

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」  
平成 14 年度採択研究代表者

下村 政嗣

(北海道大学電子科学研究所 教授)

「高分子の階層的自己組織化による再生医療用ナノ構造材料の創製」

## 1. 研究実施の概要

本研究は、ボトムアップナノテクノロジーにおいて自己組織化手法が有効であることを実証するために、ナノ構造を有する高分子微粒子ならびに高分子薄膜を作製し、さらにそれらを複合化することで階層構造を特徴とする医療材料を作製するものである。これらを実現するにあたり、(1)粒子ならびに規則構造体の作製、(2)それらの構造解析、(3)自己組織化過程の理論的アプローチ、(4)医療デバイス化に向けた細胞培養条件の確立、を主たる研究課題とする分野横断的な研究チームを構成した。これまでの研究において、非平衡開放系現象を用いることで、ハニカム状高分子フィルムとナノ構造を有する高分子微粒子を作製した。また、ハニカムフィルムが細胞の形態、分化、機能を制御することを見出した。本年度は、(1)ハニカム構造が細胞増殖、細胞接着に関与しているサイエンスの解明、(2)血管新生の足場となる組織工学材料(ナノ集積体)を目指した多種多様な機能を有するナノ微粒子の作成と階層的集積・構造化、を行った。

## 2. 研究実施内容

### (1) 血管内皮細胞の初期伸展に及ぼすハニカムフィルム細孔径の影響に関する検討

生体類似機能を持つ血管組織再生場のデザインにおいて基本的に重要な、「ハニカムフィルムの規則構造を細胞がどのように認識するのか」を明らかにすることを目的として、細胞接着性タンパク質を除いた培養条件(無血清培地)で血管内皮細胞の培養初期の伸展挙動を調べた。細孔径 3, 6, 及び 16 ミクロンのポリカプロラク톤のハニカムフィルム上にブタ大動脈血管内皮細胞(PAEC)を播種し、37 °C、5 % 炭酸ガス雰囲気中で培養した。共焦点レーザー顕微鏡による細胞膜及び骨格タンパク質(アクチン)の観察を行い、細胞の伸展形態に対するフィルム細孔径及び培養時間の影響を調べた。図1に培養1時間に於ける伸展形態の細孔径依存性を示す。細孔径6 ミクロン、16 ミクロンのフィルム上では細胞は仮足(フィロポディア、図中の三角矢印)をフィルム幹上に伸ばしながら伸展し、細孔位置に細孔径に等しい孔を持つ形態を示した(図1b)。培養時間とともに、仮足で囲まれた孔は減少した。一方、細孔径 3 ミクロンのフィルムでは平膜上と同様、細胞周囲は細い仮足で縁取られてはいるものの、仮足で囲まれた孔を持つ伸展形態は観察されなかった。

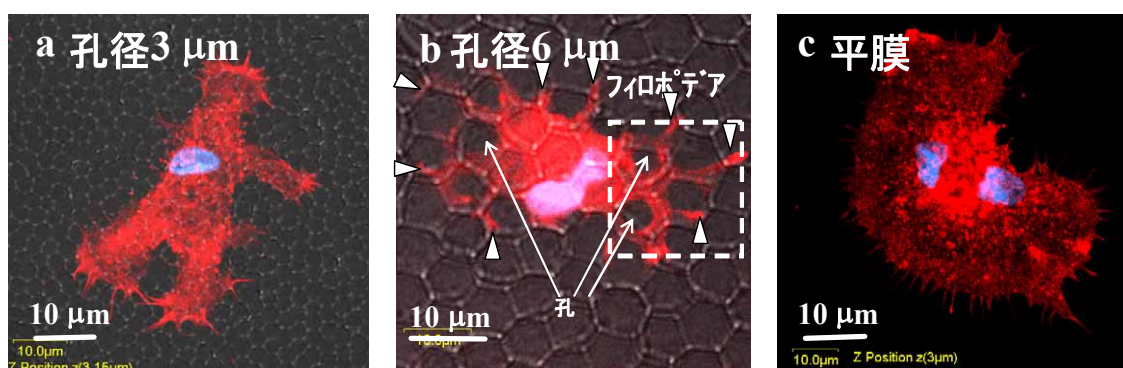


図1 培養1時間後の細胞接着形態

本実験において、ハニカムフィルム上において血管内皮細胞が特異的な伸展挙動をしめすことを明らかにした。細胞はフィルム細孔の構造、細孔サイズを識別しながらダイナミックな細胞膜の変化を行いながら伸展していると考えられる。

