1D07

濃厚ポリマーブラシ被覆セルロースナノファイバーと細胞の自己組織化

（物材機構）○吉川千晶、（京大化研）榊原圭太、辻井敬亘

【緒言】

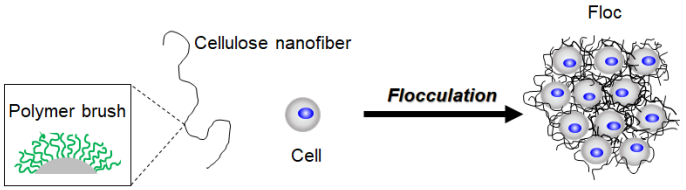
代表的な天然の構造多糖であるセルロースは、生体適合性・再生産可能性・低毒性などの観点から、バイオメディカル応用に利用されている。特に近年、酢酸菌が産出するバクテリアセルロースや、植物細胞壁から単離されるセルロースナノファイバー（CNF）・ナノクリスタルといったナノセルロース材料は、その高い結晶化度に起因して高弾性率（結晶弾性率：138 GPa）と高強度（2-3 GPa）を示すため、補強ナノ繊維として注目されている。

本研究では CNF の足場材料としての展開を目指し、濃厚ポリマーブラシをグラフトした CNF とモデル肝細胞(HepG2)の共培養を行った。具体的にはポリマーブラシのグラフト密度や鎖長などを変え、ポリマーブラシの構造因子が細胞との自己組織化構造や細胞機能（細胞形態や遺伝子発現など）に与える影響について詳しく調べた[1]。

【結果と考察】

まず、表面開始原子移動ラジカル重合（SI-ATRP）の開始基を CNF へ導入した。ここでは反応時間を変えることで、開始基の導入率を調整した（0.004 and 0.7 residues/nm^2）。異なる開始基密度を有する CNF を用い、SI-ATRP によりアニオン性の poly(p-styrenesulfonic acid sodium salt) (PSSNa)をグラフトした。重合後、フリーポリマーの分子量（M_n）、分子量分布をゲルパーミエーションクロマトグラフィー測定により決定し、理論分子量 $M_{n,c}$ は重合率より算出した。グラフト量は元素分析により決定し、M_n および表面積からグラフト密度（σ）を算出した。その結果、期待していたように、CNF には準希薄ポリマーブラシ(CNF-SDPB)および濃厚ポリマーブラシ(CNF-CPB)がグラフトされていることが確認できた（σ = 0.01 and 2.0 chains/nm^2）。

なお、アニオン性の PSSNa ブラシ表面では電荷の影響でタンパクの非特異的吸着が起こるため、吸着タンパク層が CNF への細胞接着を促進させると考えた（フロキュレーション）（スキーム 1）。そこで、CNF-CPB, CNF-SDPB, 未修飾 CNF を培地に分散させ、HepG2 と所定濃度で培養したところ、CNF-CPB のみがフロック（細胞凝集塊）を形成した。さらに、CNF-CPB の濃度に依存して平均フロックサイズが変化することがわかった。細胞と CNF-CPB はタンパク質を介した相互作用によりフロックを形成するが、CNF-CPB 濃度が高い場合、培地中に浮遊している過剰量の CNF がフロック同士の集合を阻害するため、小さなフロックしか形成しない。一方、低 CNF-CPB 濃度ではフロックサイズは大きく（直径 >500μm）、また 7 日間の培養で中空のフロックを形成するといった、興味深い結果が得られた。これは、細胞の増殖に伴いフロック内で界面積を小さくしようとする力が作用し、中空構造が形成したと考えられる。さらに、遺伝子解析により CNF-CPB が CNF-SDPB や未修飾 CNF に比べて HepG2 細胞の機能を向上させることも確認している。この結果は CNF-CPB の足場材料としての有効性を示すものである。CNF-CPB と細胞が形成するユニークな自己組織化構造（フロック）は新しい三次元細胞培養場として、今後、創薬スクリーニングや再生医療用足場などへの展開が期待できる。



Scheme 1. Flocculation of cells and CNF-CPBs

[1] C. Yoshikawa, T. Hoshiba, K. Sakakibara, Y. Tsujii *ACS Applied Nano Materials* **2018** *1(4)*, 1450-1455.

Flocculation of Cells by Cellulose Nanofibers Modified with Concentrated Polymer Brushes

Chiaki YOSHIKAWA,[a] Keita SAKAKIBARA,[b] and Yoshinobu TSUJII[b]
[a]WPI-MANA, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki 305-0047 Tel: 029-860-4717, E-mail: yoshikawa.chiaki@nims.go.jp, [b]Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011 Tel: 0774-38-3168, E-mail: sakaki@scl.kyoto-u.ac.jp