

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/277902351>

Application of Carbon Nanomaterials to Biointerface

Article in *Journal of The Surface Finishing Society of Japan* · January 2014

DOI: 10.4139/sfj.65.262

READS

4

1 author:



Masahito Ban

Nippon Institute of Technology

36 PUBLICATIONS 236 CITATIONS

SEE PROFILE

カーボンナノ材料のバイointerフェイスへの応用

伴 雅 人^a

^a 日本工業大学 工学部 創造システム工学科 (〒 345-8501 埼玉県南埼玉郡宮代町学園台 4-1)

ApifCaNankkBie

MaatBAN^a

^a Department of Innovative Systems Engineering, Faculty of Engineering, Nippon Institute of Technology(4-1 Gakuendai, Miyashiromachi, Minami-Saitama, Saitama 345-8501)

Keywords : Fullerene, Carbon Nanotube, Graphene, Diamond-Like Carbon, Cytotoxicity, Adhesion, Proliferation, Shape Change, Differentiation

1. はじめに

体外で細胞を培養し移植が可能な組織・臓器を再構築する再生医療は、21世紀の医療技術の中でも中核的な存在であり、人工多能性幹細胞(iPS細胞)の登場により、様々な病気やけがに対する早い段階での臨床応用が期待されるようになった。再生医療の発展に不可欠な工学的技術として、細胞の機能維持、増殖・分化を誘導するための土台となる足場(スキャホールド)が重要な役割を果たす。生体内の細胞は、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなどからなる細胞外マトリックスに囲まれているが、足場とは、このような生体内に類似した環境を人工的に生体外に作り出す技術である。これまで足場の作製には、細胞外マトリックスの主要構成分子が利用されてきた。そして、幹細胞の分化誘導には、液性因子(分化誘導因子)を用いる方法が研究の中心となってきた。ところが最近の研究により、足場基板の表面形状が細胞の挙動や機能発現に大きく影響することが明らかにされるようになった¹⁾。驚くべきことに、近年発展したマイクロプリンティング法などの方法を用いて作製したパターンニング培養基板にて、その面積、間隔、並び方などにより体性幹細胞の分化を誘導できることが報告され、マイクロメートルスケールの微細構造が、細胞の伸展や増殖だけでなく分化を誘導するポテンシャルをもつことが示された^{2),3)}。

実際の生体中の細胞が置かれている環境では、周囲の細胞外マトリックスを構成するコラーゲンなどのタンパク質自体はナノメートルレベルのサイズである一方、コラーゲンは複雑な線維構造や網目構造を形成し、数100 nmレベルのドメインとなっている。従って、細胞が接着部位として認識するスケールとしては、数nm~1 μm程度の広い範囲を考える必要がある。また、分化に先行して起こる細胞形状変化を制御する重要な因子として、足場表面のドメインへの液性因子の吸着を合わせて考えないといけない。これらのことから、数nm~数100 nmスケールの構造をもつ足場基板上での液性因子の挙動と細胞の伸展、増殖・分化誘導は極めて重要な情報で

あると言えるが、これまでのところほとんどその知見は得られていない。

一方で近年、タンパク質と同等のサイズをもつカーボンナノチューブ(CNT)やグラフェンなどのカーボンナノ材料が、細胞の増殖や分化を誘導するといった実験結果が次々と報告されるようになってきたことは極めて興味深い。ダイヤモンドライクカーボン(DLC)薄膜の医療器具への適用⁴⁾が進む中で、もともと生体親和性に優れる「カーボン」系材料がバイointerフェイスとしてさまざまな機能を発現し、組織工学(ティッシュエンジニアリング)の分野においてさらなる応用展開が期待される。本論文では、フラーレン、DLC、CNT、グラフェンなどのカーボンナノ材料が、接触する細胞に対してどのような作用を及ぼすか、細胞毒性、細胞の接着・増殖、形態・分化制御という観点から、筆者らが実施してきた研究も含め概説する。

2. 細胞毒性

細胞を死に至らしめるあるいは自ら死を選ばせる(アポトーシス)外部からの化学的および物理的特性を細胞毒性という。バルクのカーボン材料はバイオ材料として一般的に使用されているが、ナノサイジングされたいわゆるナノカーボンは、ナノサイズの材料がもつさまざまな毒性と同様に、その特異的形状に起因する細胞毒性を誘起することになる。