## (2) ハニカムフィルム表面の水の構造の検討

ハニカムフィルム表面の水はその生体適合性に大きな影響をもたらす。界面選択的な振動分光法の一つである界面和周波発生(SFG)分光法を用い、平膜およびハニカムフィルム表面の水の構造をした。ハニカム状多孔質構造を持たない薄膜表面およびハニカム構造を持つ薄膜表面の SFG スペクトルには、3000~4000 カイザー領域に界面水の OH 伸縮振動に由来するピークが観測された。3200 カイザー付近のピークは”ice like”と呼ばれる水素結合が強い水に帰属され、3400 カイザー付近のピークは”liquid like”と呼ばれる水素結合が弱い水に帰属される。ハニカムフィルム表面では、通常の界面水の OH 伸縮振動では観測されることのないピークが 3700 カイザー付近に観測された。高波数側に観測されたことから水素結合ネットワークを形成しない孤立した水分子の OH に由来するものと考えられ、ハニカムフィルムの細孔内に存在する水によるものであることが示唆された。

## (3) 自己組織化プロセスによって作製した高分子ナノ粒子の内部構造の検討

すでに、ブロック共重合体の溶液に貧溶媒を加え良溶媒を蒸発させることにより、内部に相分離構造を持つ微粒子が作製できることを見いだしている。そこで、ブロック共重合体微粒子のより詳細な内部・表面構造観察およびポリマーブレンド系における内部構造制御を行った。微粒子の内部構造を詳細に観察するため、ポリ(スチレン-*b*-イソプレン)微粒子を四酸化オスミウムで染色した後にエポキシ樹脂に包埋し、ウルトラマイクロームで切片を作製した。透過型電子顕微鏡で観察すると、一軸方向に配列した縞状構造と同心円状の2種類の断面構造がみられた(図2)。微粒子分散液を種々の温度でアニーリングした結果、温度上昇に伴い縞状構造から同心円状構造に相転移することが明らかとなった。

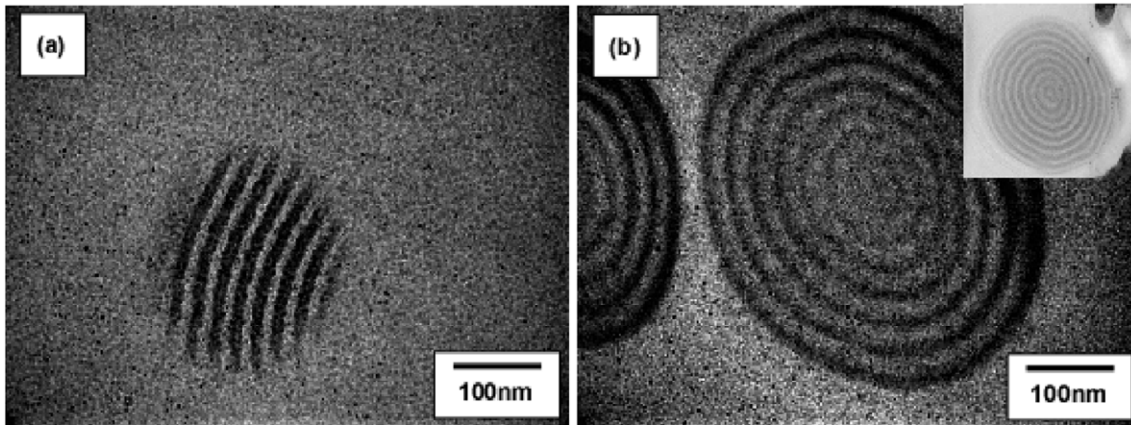


図2 ブロック共重合体ナノ微粒子内部の構造

さらに、ポリスチレンおよびポリイソプレンのホモポリマーを混合した溶液から微粒子を作製すると、混合比率に応じた内部相分離構造を有する“ヤヌス微粒子”が形成されることを見いだした。

