

図1 Cell Sheet Engineering.

我々は培養床の表面をナノテクノロジーを基盤とする方法でインテリジェント化し、温度で表面構造を変化させ、細胞を培養した後に 37°C から 20°C に温度を下げるだけで細胞や細胞シートをその構造と機能を保持したままで剝離・回収することを世界に先駆けて成功させた。温度に応答して構造を変化させるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を 20~30 nm の厚さで表面修飾し、これにより表面が親水性/疎水性の可逆的変化を示すことで細胞の接着/脱着を実現している。2 mm の角膜上皮細胞から直径 20 mm の細胞シートを作製し、移植させることができた。昨年12月より、大阪大学眼科田野教授、西田講師との共同で臨床が開始され革命的な治療が成功した。従来の角膜移植に対しこの再生医療は、より安全に、より効果的に、より簡単に治療することができ、世界的な注目を集めている。また、細胞シートを重層化させ、構造のみならず機能的にも連結させることができ、シャーレの中で拍動し続ける心筋組織を作ることができた。この重層化心筋細胞シートを拡散型心筋症あるいは心筋梗塞の治療に利用できる局面を作り、臨床に向けて研究を進めている。

東京女子医科大学先端生命医科学研究所は、医師と基礎研究者が共同で再生医療を追究しており、角膜、網膜、皮膚、膀胱、尿管、気管、血管、心筋、歯根膜、骨膜、軟骨、肝臓、腎臓、などの再生についてきわめてユニークな成果を上げている。細胞組織の作製は、毒性、薬物毒性や薬効の評価を動物試験に代わって行う新しい可能性があり診断システムの革新的な技術の開発が期待されている。

本年よりハイテクリサーチセンター「細胞シート工学研究センター」と COE 「再生医療センター」がスタートし、今後、益々臨床家の研究への参加が必要になっている。大学院、先端生命医科学専攻への医師と工学研究者の参加を加速させ、再生医療の世界的な拠点形成を目指した研究活動を続けていきたい。

2. パターン化細胞表面の作製とその医療への応用

細胞は集合して組織・臓器を作り高度な機能を発現している。このとき、細胞間の直接的な結合と同時にサイトカインを介するコミュニケーションの役割を知り、それを制御する方法は細胞から組織・臓器を構築するためにきわめて重要である。

異種の細胞を 2 次元表面上でパターン化して培養する方法は、ただ単に異種の細胞を混合して培養することではできなかった新しい共培養システムを達成する点で興味深い。例えば、血管内皮細胞と肝実質細胞をパターン化することによって共培養が初めて可能になる。この方法により、細胞—細胞間の相互作用がより明確になることが期待される。化粧品や薬物の開発に、動物を利用することが次第に制限されてきている中で、機能のユニット構造、いわゆる細胞が集合して組織や臓器の機能を発揮する最小構造をアレイにした細胞チップは次世代型の診断・検査を実現するであろう。毒性試験や薬の機能試験に利用すれば 4 万の動物実験に匹敵する検査を一枚の細胞チップで行うことが可能となるであろう。

3. UV エキシマレーザーを用いた超微細加工

エキシマレーザーによるレーザーアブレーションは現在ではプリント基板の穴加工に用いられているほか、マイクロマシン分野でも広く利用されている光加工技術である。波長が長いレーザーでは発生した熱による変性が主となるが、波長を 200 nm 近くにまで下げると、炭素—炭素間の結合を選択的に切断し、副作用のない微細加工が実現できる。このようなレーザーアブレーションは基本的に非線形であり条件設定が難しいものの、

後述するように適当な条件を決めることができれば、他の方法では得ることのできない超微細加工がきわめて容易に実現できる。

我々は ArF ガスの UV エキシマレーザー（193 nm, 5 ns）を用いて超微細加工を行っている。加工対象は数 μm ～数 10 nm であるため操作はすべて顕微鏡の対物レンズ下で行う。XY 方向を独立に制御できる可変マスクと XY ステージとレーザー発振を同時にマイクロプログラムで制御するコンピューターを用いて、半自動の加工を実現した。

電子線照射により数 nm の厚さで固定化した高分子層を、約 100 nm の深さでレーザーアブレーションすることで、基盤として用いた高分子を再露出させる（図2）。

ここで基盤として用いる高分子と電子線照射により共有結合的に固定化した高分子の化学的性質

を異なったものにしておくことで、化学的性質の異なるマイクロパターンが形成できる。

UV エキシマレーザーの照射条件を最適化することで、高分子の変性といった副作用を生じることなくマイクロパターンを形成することが可能である。ToF-SIMS を用いて、このような副作用が生じないことを確認している（図3）。本方法ではマイクロパターン化表面の洗浄などが必要なく、生体高分子を用いてパターン化グラフト層を作製することもできる。

このマイクロパターン化表面上に細胞を播種すると、マイクロパターンに応じた細胞接着が確認された（図4）。細胞は化学的性質の差異（ここでは高分子の親水性と疎水性の差異）を認識して特異的な接着挙動を示した。アブレーションの深さは 100 nm であり、このような化学的性質の差異がない状態では選択的な接着は生じないことに注意すべきである。

初代肝実質細胞を播種する系では、1辺を 30 μm にした正方形のドメインには1細胞が占拠し、1辺を 50 μm 以上にすると2～3個の細胞が同時に1つのドメインを共有することも明らかになった。

現在、本方法で作製したマイクロパターン化表面を用いて、細胞利用型バイオセンサーの作製を行うと共に、1細胞生物学、オリゴ細胞生物学とも呼ぶべき新領域の創成に向けて努力している。これらの成果についても別の機会に紹介した

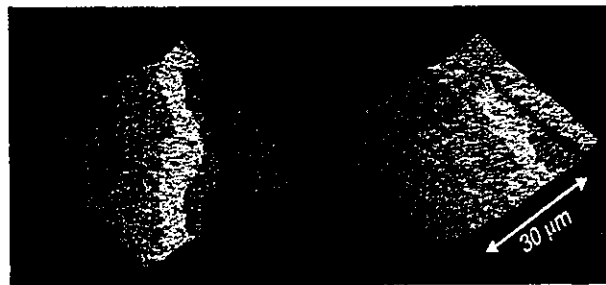


図2 作製したマイクロパターン化表面の3次元プロファイル。約100 nm の深さで均一にアブレーションされていることが分かる。

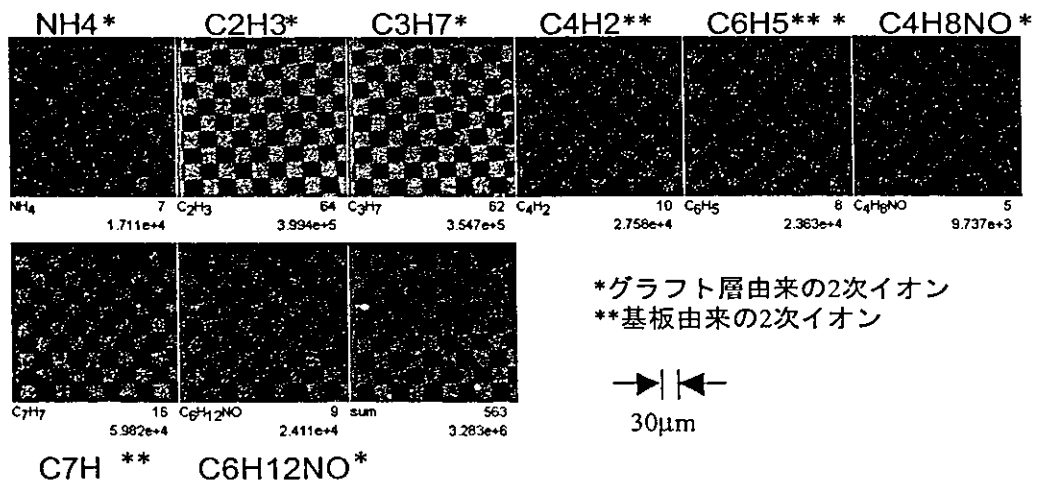


図3 作製したマイクロパターン化表面の ToF-SIMS。両イオンが完全に相補的になっていることが分かる。

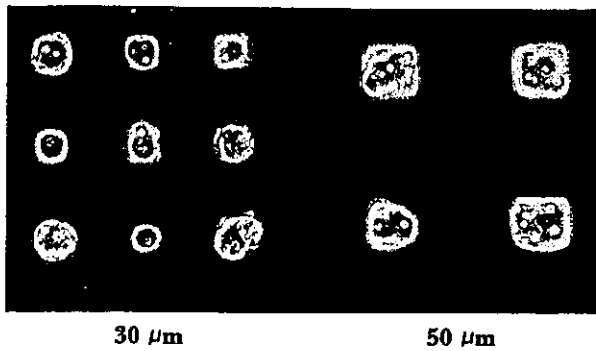


図4 作製したマイクロパターン化表面上に播種した肝実質細胞。

い。

光加工技術はウェットエッチングなどに比べ、はるかに低侵襲性でありバイオとの親和性は非常に良い。今後、さまざまな光加工技術が先進バイオテクノロジーの領域にますます進出していくことを期待している。

4. 温度応答性パターン化表面と共培養細胞シートのマニピュレーション

下限臨界溶液温度 (LCST) の異なるドメインを有する表面を作製した。ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) 表面に円状でサイズの異なるマスクを通して電子線を照射し、疎水性のブチルメタクリレート (BMA) との共重合ドメインを作ると PIPAAm が 32°C に、共重合ドメインが 25°C 付近に LCST を持つようにすることができる。BMA 組成によって LCST は制御可能であるので、自由に LCST の異なるドメインを PIPAAm 上に作るができる。

このパターン化表面で温度制御により表面の疎

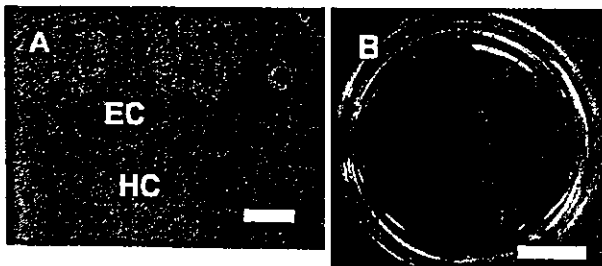


図5 A: Patterned co-culture of hepatocytes (HC) and endothelial cells (EC) on patterned thermo-responsive surface. Scale bar=0.5 mm. B: Lifting co-cultured cell sheet from patterned thermoresponsive surface. Scale bar=1 cm.

