

《様式B》

研究テーマ 「天然樹脂セラックからの光応答性細胞培養材料の開発」

研究責任者 所属機関名 名古屋工業大学

官職又は役職 准教授

氏 名 水野 稔久 メールアドレス toshitcm@nitech.ac.jp

共同研究者 所属機関名 株式会社 岐阜セラック製造所

官職又は役職 部長

氏 名 森 大輔

(令和5年度募集) 第36回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

これまでに、天然樹脂セラックのオリゴエステル末端カルボキシ基にベンジル基やヘキシル基などの疎水性置換基を導入することで細胞接着性を付与できること、さらに光脱離性の 4-ヒドロキシベンゾイルメチル基へと置換基を変更することで、光照射前は接着性を保持しつつ、照射後に接着性を失う材料の開発にも成功している。しかし、長時間の UV 光照射が必要であり、細胞への光毒性が課題であった。

そこで本研究では、新たな光脱離性置換基としてクマリン誘導体に着目し、7-メトキシクマリン-4-イル (MMC) 基および 7-ジメチルアミノクマリン-4-イル (DEAC) 基を導入したセラック (MMC-shellac、DEAC-shellac) を開発した。溶液状態およびスピンコートフィルム状態において、置換基の光脱離挙動を評価した結果、可視光領域の LED 照射により置換基の脱離が可能な、セラックの開発に成功した。特に DEAC-shellac では、385 nm の LED 光照射で優れた脱離性を示した。

次に、NIH3T3 細胞および A549 細胞を用いて、MMC-shellac および DEAC-shellac のスピンコート膜上での細胞接着性および増殖性を評価した。その結果、いずれのセラックにおいても光照射前は良好な接着・増殖が認められた一方、照射後には接着性が失われた。特に DEAC-shellac は、より短時間の光照射で高い効果を示した。

さらに、DEAC-shellac スピンコート膜上で培養された細胞の光照射による回収実験では、培養後に 385 nm の光を最大 120 分照射することで、NIH3T3 細胞では約 60%、A549 細胞では約 35%の回収が可能であった。また、NIH3T3 細胞は細胞外マトリックスを伴ったまま、A549 細胞は細胞間接着を維持したまま剥離することが確認され、従来あるトリプシンのような加水分解酵素の利用を必要としない、新たな細胞回収技術として利用可能であることが示唆された。

本技術は光照射により培養された細胞の回収が可能な新たな技術であり、産業応用が期待されている。実際に企業と連携し、令和7年度に Go-Tech 事業へ申請し採択された。現在は、細胞培養材料としての社会実装を目指し、引き続き研究開発を進めている。

※ 産業技術として社会実装の可能性や特許出願（予定も含む）の有無についてもご記載ください。

## 2. 実施内容および成果の説明

### 2. 1. メトキシクマリン修飾セラック、ジエチルアミノクマリン修飾セラックの合成

7-メトキシクマリン-4-イル (MMC) 基および 7-ジメチルアミノクマリン-4-イル (DEAC) 基をセラックの末端カルボキシ基へ導入したセラック (MMC-shellac、DEAC-shellac) の合成は、該当するハロゲン体を用いて行い、いずれも約 90% の効率で成功した。目的化合物の合成確認は、ESI-MS 分析により行なった。

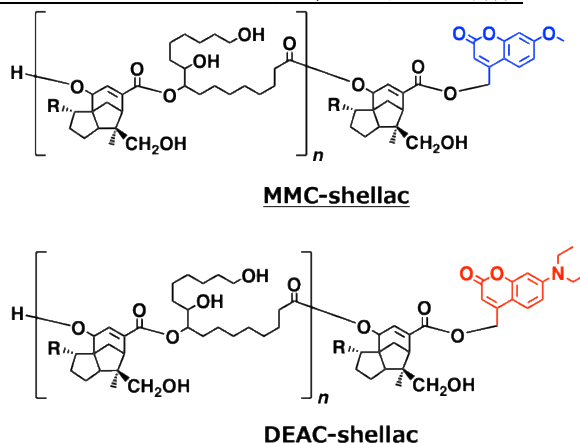


図1 MMC-shellac、DEAC-shellac の化学構造

### 2. 2. メトキシクマリン修飾セラック、ジエチルアミノクマリン修飾セラックからの光照射による置換基の脱離挙動の評価

LED 光照射によるエタノール溶液状態 (～0.1mg/mL) での脱離評価では、MMC-shellac は 340 nm で 24 時間、DEAC-shellac は 385 nm で 2 時間の照射で脱離が確認された。質量分析においても、各 MS ピークが置換基分だけ低分子量側へシフトし元のセラック構造へ回復が確認されたことから、脱離が裏付けられた (図2)。さらに細胞培養基材としての利用を想定し、スピンコート膜 (厚み 10 μm) での評価を行った結果、MMC-shellac では約 1%、DEAC-shellac では約 27% の脱離が確認された。1%程度であっても、光照射を受ける膜表面の置換基の大半は脱離されると推測されるため、接着性低下は可能と考えられる。しかし、完全な接着性消失の観点では DEAC-shellac が優れていると示唆された。