アスベストが肺がんの原因になることから、極めてアスペクト比が大きいCNTが健康被害を及ぼす可能性は容易に想像され、これまでにさまざまな*in vitro*さらに*in vivo*での研究がなされてきた^{5),6)}。単層CNTは、いわゆる「Snaking Effect」により細胞膜を通過・浸入し(細胞膜損傷)、膜内のさまざまなタンパク質システムと強く相互作用することで細胞毒性を示す。例えば、神経前駆細胞となるPC12(ラット副腎髄質由来褐色細胞腫)を用いた培養実験では、細胞毒性は単層CNTの濃度に強く依存し、それが大きいと細胞の代謝活動の低下やネクローシス(外的要因による偶発的な細胞

死)となる細胞膜損傷を引き起こすことが示されている⁷⁾。グラフェンとその誘導体の生体との相互作用に関する研究についても近年盛んに実施されている⁸⁾。グラフェンは、グラフェンシートの細胞膜面への凝集、また、活性酸素(ROS)生成による酸化ストレスといったCNTとは異なるメカニズムによって細胞死を誘導する可能性が指摘されている。RAW264.7マクロファージ(マウス単球性白血病由来細胞)に対する研究では、グラフェンはミトコンドリア膜電位の低下や細胞内のROSの増加を通してアポトーシスを誘因することが報告されている⁹⁾。

フラーレンC₆₀は可視光照射にて光励起され一重項励起C₆₀になり、系間交差により生じた三重項励起C₆₀が緩和する過程において、周囲の酸素をROSである一重項酸素に変えることはよく知られている。過剰なROSは細胞内で遺伝子の損傷を引き起こすことから、C₆₀は間接的に細胞毒性の要因となる。一方、C₆₀にさまざまな官能基を付与した水溶性フラーレン誘導体について、その生医学応用に関する特性が*in vitro* および*in vivo*で盛んに研究された¹⁰⁾。C₆₀(OH)_nは、ROSによる神経細胞の死を抑制する抗酸化物質として機能すること¹¹⁾や乳がん細胞の増殖を抑制する効果があること¹²⁾など多数の報告がある。また、界面活性剤であるポリビニルピロリドン(PVP)で水溶化した未修飾のC₆₀が、NADH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型)存在下でDNA切断活性を示すことが示された¹³⁾。さらに、水中で安定に存在する純粋なC₆₀の凝集体であるフラーレンサスペンション(nano-C₆₀)が、水溶性フラーレン誘導体に比べ、皮膚線維芽細胞や肝がん細胞に対し、より高い細胞毒性を示すことが報告されている¹⁴⁾。