水性を変化させ、それぞれのドメインに異なる細胞を播種、培養することができた。すなわち、ラットプライマリ肝細胞を 27°C で培養すると肝細胞は IB ドメインのみに選択的に接着した。続いて内皮細胞を播種し、培養温度を 37°C にすると内皮細胞は疎水性化した PIPAAm ドメインのみに接着し、肝細胞ドメインを内皮細胞の連続層が覆うような共培養を実現できた (図 5-A)。その後培養温度を 20°C に下げ両ドメインを親水性化すると、共培養細胞層を 1 枚のシートとして回収可能であった (図 5-B)。共培養細胞層において、両細胞が接近する部分で細胞機能の亢進が示されたばかりでなく、ドメインサイズを 1 mmφ から 0.5 mmφ に小さくすることで肝細胞は 2 倍以上のアルブミン合成活性を示した。このようにパターン化温度応答性表面を用い、細胞機能を亢進させた共培養組織の構築とシート状での回収ができることが明らかになった。回収共培養シートの重層化によって、より高次の機能を発現する組織を形成、移植することが可能になると考えられる。

参考文献

- 1) 岡野光夫, 大和雅之: 細胞から臓器をつくる. 日経サイエンス, 6: 43-46, 2003
- 2) 岡野光夫, 大和雅之: 組織工学を支える細胞シート工学. 組織培養工学, 27(10): 21-29, 2001
- 3) 大和雅之, 清水達也, 串田 愛, 他: 人工材料を用いた細胞のマニピュレーション—細胞シート工学の創成. 蛋白質 核酸 酵素, 共立出版, 45(13): 2156-2161, 2000
- 4) 大和雅之, 串田 愛, 岡野光夫: 温度応答性インテリジェント培養皿による細胞の接着・脱着制御と細胞シート工学. 蛋白質 核酸 酵素, 共立出版, 45(10): 1776-1772, 2000
- 5) 大和雅之, 岡野光夫: 温度応答性高分子ナノグラフ表面. 蛋白質 核酸 酵素, 48(11): 1602-1608, 2003
- 6) 大和雅之, 岡野光夫: 医療用デバイス・再生医療への挑戦: ナノティッシュエンジニアリング. 機能材料, 22(8): 54-60, 2002
- 7) Yamato M, Konno C, Kushida A, et al: Release of absorbed fibronectin from temperature-responsive culture surfaces requires cellular activity. Biomaterials, 21(10): 981-986, 2000
- 8) 小林 純, 中山幸子, 菊池明彦, 他: カチオン性

- 温度応答性表面による酸性生理活性物質の分離.
医工学治療, **12**(1): 670-676, 2000
- 9) Yamato M, Kwon OH, Hirose M, et al: Novel patterned cell co-culture utilizing thermally responsive grafted polymer surfaces. *J Biomed Mater Res*, **55**: 137-140, 2001
 - 10) Kobayashi J, Kikuchi A, Sakai K, et al: Aqueous chromatography utilizing pH-/temperature-responsive polymers as column matrix surfaces for separation of ionic bioactive compounds. *Anal Chem*, **73**(9): 2027-2033, 2001
 - 11) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al: Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Engineering*, **7**(2): 141-151, 2001
 - 12) Yamato M, Utsumi M, Kushida A, et al: Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by only reducing temperature. *Tissue Engineering*, **7**(4): 473-480, 2001
 - 13) Kanazawa H, Sunamoto T, Ayano E, et al: Temperature-responsive chromatography using poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel-modified silica. *Anal Sci*, **18**: 45-48, 2002
 - 14) Yamato M, Konno C, Utsumi M, et al: Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture. *Biomaterials*, **23**: 561-567, 2002
 - 15) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res*, **60**: 110-117, 2002
 - 16) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*, **90**: e40-e48, 2002
 - 17) Kobayashi J, Kikuchi A, Sakai K, et al: Aqueous chromatography utilizing hydrophobicity-modified anionic temperature-responsive hydrogel for stationary phases. *J Chromatography A*, **958**: 109-119, 2002
 - 18) Kobayashi J, Kikuchi A, Sakai K, et al: Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides. *Anal Chem*, **75**: 3244-3249, 2003
 - 19) Yamato M, Konno C, Koike S, et al: Nanofabrication for micropatterned cell arrays by combining electron beam irradiated polymer-grafting and localized laser ablations. *J Biomed Mater Res*, **67A**: 1065-1071, 2003
 - 20) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al: Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*, **77**(3): 379-385, 2004
 - 21) Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, et al: Control of cell Adhesion and detachment using temperature and thermo-responsive copolymer grafted culture surfaces. *J Biomed Mater Res*, **69A**(1): 70-78, 2004



The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets

Yukiko Tsuda^{a,b}, Akihiko Kikuchi^b, Masayuki Yamato^b, Aiko Nakao^c, Yasuhisa Sakurai^a, Mitsuo Umezu^a, Teruo Okano^{b,*}

^a Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Okubo, Shinjuku, Tokyo 169-8555, Japan

^b Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Centre of Excellence (COE) Program for 21st Century, Tokyo Women's Medical University, CREST, Japan Science and Technology Agency, 8-1 Kawadacho, Shinjuku, Tokyo 162-8666, Japan

^c Beam Application Team, Advanced Development and Supporting Centre (AD&S Centre), RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 315-0198, Japan

Received 10 May 2004; accepted 4 June 2004

Available online 28 July 2004

Abstract

Heterotypic cell interactions are critical to achieve and maintain specific functions in many tissues and organs. We have focused on patterned structure surfaces to enable co-culture of heterotypic cells and recovery of patterned co-cultured cell sheets for applications in tissue engineering. Thermoresponsive polymers exhibiting different transition temperatures in water comprise both poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) and *n*-butyl methacrylate (BMA) co-grafted as side chains to PIPAAm main chains. These copolymers were surface-grafted in patterns to obtain patterned dual thermoresponsive cell culture surfaces using electron beam polymerisation method and porous metal masks. On patterned surfaces, site-selective adhesion on and growth of rat primary hepatocytes (HCs) and bovine carotid endothelial cells (ECs) allowed patterned co-culture, exploiting hydrophobic/hydrophilic surface chemistry regulated by culture temperature as the sole variable. At 27°C, seeded HCs adhered exclusively onto hydrophobic, dehydrated P(IPAAm–BMA) co-grafted domains (1-mm \varnothing area), but not onto neighbouring hydrated PIPAAm domains. Sequentially seeded ECs then adhered exclusively to hydrophobised PIPAAm domains upon increasing culture temperature to 37°C, achieving patterned co-cultures. Reducing culture temperature to 20°C promoted hydration of both polymer-grafted domains, permitting release of the co-cultured, patterned cell monolayers as continuous cell sheets with heterotypic cell interactions. Recovered co-cultured cell sheets can be manipulated, moved and sandwiched with other structures, providing new useful constructs both for basic cell biology research and preparation of tissue-mimicking multi-layer materials through overlaying co-cultured cell sheets.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Thermoresponsive surfaces; Surface patterning; Poly(*N*-isopropylacrylamide); *n*-Butyl methacrylate; Co-culture; Cell culture; Cell sheet

1. Introduction

Living tissues comprise multiple cell types wherein heterotypic cell-to-cell interactions influence and maintain the development of characteristic physiological functions and activities. Monocultures of cells rarely, if ever, manifest the diverse biological properties of living

tissue. To mimic such heterotypic cellular interactions *in vitro*, a wide variety of surface modification technologies are utilised to produce surfaces that locate cells into predetermined arrays in culture. Patterned cell cultures are further applied in cell biology and biotechnology [1]. Surface-modification technologies used in array formation include soft lithography [2,3], photolithography [4–6] and inkjet printing [7]. Cellular functions, including growth, differentiation, and apoptosis may be controlled with the size and shape of cell adhesion areas in culture [2,3,8].

Patterned surface modification techniques are also utilised for co-culture of different cell types. Previous

*Corresponding author. Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Centre of Excellence (COE) Program for 21st Century, Tokyo Women's Medical University, CREST, Japan Science and Technology Agency, 8-1 Kawadacho, Shinjuku, Tokyo 162-8666, Japan. Tel.: +81-3-3353-8112x30233; fax: +81-3-3359-6046.

E-mail address: tokano@abmes.twmu.ac.jp (T. Okano).

reports [1,9] have described enhanced cell functions in heterotypic co-culture over homotypic cell cultures. Capabilities for harvesting and recovering heterotypic co-cultured cell monolayers should be both interesting and useful not only in cell functional assays but also for reconstruction and duplication of complex tissue and organ architectures for regenerative medicine and tissue engineering applications.

Bhatia et al. [1] succeeded in co-culture of two cell types in coordinated patterns of collagen-immobilised glass surfaces prepared by photolithography techniques. Their co-culture procedures, though, were rather complicated to coordinate cells in appropriate domains. Recently, we proposed a simpler patterned surface-modification technique using area-selective electron beam polymerisation of thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) into domains on tissue culture grade polystyrene dishes. Using these patterned PIPAAm-grafted dishes, heterotypic co-culture of two cell types was achieved by modulating culture temperatures [10,11]. Maintaining phenotype and/or improving cell function can be achieved through this co-culture technique by selecting appropriate combinations of two cell types to be co-cultured. Novel surface designs of cell-adhesive chemistry patterned to facilitate surface site-selection of adhesive proteins and cells from media permit patterned co-culture. Analogously, surfaces patterning with thermoresponsive chemistry that exhibits significant surface property alterations with small changes in culture temperature can also be used to patterned co-cultured cell sheets and their application to tissue engineering research.