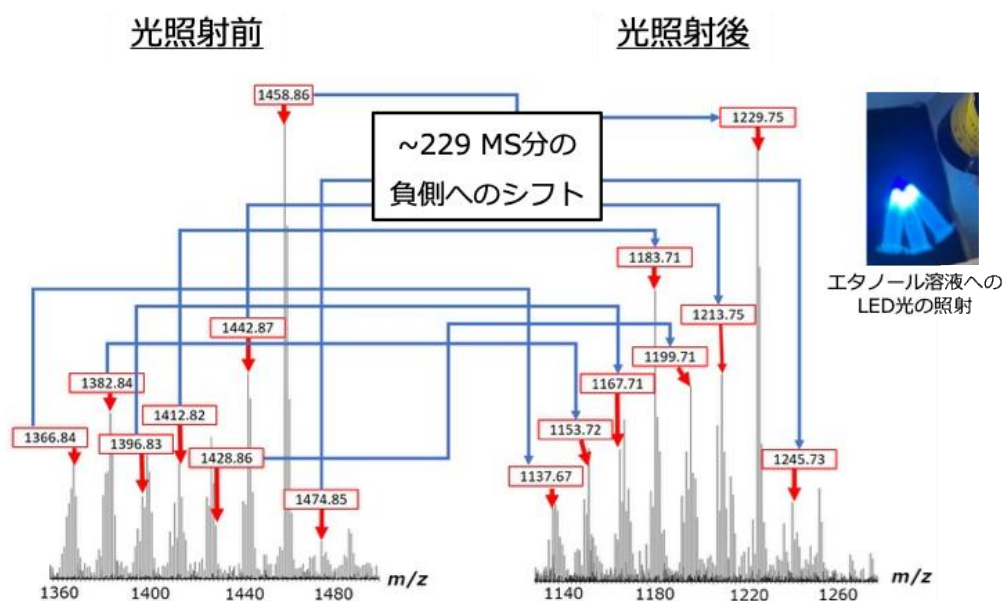


図2 DEAC-shellac への 385 nm の LED 光を 2 時間照射後の MS ピークのシフト

(DEAC 基の分子量分の負側へのシフトが、セラックを構成するオリゴエステル各 MS ピークに対して見られた)

## 2. 3. MMC 修飾セラック、ジエチルアミノクマリン修飾セラックの細胞増殖性の評価

クマリン誘導体の導入されたセラックについても、光照射前についてはベンジル基や、ヒドロキシアセトフェノン基の導入されたセラックと同様に、良好な細胞接着・増殖性を示す一方で、該当する LED 光の照射後には細胞接着・増殖性を失うか評価した。評価を行う哺乳類細胞には、マウス由来線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞、ヒト肺基底上皮腺癌細胞由来の A549 細胞を用いた。

### <実験方法>

メトキシクマリン修飾セラック (MMC-Shellac)、ジエチルアミノクマリン修飾セラック (DEAC-Shellac) を 15mmφ の丸カバーガラスにスピコートし (膜厚は 10  $\mu\text{m}$  程度)、24well プレートにセットした。光未照射サンプルについては、ここへ NIH3T3 細胞あるいは A549 細胞を 5000 cells/well で播種を行い、DMEM 培地 (10%FBS、ペニシリン(終濃度 100 unit/mL)、ストレプトマイシン(終濃度 100  $\mu\text{g/mL}$ )を含む) に浸漬し、5%CO<sub>2</sub> 環境下、37℃ で培養を行った。播種後 1, 3, 5, 7 日後の細胞数は、Cell Counting Kit-8 を利用して決定した。光照射サンプルについては、MMC-Shellac については 340 nm の LED 光を 24 時間、DEAC-Shellac については 385nm の LED 光を 2 時間照射後に DMEM 培地 (10%FBS、ペニシリン(終濃度 100 unit/mL)、ストレプトマイシン(終濃度 100  $\mu\text{g/mL}$ )を含む) を交換し、それぞれの細胞を播種して増殖挙動の比較を行った。