上述のC₆₀はいずれも水に溶解あるいはコロイド分散され

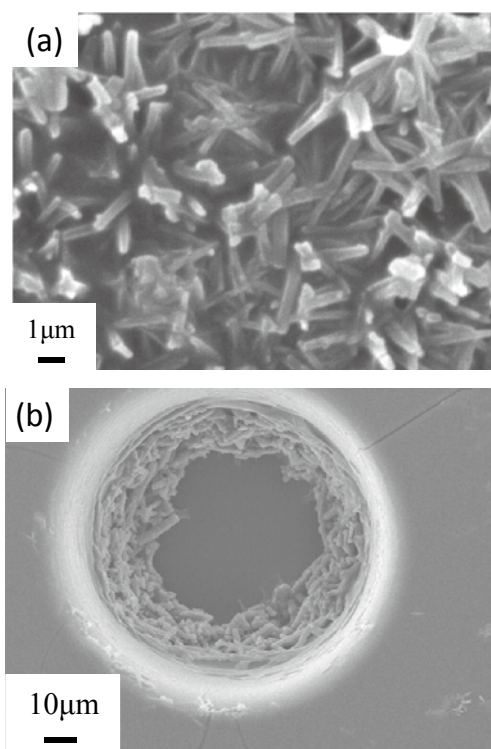


図1 C₆₀結晶微粒子の走査電子顕微鏡観察結果¹⁵⁾

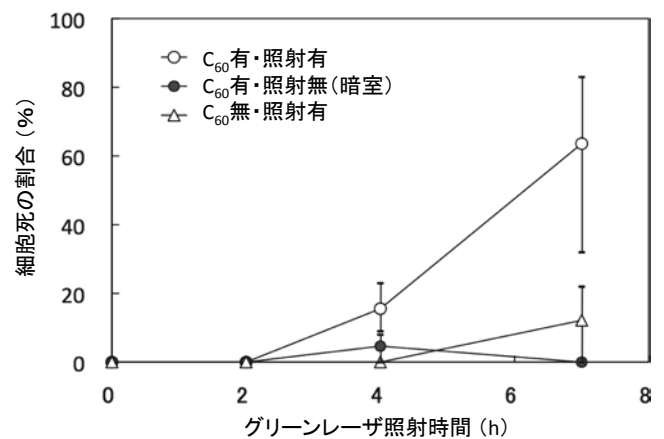


図2 細胞生死の評価結果¹⁷⁾

た形態となるが、筆者らは、C₆₀のもつ細胞毒性効果をバイオロジカル・メディカルチップに利用することを目的に、高分子基材表面の特定部分にC₆₀を担持させる研究を行ってきた。図1(a)は、インクジェット法にてフラーレン溶液を吐出することでPDMS(ポリジメチルシロキサン)基板表面に固定して形成させたC₆₀結晶微粒子の走査電子顕微鏡画像である¹⁵⁾。微粒子は針状の形状でそれぞれが数μmレベルの寸法をもち、基板の表面に付着して3次元的に交錯しながら伸びている。蛍光色素を用いた評価により、このC₆₀結晶微粒子にグリーンレーザ(532 nm)を照射するとROSである過酸化水素およびスーパーオキシドが産生されることが確認された¹⁶⁾。図1(b)は、インクジェット法によりこのC₆₀結晶微粒子が封入されたマイクロウェル(径90 μm)の一例である。図2に、PDMS製マイクロアレイチップに形成したC₆₀結晶微粒子が封入されたマイクロウェル内部でHeLa細胞(ヒト子宮頸がん由来)を培養し、そこにグリーンレーザを照射した後、細胞生死の評価を行った結果を示す¹⁷⁾。比較である、C₆₀結晶微粒子有/グリーンレーザ照射無(暗室)およびC₆₀結晶微粒子無/グリーンレーザ照射有に対し、明らかにC₆₀結晶微粒子有/グリーンレーザ照射有の場合に細胞死の割合が大きく、担持して形成したC₆₀結晶微粒子の光照射による細胞毒性効果(がん細胞の死滅)が確認されている。

3. 接着・増殖

血液中に存在する浮遊性細胞を除くすべての種類の細胞は、単独で存在することはなく、細胞同士で付着あるいは細胞外マトリックスに付着している。生体外での細胞の培養においては、細胞を生きし活性状態を維持するために細胞を基板表面に接着させる必要があり、その形状、濡れ性、導電性などの表面性状が重要な要因となる。

硬質のDLC薄膜を軟質の高分子材料に成膜すると、それらの線膨張係数の違いから高分子材料が歪み、表面に「しわ」模様ができる。この現象を利用した細胞接着制御の研究が行われている¹⁸⁾。シリコンモールドを転写して作製したピラー(5 μm径)がアレイ化したPDMS基板にDLC薄膜を成膜することで全面にしわを形成し、階層的な構造をもち接触角が160°以上を示す超はっ水表面が作製された。この基板を用い

た肺動脈内皮細胞の培養試験から、ピラー間隔により細胞の付着がコントロールでき、ピラー間隔が細胞の大きさよりも小さい場合、細胞は基板への接着が制限され糸状仮足も伸ばしにくいことが報告されている。

CNTやグラフェンについても、ティッシュエンジニアリングのための足場としての使用を目的にさまざまな細胞種を用いた研究が行われ、接着や増殖、遺伝子導入、分化などの細胞挙動に関する情報が蓄積されてきている。単層・多層CNTやその誘導体を分散付着させた基板による骨芽細胞¹⁹⁾、多層CNT、酸化グラフェンおよび還元された酸化グラフェンを分散付着させた基板によるNIH-3T3(マウス繊維芽細胞)の培養試験²⁰⁾などが報告されている。熱CVD法にて成膜されSiO₂/Si基板上に転写されたグラフェン上で、SAOS-2細胞(ヒト骨芽細胞)およびヒト間葉系幹細胞の培養試験が実施されている²¹⁾。これによると、グラフェンの存在が、両細胞の増殖に寄与していること、また、ヒト間葉系幹細胞の形態