We have developed new thermoresponsive culture dishes for recovering various types of confluent cultured cell monolayers in single cell sheets and then applied to tissue engineering [12–14]. The thermoresponsive polymer, PIPAAm, shows temperature-dependent soluble/insoluble changes at its lower critical solution temperature of 32°C in aqueous media [15,16]. PIPAAm-grafted surfaces exhibit thermoresponsive hydrophilic/hydrophobic surface property alterations at 32°C, useful as novel modulating surfaces for new aqueous chromatography matrices [17–19], production of viable contiguous cell sheets [20–22], and their exploitation in constructing tissue mimics for further clinical applications [12,13,23,24].

In the present study, we introduce novel patterned dual thermoresponsive surfaces for co-culture and recovery of heterotypic cell types. We recently reported new thermoresponsive surfaces for recovering cells at pre-determined temperatures below the PIPAAm's transition temperature, 32°C, by introducing the hydrophobic monomer, *n*-butyl methacrylate (BMA) into PIPAAm-grafted dishes using electron beam-irradiated copolymerisation [25]. In this study, BMA was polymerised in patterns on PIPAAm-grafted dish surfaces to

form patterned dual thermoresponsive surfaces. Temperature-regulated patterned co-culture of heterotypic cell types are investigated using these patterned thermoresponsive surfaces.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Commercial materials used in modification of culture dishes were obtained as follows: tissue culture polystyrene dishes, Falcon 3001 (35 mm Ø) and 3002 (60 mm Ø) from BD Biosciences (Billerica, MA, USA); *N*-isopropylacrylamide, kind gift from Kohjin (Tokyo, Japan), was purified by recrystallisation from *n*-hexane; BMA from Tokyo Chemical Industries Inc. (Tokyo, Japan) was purified by distillation under reduced pressure and the fraction boiling at 80°C/1 mm Hg was used; 2-propanol for high-performance liquid chromatography grade from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan). Materials used in cell culture studies were purchased from these respective companies: trypsin-ethylenediamine *N,N,N',N'*-tetraacetic acid·2Na (EDTA) solution, and antibiotics (streptomycin and penicillin) were from Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, NY, USA); fetal bovine serum (FBS) from Morgate Exports Pvt. Ltd. (Bulimba, QLD, Australia); bovine serum albumin fraction V (BSA) and Dulbecco's-modified Eagle's medium (DMEM) from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); rabbit anti-rat albumin polyclonal antibody and fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-conjugated goat IgG fraction to rabbit immunoglobulins were from Cappel, ICN Pharmaceuticals Inc. (Aurora, OH, USA); rhodamine-conjugated phalloidin and Hoechst 33258 were from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

2.2. Preparation of patterned thermoresponsive surfaces

Patterned dual thermoresponsive surfaces comprising P(IPAAm–BMA) co-grafted islands of 1 mm Ø within a PIPAAm-grafted surface matrix were prepared as schematically illustrated in Fig. 1. PIPAAm thin grafted layers were initially prepared on TCPS by electron beam irradiation (EB) (0.3 MGy, 150 kV, 10⁻⁵ Torr) using an Area Beam Electron-Processing System (Nissin-High Voltage Co. Ltd., Kyoto, Japan) [20,26]. PIPAAm-grafted dishes were extensively rinsed with cold distilled water, and then dried at 25°C under vacuum. In the second sequential process, a 2 w/w% BMA solution dissolved in 2-propanol (30 µl) was then spread uniformly over previously prepared PIPAAm-grafted surfaces. Aluminium masks with 1 mm-diameter hexagonally arranged patterned circular holes were placed onto the BMA spread PIPAAm surfaces,

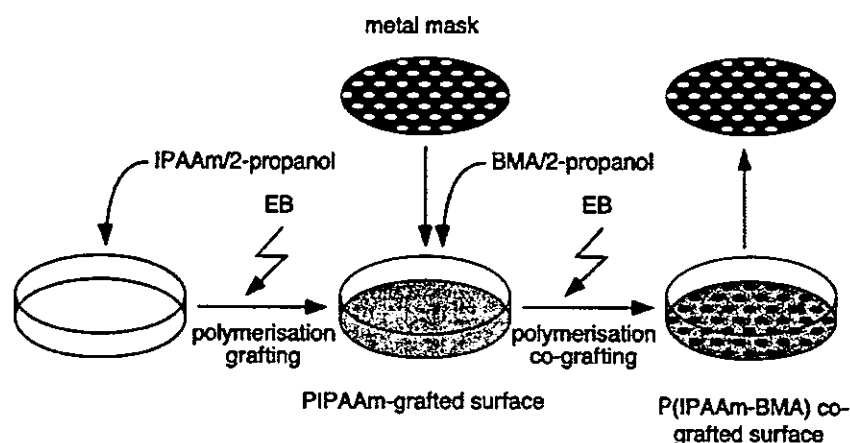


Fig. 1. Schematic diagram for preparation of patterned dual thermoresponsive polymer-grafted culture dishes.

followed by EB irradiation through the masks under identical irradiation conditions. Patterned surfaces were immersed in methanol overnight at 25°C to remove ungrafted BMA, washed with cold distilled water, and dried overnight at 25°C under reduced pressure. Dried dishes were sterilised with ethylene oxide gas prior to cell culture experiments. In addition, analogous homogeneously co-grafted P(IPAAm–BMA) TCPS surfaces were prepared without masks for surface analyses by ATR-FTIR and XPS.

2.3. Quantification of grafted polymers on TCPS surfaces

Grafted PIPAAm on each surface before and after co-grafting BMA was determined from infrared (IR) spectra using an attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectrophotometer (ATR-FTIR, Valor-III equipped with an ATR-500M attachment, Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan) [20,25]. Polystyrene as a base material of the modified surfaces (TCPS) has a strong absorption band attributed to mono-substituted aromatic rings at 1600 cm⁻¹. An absorption for amide carbonyl (amide I) from PIPAAm appears in the region near 1650 cm⁻¹ [20]. The peak intensity ratio (I_{1650}/I_{1600}) was used to determine the amount of PIPAAm or co-grafted polymer on each surface using a calibration curve prepared for a known PIPAAm amount cast on TCPS dishes. An absorption band attributed to an ester carbonyl of BMA appears at 1750 cm⁻¹. However, no distinct absorption was acquired in this region for P(IPAAm–BMA) co-grafted surfaces, probably due to the minute amounts of BMA incorporated. Consequently, the amount of copolymer grafted onto TCPS dishes was correlated to the identical amount of pure PIPAAm in the present research.

2.4. XPS Analyses

P(IPAAm–BMA) co-grafted domains were characterised by angle-resolved X-ray photoelectron spectroscopy (AR-XPS) analyses. Angular-dependent chemical compositions on these surfaces were obtained using ESCALA 250 (Thermo Electron Corporation, West Sussex, England) with an AlK α -X-ray source (1486.6 eV, 300 W). Identification of elements present on the modified surfaces was obtained by wide energy range survey scans at high-scan rates, and then slower high-resolution scans were performed over specific energy ranges for quantification of individual elements. Survey spectra with a binding energy ranging from 0 to 1200 eV were collected at a take-off angle (measured from the substrate) of 90°. High-resolution acquisitions of carbon 1s (C1s) region was conducted with take-off angles ranging from 15° to 75° with respect to the surface to examine distribution of BMA within P(IPAAm–BMA) co-grafted domains in depth profiling.

2.5. Cells and cell culture

Bovine carotid artery endothelial cells (ECs) at passage 14 were purchased from Japan Health Science Foundation (lot no. 121495, Osaka, Japan). The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Cells were used between passages of 17 and 25 for all cell culture and cell detachment experiments. ECs were harvested with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in Ca²⁺- and Mg²⁺-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) and subcultured at a 1:4 split ratio once a week. For co-culture study, rat primary HCs were isolated from 5 week-old male Wistar rats by the modified method of Seglen [27] as previously described using collagenase for cell dissociation [28]. The HCs

isolated in this way always proved to have more than 95% viability as determined by trypan blue dye exclusion tests. Culture medium used for HCs was DMEM supplemented with identical amount of FBS and antibiotics, 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 10 mmol/l nicotinamide, 0.2 mmol/l L-ascorbic acid 2-phosphate, and 1% dimethylsulphoxide [29]. Cell morphology was monitored under a phase contrast microscope (Eclipse TE300; Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (FinePix S1Pro, Fujifilm, Tokyo, Japan).

2.6. Temperature-dependent cellular adhesion areal changes

ECs were plated on patterned surfaces at a cell density of 1.0×10^5 cells/cm² and cultured at 37°C or 27°C with a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 3 days. Culture temperature was then changed, and cell adhesion behaviour of areal changes was monitored as a function of temperature.

2.7. Patterned co-culture and recovery of co-cultured cell sheets

Temperature-regulated pattern co-culture of the two cell types was investigated as follows: rat primary HCs were firstly seeded onto patterned dual thermoresponsive surfaces at 1.0×10^5 cells/cm² at 27°C after pre-incubation of dishes with DMEM including 10% FBS overnight at 27°C. After 5-h culture at 27°C, non-adherent cells were removed by gentle exchange of the culture medium, and then the dishes were allowed to stand at 27°C for 2 days and additionally at 37°C for another 2 days. The next cell type (EC) was then plated onto HC-cultured dishes at 1.0×10^5 cells/cm² and co-cultured at 37°C. All culture processes were carried out with the medium for HCs. Patterned culture dishes were transferred to a CO₂ incubator set at 20°C to examine recovery of 3-day co-cultured cell monolayers as single, continuous cell sheets.