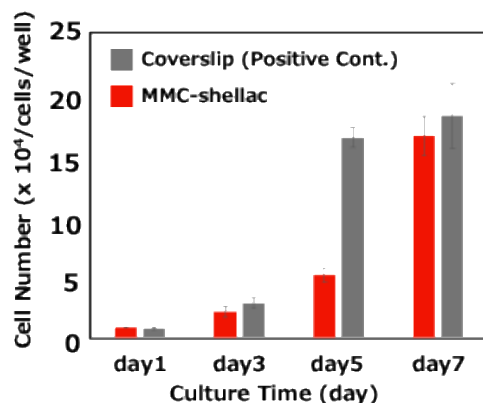


図3 NIH3T3 細胞の光照射前の MMC-Shellac スピコート膜上での増殖挙動の比較

### <実験結果>

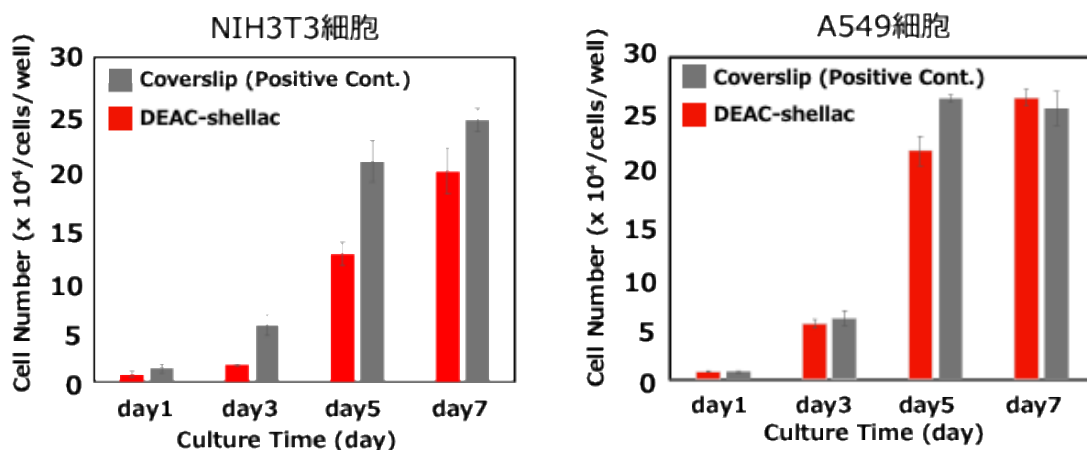


図4 NIH3T3 細胞、A549 細胞の光照射前の DEAC-Shellac スピコート膜上での増殖挙動の比較

図3、図4にあるように、光照射前の MMC-Shellac、DEAC-Shellac スピコート膜については、ポジティブコントロールとなるカバーガラス上と同程度の、良好な細胞接着・増殖性が得られることがわかった。増殖後のサンプルについてグルタルアルデヒドで固定化し、膜透過処理後にクリスタルバイオレッドで染色したところ (図5)、細胞-基質間接着を起こす NIH3T3 細胞、細胞-細胞間接着を起こす A549 細胞に特徴的な細胞の形態・集合状態が見られ、こちらからも MMC-Shellac、DEAC-Shellac スピコート膜上で、良好な細胞増殖がなされていることが確認できた。

一方で図6の結果から MMC-Shellac、DEAC-Shellacともに、光照射後には明らかに細胞接着・増殖性の低下が見られたが、その程度については、DEAC-Shellacでは完全に細胞接着性が失われたのに対して、MMC-Shellacでは若干細胞接着性が残り、用いる光脱離性置換基の感光性が性能に直接影響を与えることがわかった。

