

発光スペクトルを制御した UV/ozone 表面改質法の開発およびマウス ES 細胞培養系への応用

慶應義塾大学[院] ○山井佑馬 慶應義塾大学 宮田昌悟

Development of UV/ozone surface modification controlling emission spectrum and its application to mouse ES cell culture

Yuma YAMANOI and Shogo MIYATA

1 序論

近年、生体外または生体内で細胞を用いて組織を再生する再生医療が注目されている。この細胞ソースとして、自身と同じ性質を持った細胞を複製する自己複製能と様々な細胞に分化できる多分化能を併せ持つ ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞に期待が集まっている。

多能性幹細胞を培養するには、feeder 細胞との共培養や培養面への細胞接着基質のコートが必要となる。しかし、これらの培養方法では異種動物由来細胞混入のリスクや高コスト化などの課題があり、より安全で簡便な培養法の確立が求められている。

前述の課題を解決するために UV/ozone 表面改質を用いて多能性幹細胞の接着性および増殖性を向上させる試みがある。既存の UV/ozone 表面改質では、ポリスチレン製培養基材に低圧水銀ランプを用いて 2 種類のピーク波長を持つ UV 光を照射することで、空気中でオゾン由来の活性酸素を生成し、さらに UV 光のエネルギーによって分子結合を切断することでヒドロキシ基やカルボキシ基などの親水基を導入する。Kasai らは、UV/ozone 表面改質を施したポリスチレン製培養基材でマウス ES 細胞を培養したところ、細胞の接着性および増殖性が向上したことを報告している¹⁾。しかし、低圧水銀ランプでは照射される UV 光の発光スペクトルが一定であるため、活性酸素の生成量や切断される分子結合を制御することができない。

そこで本研究では、ランプに封入されているガスの種類によって異なる単一波長の UV 照射が可能なエキシマランプを複数組み合わせることで発光スペクトルを制御した表面改質を培養基材に施し、マウス ES 細胞の接着性および増殖性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

2 試料および実験方法

2.1 エキシマランプを用いた UV/ozone 表面改質 本実験では、Xe*Type(172 nm), KrCl*Type(222 nm), XeCl*Type(308 nm)のスマートエキシマランプ((株)オーク製作所)を使用して、ポリスチレン製細胞用基材(nunc 製)に 13 mm の高さから UV 光を照射した(Fig.1). 各ランプの ON/OFF を切り替えることで Table.1 に示した異なるスペクトルの UV 光で表面改質を行った。

2.2 基材表面性状の評価 表面性状の評価は X 線光電子分光(XPS)によって分析した。測定には X 線光電子分光装置(JPL-9010, (株)JEOL) を用いて、印加電圧は 4 kV,

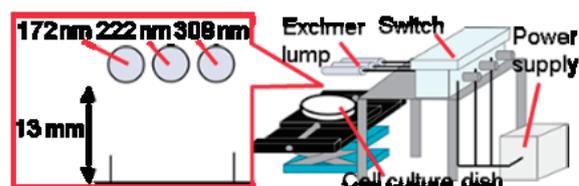


Fig.1 Schematic of surface modification device.

Table.1 Condition of surface modification.

Experimental group	Wavelength of UV lamps (nm)	UV irradiation time (min)
UV ₁₇₂	172	5
UV ₂₂₂	222	10
UV ₃₀₈	308	10
UV ₁₇₂₋₂₂₂	172,222	5,10
UV ₂₂₂₋₃₀₈	222,308	10,10
UV ₁₇₂₋₃₀₈	172,308	5,10
UV _{all}	172,222,308	5,10,10

X 線は MgK α 線(1253.6 eV)とした。また、未処理の基材を control とした。

2.3 マウス ES 細胞の培養 本実験では、マウス ES 細胞(EB3 株, 理研セルバンク)を使用した。細胞は GMEM(Glasgow Modified Minimum Essential Medium)に 1% antibiotic-antimycotic, 10%FBS(Fetal Bovine Serum), 0.1 mM non essential amino acid, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM sodium pyruvate, 1000 U/ml LIF(Leukemia Inhibitory Factor), 10 μ g/ml blastcidin S を添加した培地で培養を行った。播種密度は 1.8×10^4 cells/cm² とし、播種後 6 h および 1 day, 2 days で培地交換を行った。培養期間は 3 日間とし、培養 6 h, 1 day, 2 days, 3 days で顕微鏡観察を行った。その後、細胞を回収し、蛍光分光光度計(Qubit 2.0 Fluorometer, Life Technologies)を用いて総 DNA 量を測定した。また、gelatin をコートした基材を control(+), 未処理の基材を control(-)とした。

3 実験結果および考察

3.1 表面改質が基材の表面性状に与える影響 XPS のスペクトルにおいて波形分離を行ったところ、control 群と UV₃₀₈ 群ではポリスチレン由来と考えられる C-C, C-H が検出されたのに対し、UV₁₇₂ 群と UV₂₂₂ 群ではそれらの結合に加えて O=C-OH, C=O が検出された(Fig.2)。さらに、分離された各ピークがスペクトルに占める割合を

評価したところ、UV₁₇₂ 群と UV₁₇₂₋₂₂₂ 群、UV₁₇₂₋₃₀₈ 群と UV_{all} 群を比較すると、222 nm の波長を組み合わせる照射した試料群のほうが C=O の発現量がそれぞれ増加していることがわかった(Fig.3). このことから、172 nm と複合して照射される 222 nm の UV 光は C=O の形成を促進させる働きがあると考えられる。また、C=O の発現量は UV_{all} 群において最も増加した。