2.8. Immunofluorescent studies on patterned co-culture of HCs and ECs

Cultured cells on the thermoresponsive surfaces were washed three times with PBS at 37°C and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. Solutions were pre-warmed at 37°C to avoid hydration of grafted polymers on dish surfaces. After permeabilisation with 0.5% Triton X-100 in PBS for 2 min, cells were blocked with 0.1% BSA in PBS for 1 h and reacted with a 1:500 dilution of rabbit anti-rat albumin polyclonal antibody (5 mg/ml) at 4°C overnight, followed by incubation with a 1:1000 dilution of goat anti-rabbit antibody labelled with FITC (40 mg/ml) at 25°C for 2 h and finally washed

with 0.05% NaN₃ in PBS. For F-actin staining, cells were double-stained with a 1:100 dilution of rhodamine-conjugated phalloidin (200 U/ml) at 25°C for 2 h. For cell nuclear staining, cells were triple-stained with a 1:500 dilution of DNA-binding dye, Hoechst 33258 (1 mg/ml) at 25°C for 5 min. These stained cells were observed under a fluorescence microscope (TE2000-U; Nikon) utilising equipped filter blocks. Wavelengths of each excitation (λ_{EX}) and emission (λ_{EM}) spectra for Hoechst 33258, FITC and rhodamine-conjugated phalloidin were λ_{EX} : 365 ± 10 nm, λ_{EM} : 400 nm for Hoechst 33258, λ_{EX} : 450–490 nm, λ_{EM} : 520 nm for FITC and λ_{EX} : 510–560 nm, λ_{EM} : 590 nm for rhodamine, respectively, using appropriate light filter units.

3. Results and discussion

3.1. Surface characterisation

Recently, we showed that cell adhesion/detachment control was achieved at lower culture temperature on PIPAAm derivatives copolymerised with hydrophobic monomer, BMA, than that on PIPAAm-grafted surfaces [25]. In this study, patterned dual thermoresponsive surfaces consisting of P(IPAAm–BMA) co-grafted islands and PIPAAm-grafted surface matrix were prepared by EB polymerisation using metal masks to establish patterned co-culture surfaces exploiting hydrophilic/hydrophobic changes from each domain chemistry. On the prepared surfaces, pattern formation of P(IPAAm–BMA) co-grafted islands and PIPAAm matrix was visible immediately after immersion in cold water due differences in surface wettabilities of each domain as seen in Fig. 2.



Fig. 2. Macroscopic view of the prepared patterned dual thermoresponsive surfaces immediately after washing with cold water. Scale bar: 1 cm.

In our previous reports [30,31], amounts of grafted PIPAAm on TCPS dishes was shown to influence thermal regulation of cell adhesion behaviour. On PIPAAm-grafted surfaces with low densities of PIPAAm (less than $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), cells adhere and proliferate as those on TCPS. However, cells also remain adherent: no cell detachment occurs even at 20°C , probably because grafted polymer hydration and subsequent surface property alterations are not sufficient to induce cell detachment at low PIPAAm graft density. On the other hand, cells do not show either adhesion or proliferation on surfaces grafted with more than $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PIPAAm. Amounts of grafted PIPAAm, P(IPAAm-BMA) co-grafted and P(IPAAm-co-BMA) (where IB5 represents 5% BMA mole fraction in monomer feed) were determined by FTIR-ATR measurements and are summarised in Table 1. The FTIR detection limit was $1.5\text{--}3.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ from FTIR standard curve. All surfaces are grafted with approximately $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PIPAAm, co-grafted P(IPAAm-BMA) or IB5 indicating no FTIR-observable differences in amounts of grafted PIPAAm before and after BMA co-grafting. This suggests that initially grafted PIPAAm on TCPS is not destroyed by a second EB sequential irradiation to co-graft BMA segments.

Table 1
Grafted amount of PIPAAm on prepared surfaces determined by ATR-FTIR

Surface	Amount of grafted PIPAAm ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ^a
PIPAAm	1.81 ± 0.05
P(IPAAm-BMA)	1.80 ± 0.04
IB5	2.00 ± 0.02

^aData are expressed as the mean of three samples with standard error of the mean.

Table 2
Angle-dependent compositional changes of IPAAm and BMA on P(IPAAm-BMA) co-grafted thermoresponsive surfaces by angle-resolved XPS analyses

Angle (deg)	Relative depth ($\sin \theta$)	C (%)	O (%)	N (%)	C1s peak composition			$\pi\text{--}\pi^*$ shake-up
					CONH ^a	COO ^a	BMA/IPAAm	
90	1	82.1	11.1	6.3	n.d. ^b	n.d. ^b	—	n.d. ^b
75	0.97	82.2	10.7	7.0	0.12	0.04	—	0.02
60	0.87	82.2	11.2	6.6	0.13	0.02	—	0.02
45	0.71	80.2	12.6	7.3	0.12	0.02	—	0.02
30	0.50	78.7	12.4	8.9	0.17	0.09	0.53	n.d. ^b
25	0.42	79.3	12.5	8.2	0.18	0.03	0.17	n.d. ^b
20	0.34	78.6	12.2	9.2	0.18	0.06	0.33	n.d. ^b
15	0.26	78.4	12.2	9.4	0.19	0.04	0.21	n.d. ^b
Calcd. ^c		74.6	13.1	12.4				—

^aDetermined by peak deconvolution of C1s.

^bn.d.: not detected.

^cCalculated surface atomic composition for co-grafted polymers in bulk.

Surface elemental analyses of P(IPAAm-BMA) co-grafting were assessed by AR-XPS (detection limit $\sim 0.1\text{at}\%$), an effective method to determine surface compositional depth profiles in the copolymer film surfaces without etching them [32,33]. Angular-dependent chemical compositions are summarised in Table 2. The $\pi\text{--}\pi^*$ shake-up peak originating from the base TCPS polystyrene substrate is apparent from 292 to 296 eV. This spectrum is a composite of the boundary layer between P(IPAAm-BMA) co-grafted layers and polystyrene. Since the $\pi\text{--}\pi^*$ shake-up peaks were detected by AR-XPS between 45° and 75° take-off angles, data obtained at $15\text{--}30^\circ$ take-off angles were used to analyse surface chemical compositions for P(IPAAm-BMA) co-grafted dishes. Only three (i.e., C, N and O) elements were detected, indicating that patterned, grafted domains consist of IPAAm and BMA units on the polystyrene base substrate and other substances do not contaminate the EB grafting process. Distribution of IPAAm and BMA within the P(IPAAm-BMA) co-grafted domains in depth profiling was determined by high-resolution C1s signals. The amide carbonyl originating from IPAAm and ester carbonyl from BMA side chains exhibit different C1s binding energy. The chemical compositional fraction of each monomer unit in the grafted layers is identified through the C1s peak deconvolution at each take-off angle. Depth profiling of P(IPAAm-BMA) co-grafted surfaces revealed that IPAAm sequences were concentrated near the air-substrate interface while BMA sequences were higher abundance near the polystyrene interface. This phenomenon is quite interesting since relatively hydrophilic IPAAm but not hydrophobic BMA sequences are distributed more to the air side. Samples were dried under vacuum after extensive water wash, which should influence the obtained XPS results.

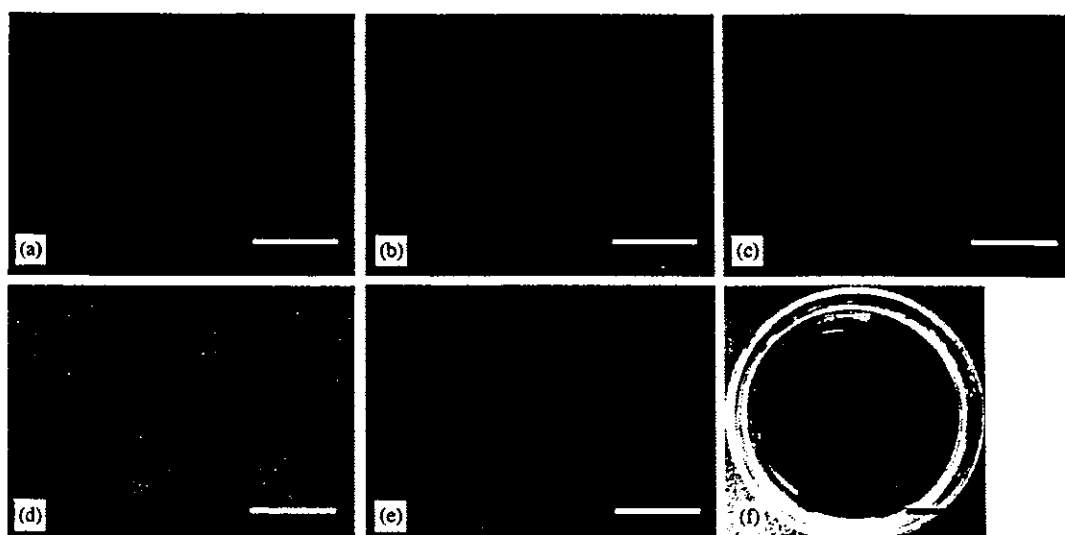


Fig. 3. Temperature-regulated adhesion of ECs onto patterned dual thermoresponsive surfaces: (a) patterned metal mask with 1 mm \varnothing holes. EC morphologies cultured on pattern-grafted dishes for 3 days, (b) at 37°C, and (c) at 27°C; (d) grown ECs on P(IPAAm-BMA) co-grafted domains 1 day after transfer to 37°C; (e) complete surface coverage of ECs after 3 days at 37°C; (f) reducing culture temperature leads to spontaneous cell monolayer detachment from hydrated culture surfaces. Scale bars: (a)–(e) 1 mm, and (f) 1 cm.