変化に影響を与えていることが推測された。

筆者らは、表面波励起プラズマCVD法を用いて銅箔上に成膜されたグラフェン²²⁾を転写することで得られた、表面にグラフェンが数層形成されたPDMS基板(グラフェン転写PDMS)を用いて、間葉系幹細胞であるC2C12細胞(マウス筋芽細胞)の培養試験を行った²³⁾。図3は、その結果として、培養日数による(a)観察画像1mm²あたりの細胞の総面積、(b)1mm²あたりの細胞数および(c)細胞1個あたりの面積の変化を示している。(a)および(b)から、グラフェンをPDMS上に形成することにより、培養日数に対して明らかに細胞がより増加することが確認された。一方(c)から、細胞は両基板とも培養1日目までに仮足を伸展させ、ある一定の面積を保ったまま3日目まで大きな変化がないことがわかる。以上の結果は、グラフェンは接着している細胞を必要以上に伸展させずにその増殖に寄与することを示唆している。生体内における細胞は細胞外マトリックスとインテグリンなどの細胞接着分子を介して接着しており、これは生体外となる足場材料とそこに付着した細胞との間の現象を理解するための重要な因子となる。すなわち、PDMSよりもグラフェンがより細胞接着分子が吸着しやすい表面であれば、細胞の骨格となるアクチンもより活性化した状態でシグナル伝達が誘導されるため、分裂が起きやすくなると考えることができる。

4. 形態・分化制御

筆者らは、ティッシュエンジニアリングの基盤技術となる細胞足場への適用という観点から、DLC薄膜を用いた細胞の形態制御に関する研究を行ってきた。以下に、高分子基板にナノレベルの膜厚のDLC薄膜を成膜すると表面に「しわ」状の凹凸ができることを利用した研究例を2つ述べる。

PDMS基板に積極的に伸び歪みを与えた状態でDLC薄膜を成膜することで、図4(a)に示すような数 μm レベルのライン状の凹凸形状を表面に形成した²⁴⁾。図4(b)は、この凹凸の典型的な断面であり、幅が約 $4\mu\text{m}$ で高さが約 $1\mu\text{m}$ であることがわかる(DLC薄膜は薄く観察できない)。この凹凸の幅および高さは、伸び歪みおよびDLC薄膜の成膜条件によりコントロールでき、それぞれおよそ $3\sim 7\mu\text{m}$ および $0.5\sim 2.5\mu\text{m}$ が得られている。このPDMS基板上で培養されたC2C12細胞は、図5(a)の位相差顕微鏡観察画像が示すように、凹凸のライン方向(図中上下方向)に沿うようにその形状が伸展していることがわかる。図5(b)は、細胞核をDAPI、F-アクチンをファロイジンにて染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果である。図から明らかなように、凹凸によるラインの方向にF-アクチン(緑色)が細く伸びている。一方、平面PDMS基板上で培養されたC2C12細胞は、等方的に周囲にF-アクチンを短く伸ばしむゆるスター型の形状を示した。すなわち、ラインを作る凹凸形状は、それがC2C12細胞のF-アクチンの伸展するガイドとなり、その形状を細長く引き延ばす効果があることが明らかとなった。また、図6に示すように、凹凸の(a)高さおよび(b)幅に対する培養1日経過後の細胞数の計測結果から、凹凸の高さおよび幅が大きい基板で培養したほど細胞の数が増加する傾向が見られ、このような凹凸形状は、細胞の形状だけでなく細胞増殖にも影響を