また、微粒子の機能化を目的として、DNA1分子からなるナノ粒子の作製に成功した。これらの微粒子は薬剤取り込み能が期待され、細胞培養の足場としての可能性を有する。

#### (4) 自己組織化の数理モデルに関する検討

生体の自己組織化機能を利用する毛細血管新生に関する研究に着手、毛細血管網の新生を迅速に誘導するために必要な初期条件および境界条件を数値計算によって探ることとした。血管の進展具合が誘導物質の空間濃度分布や時間変化に依存する数理モデルを示した。また、構造形成に関する非平衡系のエントロピー生成に関する研究を前年度に引き続き行い、可逆グレイスコットモデルを用いてパターン生成とエントロピー生成の関連性を検討した。その過程で、線状と点状のパターンがそれぞれドメインを形成して共存するというユニークな構造が安定に存在することが示された。さらに、化学平衡を基準とした相対的な化学ポテンシャルを導入して、系が環境に捨てているエントロピーの指標となるエントロピー流の計算を行った。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 「微粒子作製・集積化」グループ

##### ①研究者名

下村 政嗣(北海道大学 教授)

##### ②研究項目

・自己組織化法によるナノ微粒子ならびに高分子構造体の作製、ナノ粒子の集積・構造化

#### (2) 「構造解析」グループ

##### ①研究者名

宮内 昭浩(日立製作所 主任研究員)

②研究項目

- ・ ナノ微粒子・集積体の表面ナノ解析ならびに微粒子集積体の構造解析装置の開発

(3)「数理シミュレーション」グループ

①研究者名

山口 智彦(産業技術総合研究所 主任研究官)

②研究項目

- ・ 自己組織化の数理シミュレーション、非線形・非平衡ダイナミクスによる自己組織化機構解明

(4)「再生医療」グループ

①研究者名

藤堂 省(北海道大学 教授)

②研究項目

- ・ 微粒子集積体の再生医療応用

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- 田中賢、鶴間章典、角南寛、山本貞明、下村政嗣「ハニカムフィルムを用いた組織再生 高分子の自己組織化による再生医療用材料の創成」、*バイオマテリアル*、**24(3)**、152-161 (2006)
- H. Yabu and M. Shimomura “Mesoscale Pincushions, Microrings, and Microdots Prepared by Heating and Peeling of Self-Organized Honeycomb-Patterned Films Deposited on a Solid Substrate”, *Langmuir*, **22(11)**, 4992-4997 (2006)
- H. Noguchi, T. Okada, and K. Uosaki “Photoinduced Surface Dynamics of CO Adsorbed on a Platinum Electrode”, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 15055-15058 (2006)
- A. Tanaka, Y. Matsuo and K. Ijro “Immobilizing and stretching of poly(dG)-poly(dC) synthesized by Klenow fragment exo- on substrates by LB method”, *Colloids and Surfaces A*, **284-285**, 246-249 (2006)
- T. Higuchi, H. Yabu, M. Shimomura “Simple Preparation of Hemispherical Polystyrene Nanoparticles”, *Colloids and Surfaces A*, **284-285**, 250-253 (2006)
- H. Yabu, M. Kojima, M. Tsubouchi, S. Onoue, M. Sugitani, M. Shimomura “Fabrication of Photo Cross-Linked Honeycomb-patterned Films”, *Colloids and Surfaces A*, **284-285**, 254-256 (2006)
- H. Yabu, K. Inoue, M. Shimomura “Multiple-periodic Structures of Self-organized Honeycomb-patterned Films and Polymer Nanoparticles Hybrids”, *Colloids and Surfaces A*, **284-285**, 301-304 (2006)
- O. Haruta, J. Nishida and K. Ijro “Circular arrangement of nucleoamphiphile containing