In culture, the majority of IPAAm sequences preferentially distribute to the water interface in order to show surface thermoresponsive nature, while BMA units may act to anchor and restrict the mobility of PIPAAm chains and to increase the hydrophobicity of PIPAAm chains. Such a characteristic may have a crucial role in cell adhesion and lifting behaviour as will be discussed in the following section.

3.2. Temperature-regulated site-selective EC adhesion

Patterned dual thermoresponsive surfaces were then used to investigate cell adhesion behaviour depending on culture temperature. ECs were seeded at a density of 1.0×10^5 cells/cm² onto patterned surfaces, and cultured at temperatures of 37°C and 27°C, respectively, for 3 days. Cells cultured at 37°C adhere completely over the surface without preference for different grafted polymers, indicating that both surface domains exhibit relatively hydrophobic states (Fig. 3b), whereas at 27°C cells adhere only onto P(IPAAm-BMA) co-grafted domains with no cell adherent to hydrated PIPAAm regions (Fig. 3c). Since BMA units restrict PIPAAm chain mobility and also increase chain hydrophobicity, P(IPAAm-BMA) co-grafted domains adsorb serum proteins that facilitate cell adhesive characteristics. Therefore, site-selective cell adhesion on these patterned dual thermoresponsive surfaces is regulated with surface hydrophobicity, depending on culture temperature.

Patterned TCPS dishes cultured cells only on P(IPAAm-BMA) co-grafted domains at 27°C. These dishes were then transferred to an incubator thermo-

stated at 37°C to observe how cells behave on the patterned dual thermoresponsive surfaces. One day after the temperature change, cells started to proliferate, expanding into areas beyond the initially occupied circular P(IPAAm-BMA) co-grafted domains (Fig. 3d). This expansion into the matrix occurred because cell repellent PIPAAm at lower temperature becomes dehydrated and hydrophobised at the elevated temperature, and both domains are then cell adhesive. Eventually, cells cover the entire surface to reach confluence (Fig. 3e). These confluent cell monolayers on the patterned thermoresponsive surfaces then can be detached as a tissue-like cell sheet by reducing culture temperature again from 37°C to 20°C where both surface chemistries become hydrophilic and no longer cell-adhesive (Fig. 3f). According to the XPS data, IPAAm sequences concentrated at the TCPS surface, adjacent to adherent cell monolayers, consistent with their ability to force adherent cells from the surface upon hydration. Selective cell adhesion on the desired regions of the patterned surfaces and recovery of confluent cultured cell monolayers were achieved simply by regulating culture temperature.

3.3. Patterned co-culture of two cell types

By exploiting these temperature-dependent surface property alterations, patterned co-culture of HCs and ECs on the patterned dual thermoresponsive surfaces was then performed. Seeded rat primary HCs adhered only onto relatively hydrophobic P(IPAAm-BMA) co-grafted domains without cells adhered onto the PIPAAm-grafted matrix at 27°C in an initial 5-h culture

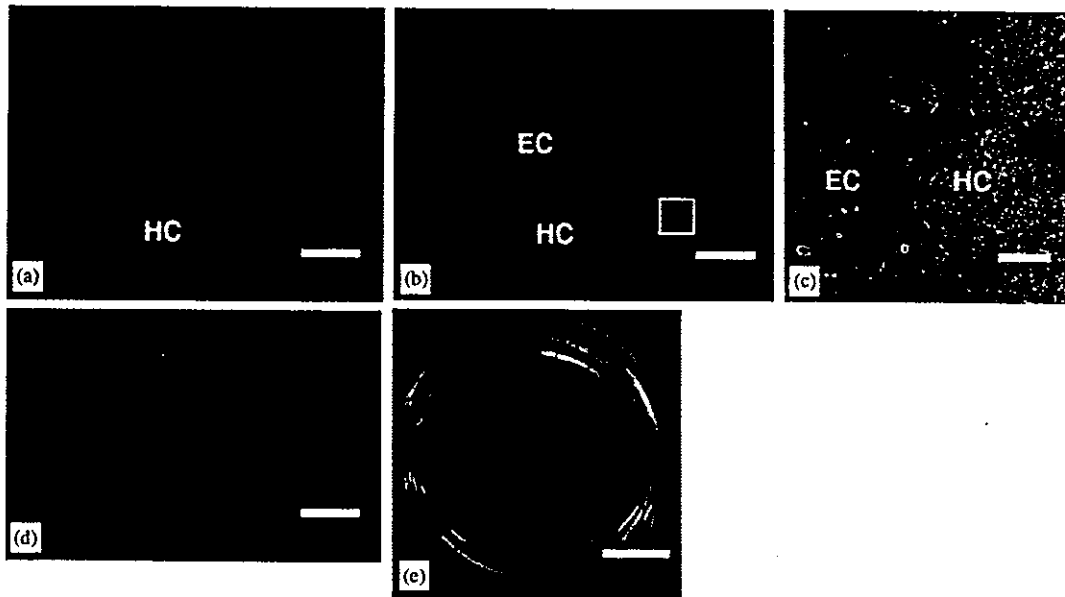


Fig. 4. Patterned co-culture of HCs and ECs: (a) Selective adhesion of rat primary HCs onto P(IPAAm-BMA) co-grafted domains cultured at 27°C for 2 days and then at 37°C for additional 2 days. (b) Sequentially seeded ECs adhere to hydrophobised PIPAAm regions and co-culture with pre-seeded HCs at 37°C into organised patterns. (c) Magnified view of the periphery of patterned co-cultures (square region in (b)). (d) Reducing culture temperature to 20°C induces spontaneous detachment of the patterned co-cultured cell monolayer. (e) Macroscopic view of detaching co-cultured cell monolayer from patterned dishes. Scale bars: (a), (b) and (d): 0.5 mm, (c): 0.2 mm, and (e): 1 cm.

period. After an additional 2-day culture at 27°C, the temperature was then raised to 37°C in order to promote seeded HC spreading, and P(IPAAm-BMA) co-grafted domains were completely covered with HCs with intercellular interactions (Fig. 4a). Rapid proliferating cells such as ECs and fibroblasts tend to proliferate beyond P(IPAAm-BMA) co-grafted domains with increased culture temperature to 37°C. However, rat primary HCs did not rapidly proliferate and kept within the circular P(IPAAm-BMA) co-grafted domains even after the additional 2-day culture at 37°C. The second cell type (ECs) was then seeded onto HC-preadhered patterned surfaces. These ECs adhered and spread only onto hydrophobised PIPAAm-grafted regions at 37°C where no HCs were present. Finally, successful co-culture of HCs and ECs in coordinated monolayer patterns was achieved (Figs. 4b and c).

Patterned co-culture with opposite cell seeding order (ECs as primary cell type and HCs as the secondary) was also investigated. After ECs covered P(IPAAm-BMA) co-grafted islands at 27°C, rat primary HCs were seeded and cultured at 37°C. It is of interest that HCs, unlike ECs, did not distinguish the PIPAAm-grafted and EC-preadhered P(IPAAm-BMA) co-grafted domains, and adhered not only to hydrophobised PIPAAm matrices but also onto pre-cultured ECs. As the co-culture was extended, ECs started proliferating, expanding the area over the P(IPAAm-BMA) co-grafted domains. Finally, HCs were randomly scattered onto EC cultures. Yet, it was difficult to place two cell types into each desired

domain with this cell seeding order. Reasons why HCs tend to adhere onto EC monolayers has not been resolved.

Co-cultured cell monolayers, shown in Figs. 4b and c, completely detached from patterned dual thermoresponsive dishes as contiguous cell sheets readily using only low temperature incubation at 20°C, producing uniformly non-cell adhesive polymer-grafted domains across the surface (Figs. 4d and e). While no direct interactions occur between endogenous sinusoidal ECs and HCs in native liver tissues, cultured co-planar ECs and HCs on these patterned surfaces remain connected to each other using intact extracellular matrices secreted below them. Therefore, these two cell types are recovered as a connected cell monolayer.

3.4. Immunofluorescent studies on patterned co-cultures of HCs and ECs

To confirm site-selective adhesion of HCs and ECs on patterned surfaces, co-cultured cells (Fig. 5a) were triple-stained with rhodamine-conjugated phalloidin for F-actin, FITC-conjugated anti-rat albumin antibody for HCs, and Hoechst 33258 for nuclei of both cell types. Albumin-expressing HCs were detected with green fluorescence shown in Fig. 5b. Albumin synthesis is not detected in EC-adhered domains: these two cell domains were fluorescently distinct, indicating successful co-culture of HCs and ECs without invasion of each cell type into different domains. In our system, the first

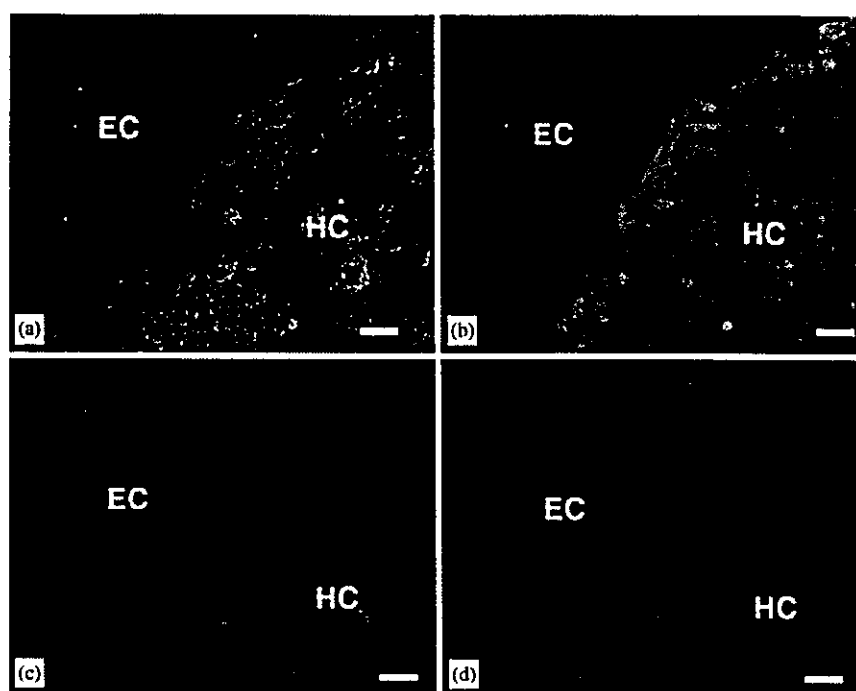


Fig. 5. Fluorescence micrographs of co-cultured cells 3 days after EC seeding. (a) Phase contrast. (b) Albumin-positive HCs (green fluorescence immunostaining) with albumin-negative ECs. (c) Nuclei staining of both cell types with Hoechst 33258 (blue). (d) Cytoskeletal actin microfilaments stained in both cell types with rhodamine-phalloidin (red). Scale bars: 100 μm .

cells were seeded at 27°C and cultured for 2 days. Cultured HCs were considered to be damaged during culture at this low-temperature incubation: HCs spread well after transfer back to the incubator set at 37°C and required co-culture up to 12–14 days to achieve cell densities equivalent to HC monoculture systems that typically occur in 6–8 days. These cells also show albumin synthesis by in situ fluorescent staining, suggesting that the cells were not irreversibly damaged during culture at 27°C for 2 days.

