fig. 5)。原理的には、この操作を繰り返すこと

で、同一基板上で多種類の細胞を共培養した細胞アレイを作製することが可能である。

### 光分解性ブロック共重合体 5 の合成

Scheme 1 に示すように、5 段階の反応によって合成した 6 に対し、フタルイミドカリウムを反応させ 7 を 67% の収率で得た。さらに DCC を縮合剤として末端にカルボキシ基をもつポリエチレンオキシドを反応させ、収率 51% で 8 を得た。さらに 2 段階の反応による 5 の合成を検討している。

Scheme 1



### 結論

光分解によって  $\text{NH}_2$  基を露出する基板は、FN の添加を必要とせずに細胞接着領域を形成することが

できるため、これまでに報告した手法より短時間で簡単に細胞アレイを作製できることが明らかになった。本手法は、ユーザーの目的に応じた細胞アレイを蛍光顕微鏡のみを用いて自在に作製できるので、汎用性の高い細胞アレイ作製法として期待できる。

### 文献

- 1) Yamaguchi K, Kitabatake T, Izawa M, Fujiwara T, Nishimura H and Futami T (2000) Novel Silane Coupling Agents Containing a Photolabile 2-Nitrobenzyl Ester for Introduction of a Carboxy Group on the Surface of Silica Gel. *Chem. Lett.* **2000**: 228-229.
- 2) Nakayama H and Yamaguchi K (2003) Controlled Surface Properties of Photoreactive Monomolecular Layers Containing Nitrobenzyl Ester. *Polym. Prep. Jpn.* **52**: 820.
- 3) Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K and Maeda M (2004) Photoactivation of a Substrate for Cell Adhesion under Standard Fluorescence Microscopes. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 16314-16315.
- 4) Opanasopit P, Yokoyama M, Watanabe M, Kawano K, Maitani Y and Okano T (2005) Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J. Controlled Release* **104**: 313-321.
- 5) Kikuchi Y, Nakanishi J, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K, Yoshida Y and Maeda M (2005) Preparation of single-cell arrays on caged cell-culturing substrates. *Polym. Prep. Jpn.* **54**: 4998.