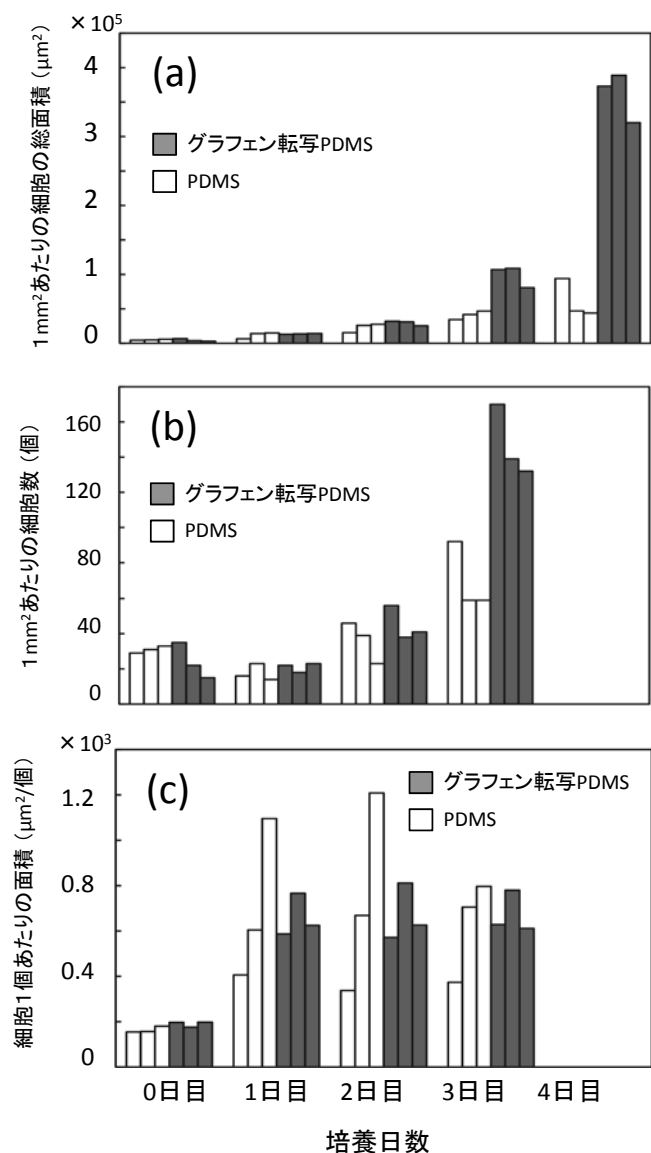


図3 グラフェン転写PDMSによる細胞培養試験結果²³⁾
(b)および(c)の4日目はデータ無し(グラフェン転写PDMSでは細胞のコンフルエントにより、PDMSでは細胞のスフェロイド化により細胞数のカウント不可)

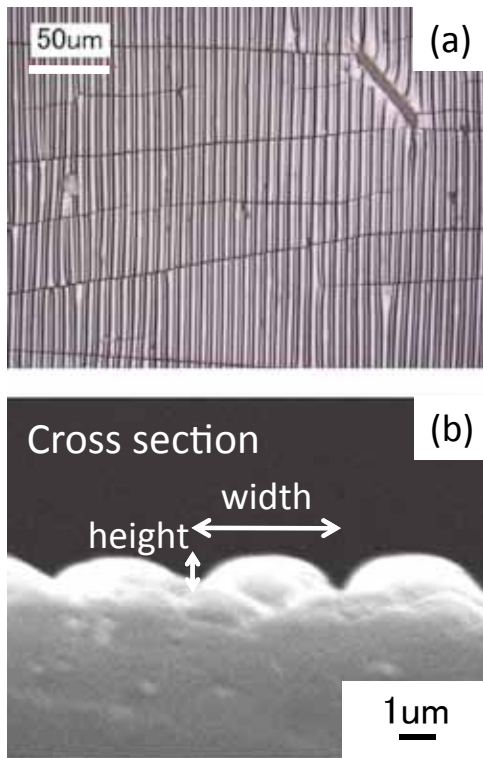


図4 DLC 薄膜成膜により形成されたライン状の凹凸の(a)共焦点レーザー顕微鏡による表面観察画像および(b)走査電子顕微鏡による断面観察画像²⁴⁾

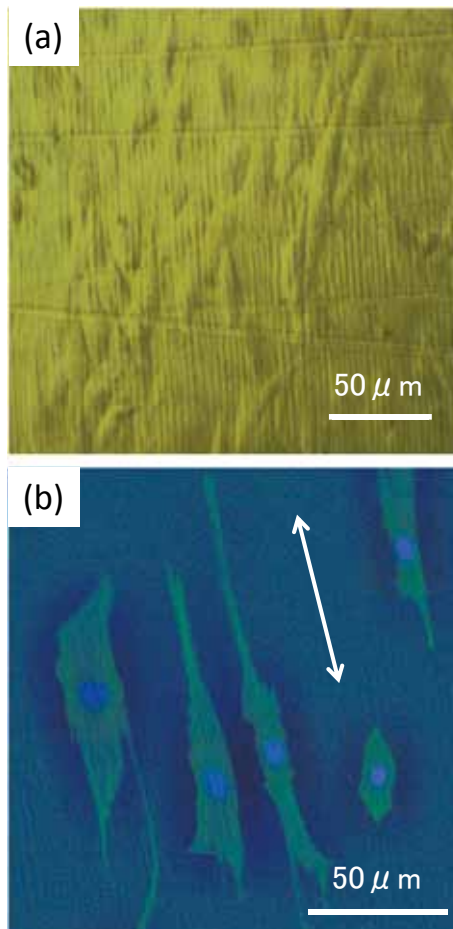


図5 ライン状凹凸上にて培養されたC2C12細胞の(a)位相差顕微鏡観察画像および(b)蛍光顕微鏡観察画像(青:細胞核, 緑:F-アクチン。図中矢印は凹凸によるラインの方向を示す)²⁵⁾