4. Conclusions

Results show that our patterned dual thermoresponsive surfaces permit full recovery of co-cultured cell sheets by changing surface hydrophilic/hydrophobic characteristics using culture temperature. This system should prove suitable for tissue engineering to construct complicated tissues through overlaying patterned co-cultured cell sheets. In addition, patterned surface modification using EB processes and metal masks in the present study is simple and rapid. Improved control of cell orientation and ratios of different cell types in the monolayer is essential for further applications. Patterning of surfaces with a variety of domain sizes, area fractions and shapes should be achieved by using arbitrary designed masks. Construction of tissue-like

constructs having more elaborate structures should then be possible.

Acknowledgements

The authors are grateful to Professor David W. Grainger, Colorado State University, for his valuable comments and discussions throughout this research. The present research was financially supported in part by the Grant-in-Aid for Scientific Research A (Grant No. 13308055) from the Japan Society for Promotion of Science, and by the Grant-in-Aid for “The Centre for Tissue Engineering and Regenerative Medicine” in the COE Program for the 21st Century, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

References

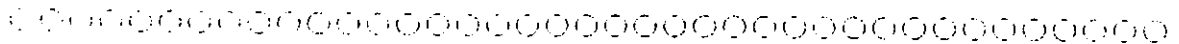
- [1] Bhatia S, Balis U, Yarmush M, Toner M. Effect of cell–cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13: 1883–900.
- [2] Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DID, Whitesides GM, Ingber DE. Engineering cell shape and function. *Science* 1994;264:696–8.

- [3] Lu L, Kam L, Hasenbein M, Nyalakonda K, Bizios R, Gopferich A, Young JF, Mikos AG. Retinal pigment epithelial cell function on substrates with chemically micropatterned surfaces. *Biomaterials* 1999;20:2351–61.
- [4] Sugawara T, Matsuda T. Photochemical surface derivatisation of a peptide containing Arg–Gly–Asp (RGD). *J Biomed Mater Res* 1995;29:1047–52.
- [5] Ito Y, Chen G, Guan Y, Imanishi Y. Patterned immobilisation of thermoresponsive polymer. *Langmuir* 1997;13:2756–9.
- [6] Bhatia S, Yarmush M, Toner M. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;34:189–99.
- [7] Roth EA, Xu T, Das M, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Inkjet printing for high-throughput cell patterning. *Biomaterials* 2004;25:3707–15.
- [8] Kane RS, Takayama S, Ostuni E, Ingber DE, Whitesides GM. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999;20:2363–76.
- [9] LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A. Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Adv Drug Deliver Rev* 1996;22:133–86.
- [10] Yamato M, Kwon OH, Hirose M, Kikuchi A, Okano T. Novel patterned cell coculture utilising thermally responsive grafted polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;55:137–40.
- [11] Yamato M, Konno C, Utsumi M, Kikuchi A, Okano T. Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture. *Biomaterials* 2002;23:561–7.
- [12] Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002;90:e40–8.
- [13] Harimoto M, Yamato M, Hirose M, Takahashi C, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilising temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 2002;62:464–70.
- [14] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 2003;24:2309–16.
- [15] Heskins M, Guillet JE, James E. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci Chem* 1968;A2:1441–5.
- [16] Bae YH, Okano T, Kim SW. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(*N,N*-alkyl substituted acrylamides) in water. *J Polym Sci: Polym Phys* 1990;28:923–36.
- [17] Kanazawa H, Yamamoto K, Matsushima Y, Takai N, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive chromatography using poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified silica. *Anal Chem* 1996;68:100–5.
- [18] Kikuchi A, Okano T. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phase for aqueous chromatography of biological compounds. *Prog Polym Sci* 2002;27:1165–93.
- [19] Malmstadt N, Yager P, Hoffman AS, Stayton PS. A smart microfluidic affinity chromatography matrix composed of poly(*N*-isopropylacrylamide)-coated beads. *Anal Chem* 2003;75:2943–9.
- [20] Kikuchi A, Okuhara M, Karikusa F, Sakurai Y, Okano T. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci: Polym Ed* 1998;9:1331–48.
- [21] Hirose M, Kwon OH, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* 2000;1:377–81.
- [22] Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;54:37–46.
- [23] Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng* 2001;7:473–80.
- [24] Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003;22:S28–34.
- [25] Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Umezumi M, Okano T. Control of cell adhesion and detachment using temperature and thermoresponsive copolymer grafted culture surfaces. *J Biomed Mater Res* 2004;69A:70–8.
- [26] Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymer surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem: Rapid Commun* 1990;11:571–6.
- [27] Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells. *Method Cell Biol* 1976;13:29–83.
- [28] Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 1993;27:1243–51.
- [29] Tateno C, Yoshizato K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol* 1996;148:383–92.
- [30] Sakai H, Doi Y, Okano T, Yamada N, Sakurai Y. Thermo-responsive polymer surfaces for cell culture: analysis of the surfaces and control of the cell attachment/detachment. In: Ogata N, Kim SW, Feijen J, Okano T, editors. *Advanced biomaterials in biomedical engineering and drug delivery systems*. Tokyo: Springer; 1996. p. 229–30.
- [31] Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Ultra thin poly(*N*-isopropylacrylamide) grafted layer on poly(styrene) surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir* 2004;20:5506–11.
- [32] Childs MA, Matlock DD, Dorgan JR. Surface morphology of poly(caprolactone)-*b*-poly(dimethylsiloxane)-*b*-poly(caprolactone) copolymers: effects on protein adsorption. *Biomacromolecules* 2001;2:526–37.
- [33] Briggs D, Seah MP. *Practical surface analysis*, vol. 1, 2nd ed. Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy. Abington: Wiley; 1990.

消化器組織構築の バイオマテリアル

大和 雅之 (Yamato, Masayuki) *1, 岡野 光夫 (Okano, Teruo) *2

*1 東京女子医科大学先端生命医科学研究所助教授, *2 同先端生命医科学研究所教授



はじめに

組織工学(ティッシュ・エンジニアリング)は、当時ハーバード大学の子供病院の消化器外科医であったジョセフ・ヴァカンティとマサチューセッツ工科大学の化学者ロバート・ランガーが共同で1980年代後半に提出した新しいコンセプトである。1993年に両者の共著による“Tissue Engineering”と題された総説がサイエンス誌に掲載され¹⁾、米国では組織工学研究が大きなブームとなった。ヒトの耳を背中に背負ったネズミ(ヌードマウス)の写真はLIFE誌紙面を飾り、日本でも度重なり報道された(図1)。

このコンセプトが提案された当時は幹細胞に対する研究・理解が十分でなく、むしろバイオマテリアルとして総称される材料研究が主体であった。しかし、その後の幹細胞研究の圧倒的な進歩により、組織工学は組織再生のための材料研究と幹細胞研究の2輪からなる包括的な研究体系を意味するようになってきている。最近では、再生医療

(リジェネラティブ・メディスン)という言葉も広く用いられるようになった。しかし、再生医療には、組織構造をとまなわない細胞移植(細胞懸濁液の患部への注射)や、細胞成長因子の徐放化製剤投与、遺伝子治療などの細胞を使わないさまざまな治療技術も含まれるため、厳密には組織工学は再生医療の基盤技術の1つと考えるべきである。われわれは、組織工学は培養細胞を用いて組織構造を人工的に再構築するための集学的な技術体系と定義されるべきだと考えている。

生分解性高分子を利用する 第1世代型組織工学

ネズミの背中に背負われたヒトの耳に代表される第1世代型技術の根幹をなすのは、一般に生分解性高分子と総称される素材である。組織工学が提案される1980年代後半にはすでに数多くの臨床応用が行われていた造血幹細胞移植や培養表皮移植では、細胞懸濁液やたかだか数百ミクロンという非常に薄い組織が移植されるのであり、表

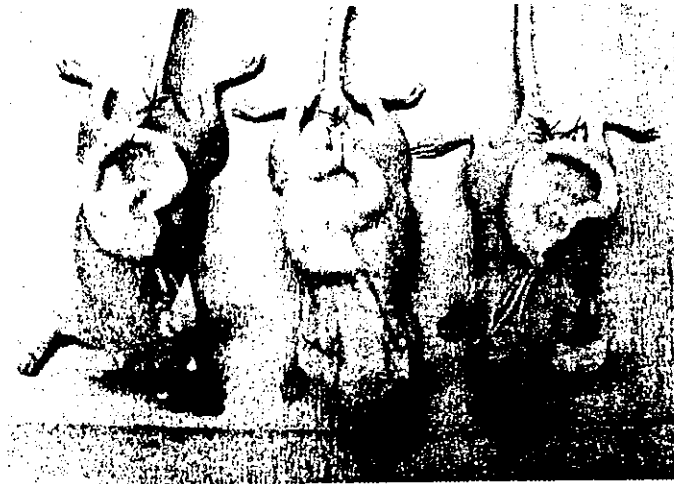


図1 ヒトの耳を背中に乗せたラット

(東京女子医科大学寺田伸一博士提供)