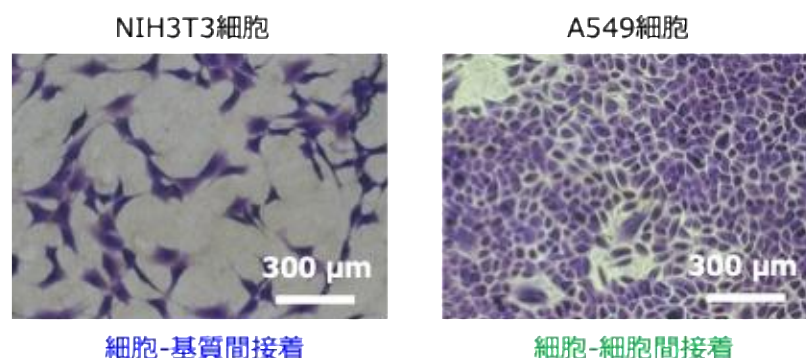


図5 DEAC-Shellac スピンコート膜上で培養された NIH3T3 細胞、A549 細胞の形態・集合状態の評価

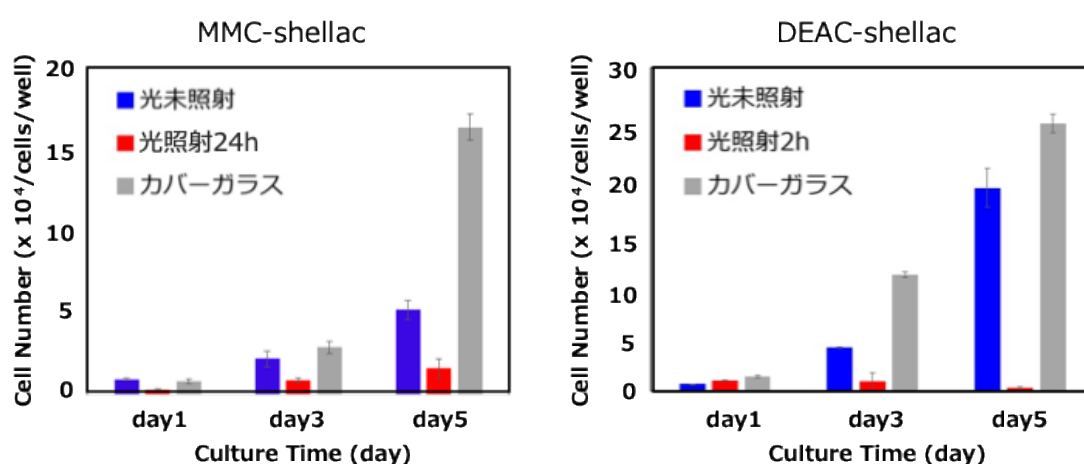


図6 光照射あり、なしでの MMC-shellac、DEAC-Shellac スピンコート膜上での NIH3T3 細胞の増殖挙動の比較

## 2. 4. ジエチルアミノクマリン修飾セラック上で培養された細胞の光による回収実験

引き続き、セラックスピンコート膜上で培養された細胞の、光照射による回収実験に取り組んだ。なお前項での検討から、DEAC-shellac がより短い光照射時間での細胞接着性の On-Off が可能とわかったため、ここでは DEAC-shellac のみを用いて評価を行った。

### <実験方法>

ジエチルアミノクマリン修飾セラック (DEAC-Shellac) を 15mmφ の丸カバーガラスにスピンコートし (膜厚は 10 μm 程度)、24well プレートの底にセットした。ここへ NIH3T3 細胞あるいは A549 細胞を 5000 cells/well で播種を行い、DMEM 培地 (10%FBS、ペニシリン (終濃度 100 unit/mL)、ストレプトマイシン (終濃度 100 μg/mL) を含む) に浸漬し、5%CO<sub>2</sub> 環境下、37℃ で培養を行った。播種後 5 日後サンプルについて、Cell Counting Kit-8 を利用して細胞数の決定を行った。その後、DMEM 培地を、フェノールレッドを含まないものへ置換し、385 nm の LED 光を 15、30、60、90、120 分照射したときに剥がれてくる細胞数を、血球計算板を用いて評価した。

### <実験結果>

図7に、1時間のLED光照射 (385 nm) に伴う DEAC-shellac スピンコート膜からの NIH3T3 細胞の剥離過程の顕微鏡観察結果を示した。こちらから、想定通りに光照射に伴い NIH3T3 細胞が剥がれてくることがわかった。なお興味深いことに、細胞-基質間接着を行う NIH3T3 細胞