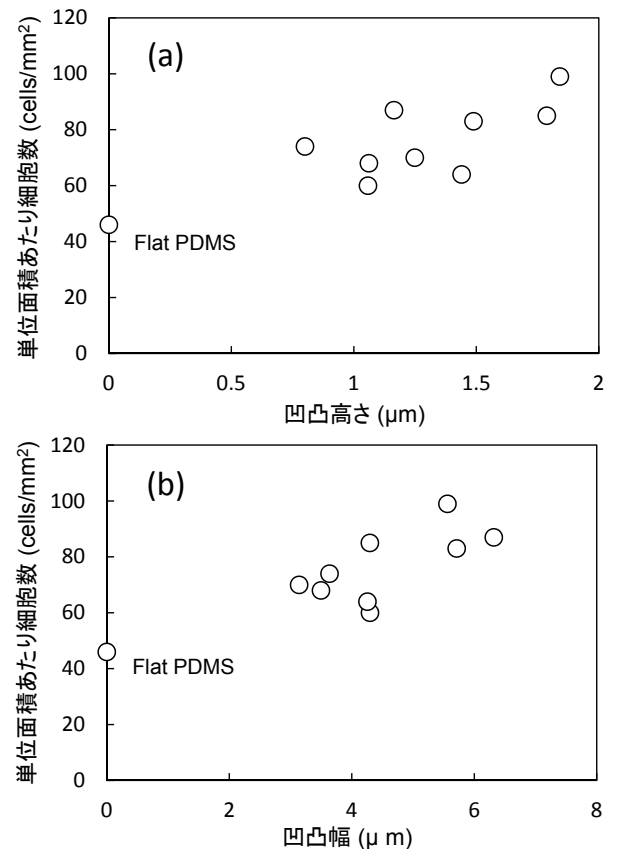


図6 (a)高さおよび(b)幅が異なるライン状凹凸上にて1日培養されたC2C12細胞の数の計測結果²⁶⁾。比較として用いた平板PDMSでの細胞数は、凹凸高さおよび幅が0として記載。

及ぼすことが示唆された^{25),26)}。

DLC 薄膜成膜により形成される凹凸形状のその他の利用として、マイクロウェルがアレイ化して形成されたマイクロアレイチップによる細胞培養が挙げられる^{27),28)}。図7(a)は、インクジェット法とソフトリソグラフィ法にて作製したPDMS製マイクロアレイチップの一部のマイクロウェルを共焦点レーザー顕微鏡で観察した3次元画像である。1つのウェルの径はおよそ100 μm程度であり、また、DLC 薄膜を成膜したことで数 μmレベルの凹凸が表面に形成されていることがわかる。このチップを足場としてC2C12細胞を培養すると、図7(b)の位相差顕微鏡観察画像にみられるように、ウェル内部に、細胞を複数集合させた球状の塊(図中矢印で示す)を形成することができる。図7(c)および(d)は、それぞれ細胞核(青)およびF-アクチン(緑)を染色し蛍光顕微鏡で観察した画像である。細胞核が無数に塊の内部に存在しており、生細胞がこの塊を形成していることがわかる。アクチンは、図5(b)の細胞とは異なり周囲に足を伸ばすことなく、塊のバインダとして存在している。このような細胞の凝集体はスフェロイドと呼ばれ、このような形態で細胞を培養する技術は、より組織に近い状態で長期間より高い機能を維持するという点において、人工臓器、再生医療、薬物代謝や薬物肝毒性評価などさまざまな応用が期待される。この研究においては、播種する細胞浮遊液における細胞濃度やマイクロウェルの寸法などを変化させた実験が行われており、形成されたスフェロイドの径が計測されている。図8は、3種類の細胞濃