皮細胞の重層化は細胞自身もつ自己組織化能のみに頼っていた。これに対し、最低でも1ミリメートル程度の厚みを求めたい骨・軟骨や肝臓などの臓器では、細胞の自己組織化能のみに頼ることができないため、積極的に厚みのある組織構造を再建する手立てが必要である。ここで、その方法として高分子製の足場を用いることを提案したのがヴァカンティとランガーの大きな功績である。

ネズミの背中に乗ったヒトの耳は、ヒトの耳の形に成形した生分解性高分子製の足場に軟骨細胞を播種し、培養した後に生体へと移植する²⁾。事実上ほとんどすべての人工高分子が体内への埋入後に異物として認識され、炎症反応や線維組織によるカプセル化が生じ、ホストの身体にインテグレートされることはない。しかし、ポリ乳酸やポリグリコール酸などの生分解性高分子は体内で溶解モノマーが吸収されるか、あるいは腎排泄されるため、このような異物反応を最少に留めうる可能性がある。実際、これらの素材からなる縫合糸はすでに広く利用されている。

生分解性高分子はある一定の半減期で分解し、消失するが、その間に足場に播種された細胞やホスト由来の細胞が合成・分泌したコラーゲンや

ロテオグリカンなどの細胞外マトリックスと置換されることになるため、足場どおりの形を再現した組織が再生することが期待できる。ここで生分解性高分子の分解・消失速度と細胞による細胞外マトリックスの産生速度がうまく対応していないと形が崩れることになる。細胞外マトリックス産生速度は細胞数や細胞の活性に支配されているため、さまざまな精力的な研究にもかかわらず、理想的な組織再生条件は確立されていない。安定的な臨床成果を確実に得ることが必須の課題である臨床応用に際して、この問題を解決することは不可避であり、次世代再生医工学のテクノロジーとして最も早急にとりくむべき課題である。生分解性高分子と細胞の双方に関する探究と知見の蓄積が必要である。このほかにも現行の生分解性高分子には問題が少なくない。たとえば、ポリ乳酸やポリグリコール酸などの生分解性素材は非常に硬く、心臓や消化管などの伸縮性が要求される組織(現実には、骨・軟骨以外のすべての組織といっ

てよい)では伸縮性と生分解性を併せもった高分子の開発が求められている³⁾。

このような第1世代型の組織工学技術で作製できることが示されているのは、皮膚、血管⁴⁾、

心臓弁³⁾, 軟骨, 骨, 気管⁴⁾, 膀胱⁵⁾などの比較的単純な組織学的構造をもつ組織である。ヴァカンティらは生分解性高分子で作ったチューブに新生ラットから単離した腸管上皮細胞を播種し, 生体に移植することで小腸や大腸様の組織構造を再生できることを示し, 実際に吻合を行っている⁶⁾。現状ではラットを用いた実験であるが, 同様の方法で大型動物の大きな腸管が成体由来の細胞で再生できるかは興味もたれるところである。

ただし, このような組織であってもほとんど臨床応用されていない事実を忘れることはできない。最初に作られてからすでに20年近くが経過する耳でさえ, 米国では1例のヒト臨床もされていない(中国では20例以上の臨床応用があることが報告されている)。米国ではFDAの認可なしにこのような新技術のヒト臨床応用を行うことはできないことが原因の1つではあるが, このことはすなわち, FDAの承認を得るだけのデータが蓄積されていないことを意味している。

受動的足場から能動的足場へ

組織工学が提唱された当初は, 幹細胞に関する理解が大幅に欠けていたこともあり, ①細胞, ②足場, ③細胞成長因子の3つの構成要素の重要性が声高に指摘されてきた。しかし, われわれは以下に述べる理由から, これら3大要素を①幹細胞の供給, ②宿主血管系との接続, ③宿主神経系との接続の3つの観点から再考すべきであると考えている。

現行の心臓移植や肝臓移植では神経の接続なしで十分満足のいく結果が得られているが, 泌尿器系や消化管系では神経系の再生は重要である。コラーゲンと合成高分子からなる人工角膜実質を開発してきたメイ・グリフィスらは, 神経細胞接着性ペプチドとして知られるラミニン由来配列であるYIGSRを導入することで, ドナー由来の角膜を用いてさえ決して観察されることのない早期の神経細胞の進入が得られたことを報告している⁷⁾。

このような知見は角膜実質に限らず, ほかの神経系の導入が必要な組織の再生に用いる高分子製足場のデザインにおいても活用すべきであろう。

幹細胞については以下のような考察が重要であると考えられる。最初の組織工学といえる培養表皮の作製技術は1975年には確立しており, 1981年にヒト臨床応用に成功した。これまでに, 重層化扁平上皮組織の幹細胞に関する理解は, 最も進んでいた造血幹細胞に次いで蓄積されていた。重度熱傷であれ母斑の治療であれ, 患部の周囲や最悪の場合でも腋下などに正常皮膚が残存しており, 長期的には, この部位に温存している幹細胞の患部への進入に期待することができる。一方, スチーブンス・ジョンソン症候群などの角膜上皮幹細胞疲弊症では, 幹細胞は完全に消失しているため, 幹細胞の移植と生着が成功しないかぎり治療効果は得られない。すべての再生医療は, 幹細胞が完全に枯渇している極限から, 組織中に幹細胞が潤沢に存在している逆の極限までの1次元的なスペクトルのいずれかの点に存在しており, それぞれの位置に応じて, 併せて用いられるバイオマテリアルへの要求が大きく異なりうる。たとえば短腸症候群の治療や, 術中に失われた短い腸管の代替物として組織工学技術を活用することを考えた場合, 正常な組織中に存在する幹細胞の組織工学を用いて作製したコンストラクトへの進入が期待できる可能性がある。しかし重症肝不全などで肝実質細胞の大半が消失している場合, 肝臓中の組織幹細胞に期待することは望めそうにないようである。

このような背景のもと, 単に細胞集団に組織固有の形態を与え, 細胞が合成・分泌する細胞外マトリックスと置換するだけの従来型の生分解性高分子製足場という受動的な存在から, 積極的に幹細胞に働きかけ, 組織再生に貢献するさまざまな生理活性を有する能動的な足場の開発が強く希求されている。そのためにも, 消化器領域の再生医療を真に推進していくことを目指した, 対象組織

の幹細胞に関する理解の十分な蓄積が必須であるように思われる。

ジェフ・ハッブルは、フィブリンの骨格に細胞接着性ペプチドを固定化して細胞接着性を向上させた上に、種々の細胞成長因子を特殊なリンカーを介して固定化した次世代型の足場の開発を行い、目覚ましい成果を上げている¹⁰⁾。ここで用いられているリンカーは、移植部位に局在することが期待されるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の基質となるアミノ酸配列を有するペプチドであり、組織中でリンカーが分解され細胞成長因子の徐放が可能になるという巧妙なシステムである。

毛細血管網の導入

第1世代型組織工学の対象組織は、圧倒的に大量の細胞外マトリックスを主成分とし、細胞成分を非常に少量しか含まないため毛細血管系の要求性が非常に小さい。次世代型の組織では、むしろ細胞成分が主体であり、これらの細胞成分に酸素や栄養を供給し老廃物を除去するうえでも、またその生理学的機能を遂行するうえでも毛細血管系の導入、再生は必須である。毛細血管網を単独に再生することは、VEGFやbFGFの徐放を用いれば、生体内では不可能ではない。しかし、移植の対象になるような大きな組織を培養系で作製しようとする、これら毛細血管網の末端をポンプに接続するなどの工夫が必要である。このような工夫なしには200ミクロン以上の厚みをもつ組織は内部でネクロシスが生じてしまう。しかし、培養系でこのような末端をポンプに接続した毛細血管網を作製することは容易ではない。

前述のヴァカンティは、この問題へのアプローチとして、半導体作製を目的として開発されたマイクロファブリケーション技術を活用することを提案している¹¹⁾。すでに最先端のCPU (central processing unit)の配線幅は70ナノメートルに達しており、将来的には数ナノメートルの解像度で

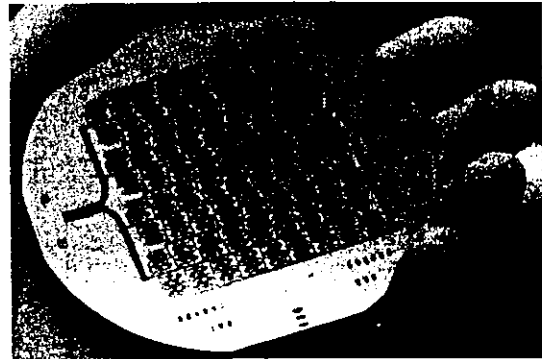


図2 シリコンウェハー上に作製した毛細血管網

生体高分子を3次的に配置することを可能にするようなナノティッシュ・エンジニアリングが現実のものとなる可能性がないわけではないが、現在のティッシュ・エンジニアリングで要求される解像度をはるかに凌駕している。シリコンウェハー上に2次元的な毛細血管網様マイクロパターンを作製し(図2)、これを鋳型としてポリマーに転写する。導入部位からフラクタル様に多重分岐を繰り返す毛細血管網の両端は宿主血管系に接続する必要性から1ミリ程度の径をもち、一方、多重分岐の終点となる一番細いところで幅10ミクロン、深さ30ミクロンである。動脈が多重分岐を繰り返す毛細血管網となり、さらに毛細血管網の終末が再度融合を繰り返し、静脈へと合流するように、このマイクロパターンは入口と出口で対称形をなす。また分岐の数や角度などの毛細血管網の形状の詳細は、流体力学を用いたコンピュータシミュレーションによりデザインされている。すでにこの方法で作製した毛細血管網様マイクロパターンの内壁すべてに血管内皮細胞で被覆して抗血栓性を付与し、抗凝固剤を一切用いることなく、ラットの動脈、静脈に接続して血液体外循環を行うことに成功している¹²⁾。