- azobenzene by using base pairing with cyclic oligonucleotide template at the air–water interface”, *Colloids and Surfaces A*, **284–285**, 326–330 (2006)
- N. Ishizuka, Y. Hashimoto, Y. Matsuo and K. Ijiro “Highly expansive DNA hydrogel films prepared with photocrosslinkable poly(vinyl alcohol)”, *Colloids and Surfaces A*, **284–285**, 440–443 (2006)
  - M. Tanaka, K. Nishikawa, H. Okubo, H. Kamachi, T. Kawai, M. Matsushita, S. Todo and M. Shimomura “Control of hepatocyte adhesion and function on self-organized honeycomb–patterned polymer film”, *Colloids and Surfaces A*, **284–285**, 464–469 (2006)
  - A. Tsuruma, M. Tanaka, S. Yamamoto, N. Fukushima, H. Yabu, M. Shimomura “Topological Control of Neurites Extension on Stripe–patterned Polymer Films”, *Colloids and Surfaces A*, **284–285**, 470–474 (2006)
  - H. Sunami, E. Ito, M. Tanaka, S. Yamamoto and M. Shimomura “Effect of honeycomb film on protein adsorption, cell adhesion and proliferation”, *Colloids and Surfaces A*, **284–285**, 548–551 (2006)
  - 山本貞明、田中賢、角南寛、新井景子、高山あい子、山下慈京子、森田有香、下村政嗣「ハニカム構造フィルム上におけるフィブロネクチンの吸着構造と細胞接着」、*表面科学*, **27(9)**、502–510 (2006)
  - S. Yamamoto, M. Tanaka, H. Sunami, K. Arai, A. Takayama, S. Yamashita, Y. Morita and M. Shimomura “Relationship between adsorbed fibronectin and cell adhesion on a honeycomb–patterned film”, *Surface Science*, **600**, 3785–3791 (2006)
  - H. Yabu, Y. Hirai, and M. Shimomura “Electroless Plating of Honeycomb and Pincushion Polymer Films Prepared by Self-Organization”, *Langmuir*, **22**, 9760–9764 (2006)
  - H. Yabu, T. Higuchi, M. Shimomura “Preparation of hollow nanoparticles of amphiphilic block–copolymers”, *International Journal of Nanoscience*, **5(2–3)**, 195–198 (2006)
  - T. Okajima, M. Tanaka, S. Tsukiyama, T. Kadowaki, S. Yamamoto, M. Shimomura and H. Tokumoto “Stress relaxation of HepG2 cells measured by atomic force microscopy”, *Nanotechnology*, **18(8)**, 084010 (2007)
  - M. Tanaka, A. Takayama, E. Ito, H. Sunami, S. Yamamoto, and M. Shimomura “Effect of Pore Size of Self-Organized Honeycomb–Patterned Polymer Films on Spreading, Focal Adhesion, Proliferation, and Function of Endothelial Cells”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **7**, 763–772 (2007)
  - 下村政嗣「自己組織化ハニカム多孔質膜と再生医療への応用」、*工業材料*, **55(3)**、51–55 (2007)
  - 下村政嗣、藪浩「自己組織化による有機–無機ハイブリッド材料の創成と展望」、*高分子*, **56(3)**、125–128 (2007)
  - T. Higuchi, H. Yabu, and M. Shimomura “Differences of Internal Structures Between Amphiphilic

and Hydrophobic Block-Copolymer Nanoparticles”, *International Journal of Nanoscience*, **7(3)**, 856–858 (2007)

- 樋口剛志、藪浩、下村政嗣「ブロックコポリマーナノ粒子中における不可逆的相変化」、*高分子論文集*, **64(3)**、177–180 (2007)
- Y. M. Chen, M. Tanaka, J. P. Gong, K. Yasuda, S. Yamamoto, M. Shimomura, Y. Osada “Platelet adhesion to human umbilical vein endothelial cells cultured on anionic hydrogel scaffolds”, *Biomaterials*, **28**, 1752–1760 (2007)

## (2) 特許出願

平成 18年度特許出願:4 件 (CREST 研究期間累積件数:51 件)