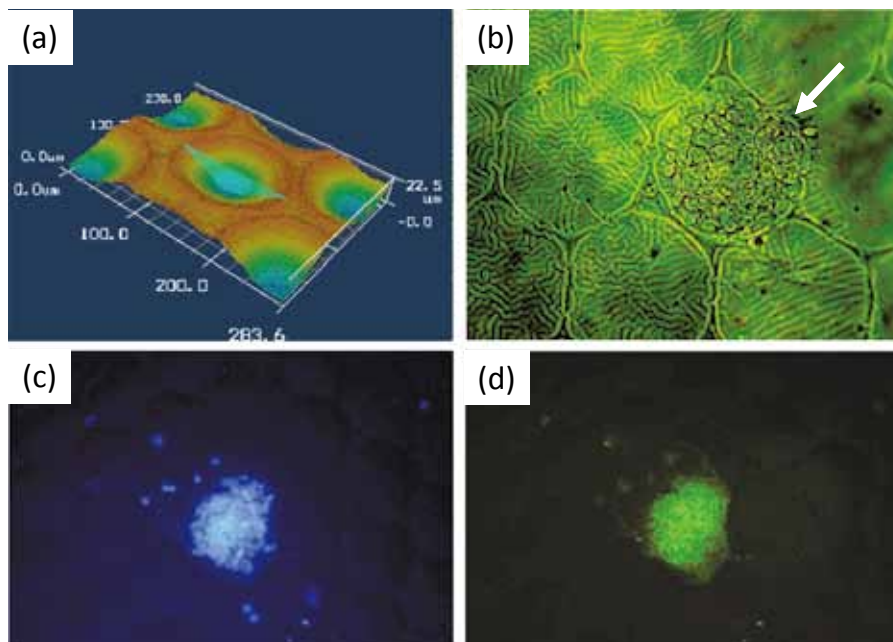


図7 マイクロウェルがアレイ化して形成されたマイクロアレイチップによる細胞培養結果 ((a)共焦点レーザー顕微鏡, (b)位相差顕微鏡および(c)(d)蛍光顕微鏡による)^{27),28)}

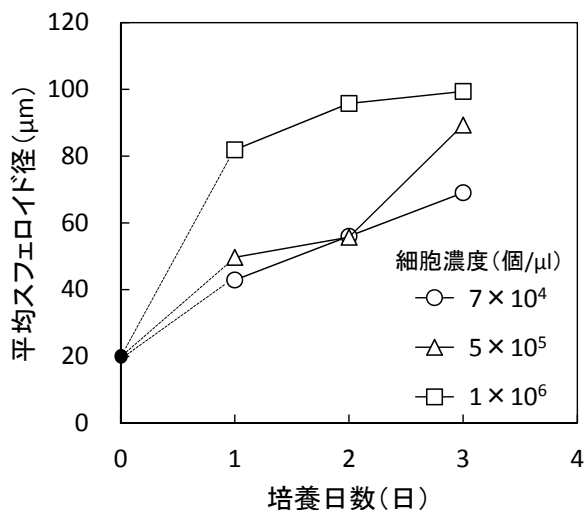


図8 平均スフェロイド径の培養日数による変化²⁸⁾
培養日数0日目のプロットは平面PDMS上で培養した孤立細胞のおおよその大きさを示す。

度で培養したときの培養日数によるスフェロイド径の変化を示しており、細胞濃度 1×10^6 個/ μL にて、培養1日目からおおよそ $80 \mu\text{m}$ 、3日目には $100 \mu\text{m}$ に達する大きさのスフェロイドが形成できたことが確認されている。

以上のような細胞の形態制御技術は、再生医療において極めて重要な技術である幹細胞の分化誘導にもつながる魅力的なテーマである。分化誘導については従来から液性因子が使用されてきたが、分化が成熟するまでに長い期間が必要になるなどの問題があるため、効果的な分化制御の方法が望まれている。近年、幹細胞の形態が分化の誘導に強く関わっていることを示すデータが次々と得られており、間葉系幹細胞は、狭い面積に伸展が抑制されると骨芽細胞に、伸展の面積が大きいと脂肪細胞に分化誘導されることが報告されている²⁾。

細胞はその骨格となるアクチンフィラメントの広がり方によりその形態が規定されるため、アクチンが接着する部位を足場の表面形状から積極的にコントロールすることで分化誘導を駆動することが可能になると考えられる。CNTやグラフェンなどのカーボンナノ材料は、細胞外マトリックスを構成するタンパク質と同レベルのサイズであることから、アクチンが認識するドメインとして魅力的な候補となる。近年、CNT/ポリマーコンジットによる神経幹細胞のニューロン、アストロサイトおよび希突起膠細胞への分化²⁹⁾、さらに、グラフェンや酸化グラフェンによる間葉系幹細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化³⁰⁾など、それを裏付けるデータが多数報告されるようになってきている。

5. おわりに

本稿では、カーボンナノ材料としてフラーレン C_{60} 、カーボンナノチューブ(CNT)、グラフェンおよびダイヤモンドライクカーボン(DLC)を取り上げ、これらをバイオインターフェイスとした場合の細胞の特性や挙動、すなわち、細胞毒性、細胞の接着と増殖、細胞の形態変化と分化について、最近の研究を紹介しながら概説した。カーボンナノ材料は、その寸法レベルが細胞外マトリックスを構成するタンパク質に近く、また表面修飾などによりさまざまな特性を付与することが可能であることから、ティッシュエンジニアリングの足場材料、幹細胞の分化を誘導する基板、さらにインプラントデバイスなどのバイオメディカル応用に対し大きなポテンシャルを有する。今後、カーボンナノ材料の特異な構造や機能が、幹細胞を含むさまざまな細胞種の挙動に与える効果やそのメカニズムが調べられることにより、再生医療などの21世紀の医療技術に応用されていくことを切に期待する。