が、基質との結合を維持しながら細胞がシート上に、そのまま剥離してくることがわかった。

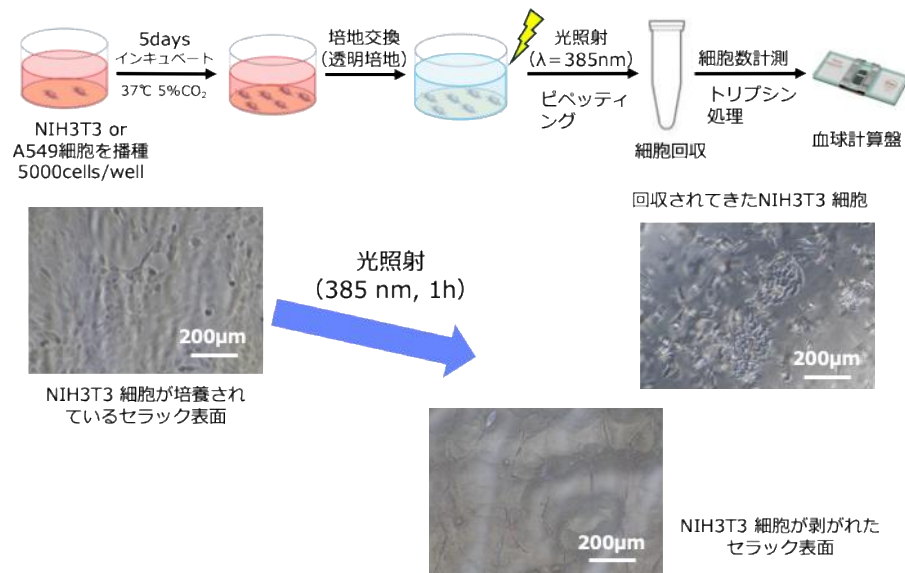


図 7 DEAC-shellac への光照射による NIH3T3 細胞の剥離挙動

光照射時間ごとの細胞の回収割合を測定した結果を、図 8 左にまとめた。光照射時間の増加に伴い、細胞の回収率には上昇が見られ、NIH3T3 細胞については光照射 60 分で 60%程度、A549 細胞では 60 分で 35%程度の細胞回収が可能であった。図 8 右に示すように、A549 細胞についても細胞-細胞間接着が保ったまま細胞がシート上に剥がれてくる挙動が見られ、トリプシン/EDTA で細胞を回収する場合と異なり、細胞外蛋白質の状態を保ったまま、細胞回収が可能な技術として有効であることがわかった。

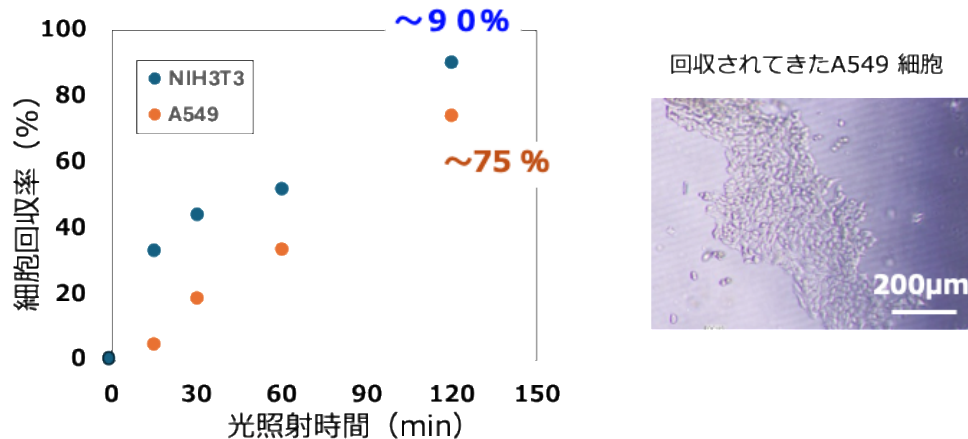


図 8 光照射時間ごとの NIH3T3 細胞、A549 細胞の回収率 (左) と光照射により DEAC-shellac スピンコート膜から剥がれてきた A549 細胞の形状

#### ＜本研究のまとめ＞

元々細胞接着性を持たない天然樹脂セラックをもとに、ここに光脱離性を持った細胞接着性を付与可能な置換基を導入することで、細胞接着性を光照射により失うセラックの開発に成功した。ただし、光脱離性の優れた DEAC-shellac についても、現状 1 時間の光照射で 60%程度の回収率となる点は改善の必要があり、セラック膜の作成方法、光脱離性置換基の変更などの検討に引き続き取り組んでいる。

なお技術的にはまだ改良の余地があったものの、連携先企業である岐阜セラック製造所とともに、令和7年度に成長型中小企業等研究開発支援事業（Go-Tech 事業）への申請を行ったところ、無事にこちらに採択をいただくことができた。現在は、こちらの性能向上を図りつつ社会実装を目指す検討に、引き続き取り組んでいる。