現状では、2次元ネットワークでしかなく、また組織固有の機能を実現する実質細胞の導入もできていないため、プロトタイプの域を出るものでは決していないが、その将来性に大いに注目したい。

細胞シート工学

最後に、再生医療へのわれわれの取り組みを紹介したい。われわれは、生分解性高分子の足場を利用することなく移植に必要な大きさの組織を再構築する新技術の開発を目指して、「細胞シート工学」とよぶ新技術の開発に体系的に取り組んできた。細胞を培養皿上で増殖させると、細胞間の接着装置を介して個々の細胞が連結した1枚の細胞シートが形成される。このような細胞シートはフィブロネクチンやラミニンなどの細胞接着蛋白質を分泌して培養皿表面に安定的に接着している。分泌された接着蛋白質は細胞外マトリックス(ECM)とよばれる固相構造を構築している。この細胞—細胞間接着およびECMの構造と機能を破壊することなく非侵襲的に細胞シートを培養皿から脱着・回収し、この細胞シートを順次重層化していくことで、3次元組織構築が可能になる。このとき、細胞シート間に構造的連結のみならず、機能的連結を再構築できれば、組織や臓器に特異的な高度な機能を再現することができるし、生体への移植後にホストの組織や臓器と一体化し、新しい再生医療が実現できる。

培養皿表面の培養細胞を脱着・回収するには、従来、トリプシンやディスパーゼなどの蛋白質分解酵素が利用されてきた。しかし、この方法では、細胞と培養皿表面を接着させている接着蛋白質を分解すると同時に、細胞膜表面の蛋白質も分解してしまい、細胞シートとして回収することはできない。そこでわれわれは培養皿の表面の構造を変化させて、細胞を脱着・回収できる全く新しい方法を開発した。すなわち、温度が37℃では表面が弱い疎水性を示し細胞が接着でき、32℃以下に下げると、培養皿表面の構造変化により親水性となり細胞が脱着するシステムの実現を世界に先駆けて完成させた。

この表面に細胞を播種すると、37℃では市販の培養皿と同様、さまざまな細胞が接着・伸展・



図3 心筋細胞シート移植により再生した心筋組織の抗第Ⅲ因子抗体染色
多数の毛細血管が再生組織内に入っている。

増殖する。その後、温度を相転移温度以下に下げるだけで、通常、培養細胞の回収に用いられているトリプシンなどの蛋白質分解酵素を必要とすることなく伸展していた培養細胞を培養皿から脱着・回収することができる。増殖した細胞が培養皿上を一面被覆した後に温度を下げると、すべての細胞が連結した1枚の細胞シートとして回収される。細胞の脱着に蛋白質分解酵素を用いていないため、回収した細胞シートは、細胞—細胞間接着や培養の間に沈着したECMを保持している。このため、別の培養皿や別の細胞シート、生体組織などと再接着させる相手を選ぶことなく、回収した細胞シートを容易にほかの表面に再接着させることができる。

すでに、表皮細胞シートや角膜上皮細胞シートは、そのまま移植に供して熱傷や角膜幹細胞疲弊症の治療に用いている。通常、角膜移植では縫合が必須であるが、温度応答性培養皿を用いて作製した角膜上皮細胞シートは5分程度で角膜実質層に接着し、縫合の必要がない。また、細胞—細胞間接着が維持されているため、移植直後からきわめて良好なバリア機能を有している。また、動物実験レベルでは歯根膜細胞シート移植による歯周組織の再生にも成功している。

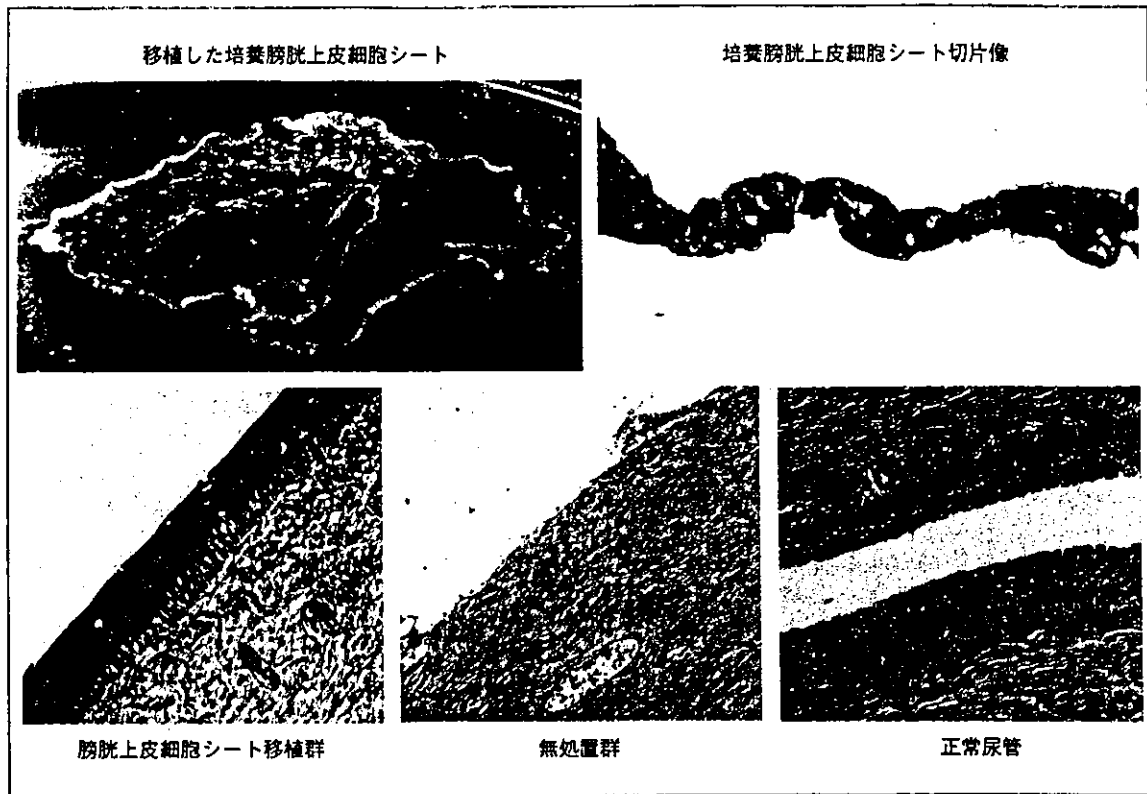


図4 脱粘膜化した胃筋層上への膀胱上皮細胞シートの移植

さらに心筋細胞シートを積層することで、肉眼でもその拍動が確認できる心筋様組織が再生できる(図3)¹³⁾。重層化させた心筋細胞シート間にギャップジャンクションが早期に形成され、複数の細胞シートが同期して拍動する。これを心筋パッチとして、心臓表面に移植するとホスト心臓と同期して拍動する。すでに、ラットの心筋梗塞モデルへの心筋パッチの移植により心筋梗塞の著明な改善がみられている。注射針を用いて細胞懸濁液を組織に注入する細胞移植では、生着率の低さや細胞の散逸が問題になっているが、細胞シート移植ではこのような問題は生じない。さらに血管内皮細胞シートを併せて移植することでホスト血管系に接続した毛細血管網が再生できた。

現在臨床で用いられている胃や腸を用いる膀胱再建術では、これらの組織の上皮に起因する合併

症が問題となっているが、培養膀胱上皮細胞シートで置換することで、このような合併症を起こさない新しい膀胱再建術の開発にも成功した(図4)¹⁴⁾。

現在、このほかにもさまざまな組織を細胞シート移植により再生させる試みに取り組んでいるが、上皮細胞シートと複数枚を積層化させた平滑筋細胞シートに必要な応じて血管内皮細胞シートを組み合わせることで、泌尿器や消化器が再生できるのではないかと仮説に基づき実験を行っている。これらの成果についてはまた別の機会に紹介したい。

References

- 1) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. Science 260 : 920-926, 1993

- 2) Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, et al : Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 100 : 297-302, 1997
- 3) Lendlein A, Langer R : Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications. *Science* 296 : 1673-1676, 2002
- 4) Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al : Functional arteries grown in vitro. *Science* 284 : 489-493, 1999
- 5) Mayer JE Jr, Shin'oka T, Shum-Tim D : Tissue engineering of cardiovascular structures. *Curr Opin Cardiol* 12 : 528-532, 1997
- 6) Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, et al : A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells. *FASEB J* 17 : 823-828, 2003
- 7) Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A : De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 17 : 149-155, 1999
- 8) Grikscheit TC, Ochoa ER, Ramsanahie A, et al : Tissue-engineered large intestine resembles native colon with appropriate in vitro physiology and architecture. *Ann Surg* 238 : 35-41, 2003
- 9) Li F, Carlsson D, Lohmann C, et al : Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (in press)
- 10) Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, et al : Cell-demand-ed release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J* 17 : 2260-2262, 2003
- 11) Kaihara S, Borenstein J, Koka R, et al : Silicon micro-machining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* 6 : 105-117, 2000
- 12) <http://www.mgh.harvard.edu/depts/tissue/projects/mains/mmain.html>
- 13) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90 : e 40, 2002
- 14) Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, et al : Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature. *Tissue Eng* 9 : 1005-1012, 2003