3.2 マウス ES 細胞の接着性および増殖性評価 顕微鏡像より、control(-)に比べ UV 光を照射した群では細胞の増殖が観察された(Fig.4). 3 種類の波長を組み合わせる改質した UV_{all} 群では、細胞接着基質である gelatin をコートした control(+)群と比較して総 DNA 量が増加する傾向にあることがわかった(Fig.5). XPS の測定結果より、UV_{all} 群では C=O が最も多く検出されていたことから、C=O の化学結合は細胞の接着性および増殖性を向上させるのに重要な因子であることが推定される。

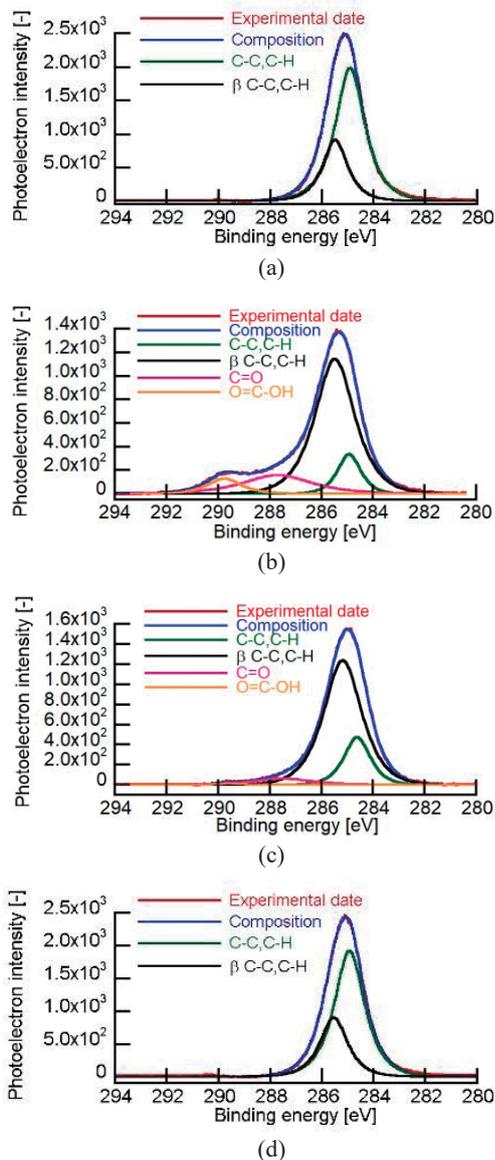


Fig.2 Narrow-scan C 1s spectrum of XPS. (a) control, (b) UV₁₇₂, (c) UV₂₂₂, and (d) UV₃₀₈.

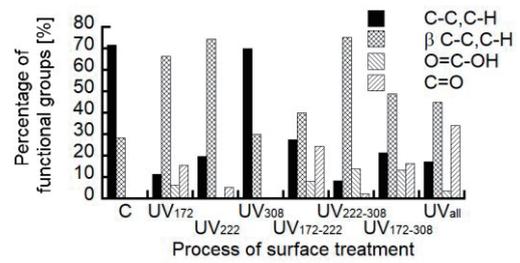


Fig.3 Ratio of functional group in C 1s spectrum.

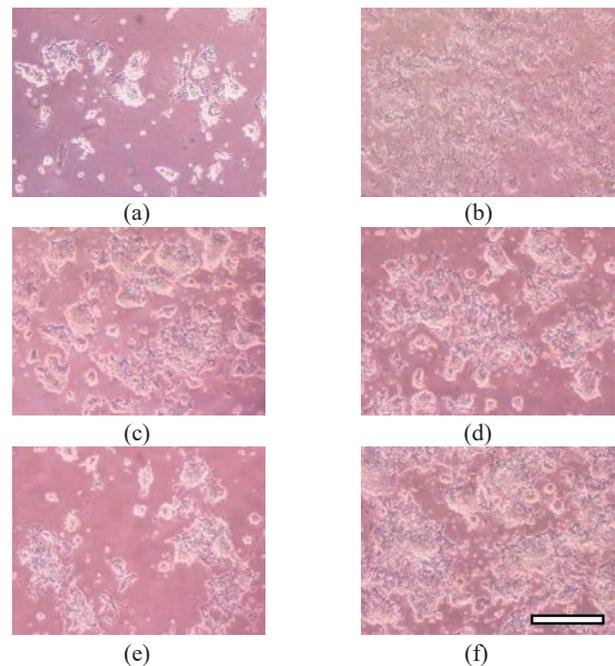


Fig.4 Microscopic images at day3 (Scale bar: 500 μm). (a) control(-), (b) control(+), (c) UV₁₇₂, (d) UV₂₂₂, (e) UV₃₀₈, and (f) UV_{all}.

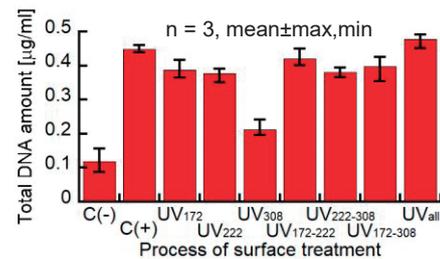


Fig.5 Total DNA amount of mESCs cultured on UV/ozone-treated polystyrene.

4 結論

UV 光のスペクトルを制御して表面改質を施すことで、ポリスチレン基材上に異なる分子結合状態を示す表面を作成可能になることが示唆された。また、波長 172, 222, 308 nm の UV 光を複合させて表面改質を施すことで、C=O の形成が促進され、既存の細胞接着基質をコートした培養法と同等以上のマウス ES 細胞の接着性および増殖性を得られることが明らかとなった。

参考文献

- 1) K. Kasai, et al. Mater Sci Eng C, 78:354-361, (2017).