(Received March 31, 2014)

文 献

- 1) M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, A. Khademhosseini ; *Biomaterials*, **33** 5230 (2012).
- 2) R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, C. S. Chen ; *Dev. Cell*, **6**, 483 (2004).
- 3) M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, Richard O. C. Oreffo, et. al., *Nature Materials*, **6**, 997 (2007).
- 4) 吉本幸洋, 永島 壮, 鈴木哲也, 長谷部光泉 ; 表面技術, **59**, 363 (2008).
- 5) B. S. Harrison, A. Atala ; *Biomaterials*, **28**, 344 (2007).
- 6) C. A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, K. Donaldson, et. al. ; *Nature Nanotechnology*, **3**, 423 (2008).
- 7) Y. Zhang, S. F. Ali, E. Dervishi, Y. Xu, A. S. Biris, et. al. ; *ACS Nano*, **4**, 3181 (2010).
- 8) V. C. Sanchez, A. Jachak, R. H. Hurt, A. B. Kane ; *Chemical Research in Toxicology*, **25**, 15 (2012).
- 9) Y. Li, Y. Liu, Y. Fu, T. Wei, C. Chen, et. al. ; *Biomaterials*, **33**, 402 (2012).
- 10) E. Nakamura, H. Isobe ; *Accounts of Chemical Research*, **36**, 807 (2003).
- 11) L. L. Dugan, J. K. Gabrielsen, S. P. Yu, T-S. Lin, D. W. Choi ; *Neurobiology of Disease*, **3**, 129 (1996).
- 12) G. Bogdanovic, V. Kojic, A. Dordevic, J. C-Brunet, V. V. Baltie, et. al. ; *Toxicology in Vitro*, **18**, 629 (2004).
- 13) Y. Yamakoshi, S. Sueyoshi, K. Fukuhara, N. Miyata, T. Masumizu, M. Kohno ; *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12363 (1998).
- 14) C. M. Sayes, J. D. Fortner, W. Guo, et. al. ; *Nano Lett.*, **4**, 1881 (2004).
- 15) F. Sasaki, M. Ban ; The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2010), Groningen, ID0268, (2010).
- 16) M. Ban, F. Sasaki ; *World Journal of Nano Science and Engineering*, **2**, 110 (2012).
- 17) M. Ban, Y. Kogi, F. Sasaki ; *J. Imaging Society of Japan*, **51**, 496 (2012).
- 18) Y. Rahmawan, K-J. Jang, M-W. Moon, K-R. Lee, K-Y. Suh ; *Biochip Journal*, **3**, 143 (2009).
- 19) L. P. Zanello, B. Zhao, H. Hu, R. C. Haddon ; *Nano Lett.*, **6**, 562 (2006).
- 20) S-R. Ryoo, Y-K. Kim, M-H. Kim, D-H. Min ; *ACS Nano*, **4**, 6587 (2010).
- 21) M. Kalbacova, A. Broz, J. Kong, M. Kalbac ; *Carbon*, **48**, 4323 (2010).
- 22) J. Kim, M. Ishihara, Y. Koga, K. Tsugawa, M. Hasegawa, S. Iijima ; *Appl. Phys. Lett.*, **98**, 091502 (2011).
- 23) H. Sunada, M. Ishihara, M. Hasegawa, M. Ban ; The 5th International Conference on Recent Progress in Graphene Research, Tokyo, p.214 (2013).
- 24) M. Ban, T. Hagiwara ; International Symposium on Microchemistry and Microsystems, Hong Kong, p.136 (2010).
- 25) M. Ban, Y. Ueno, Y. Kogi ; The 1st International Conference on Surface Engineering, Pusan, p.72 (2013).
- 26) 上野裕太, 伴 雅人 ; 表面技術協会第128回講演大会要旨集, p.122 (2013).
- 27) 古城裕矢, 伴 雅人 ; 第35回日本バイオマテリアル学会シンポジウム予稿集, p.481 (2013).
- 28) 伴 雅人, 古城裕矢 ; 表面技術協会第129回講演大会要旨集, p.215 (2014).
- 29) E. Jan, N. A. Kotov ; *Nano Lett.*, **7**, 1123 (2007).
- 30) W. C. Lee, C. H. Y. X. Lim, H. Shi, L. A. L. Tang, Y. Wang, C. T. Lim, K. P. Loh ; *ACS Nano*, **5**, 7334 (2011).