

イオン液体の界面を利用した細胞培養

Ionic Liquids Interface for Cell Culturing

上木 岳士

Takeshi Ueki

国立研究開発法人物質・材料研究機構 (主任研究員)
National Institute for Materials Science (Senior Researcher)

中西 淳

Jun Nakanishi

国立研究開発法人物質・材料研究機構 (グループリーダー)
National Institute for Materials Science (Group Leader)

KEYWORD ▶

イオン液体

細胞培養

メカノバイオロジー

はじめに

01

接着性細胞はその生存を維持するため、基質との界面において焦点接着 (FA) を形成し牽引力を発揮する必要がある。このFAの成熟、安定化には数分から数時間のオーダーを要するため細胞培養には、硬く (細胞が界面から十分な応力が得られる) かつこのタイムスケールにおいて応力が緩和しないプラスチックシャーレのような固体材料が用いられる。これに対して近年、種々の”液体”界面にも細胞が接着し、ヒト間葉系幹細胞の選択的な神経分化¹⁾や未分化性の維持等²⁾、興味深い動態を示すことが見出され注目を集めている。液体界面では応力がミリ秒オーダーで緩和するためFAの形成は不可能そうなのに、実に奇妙な現象である。

液体界面を使った細胞培養の歴史は意外と古く、その初報は現在からちょうど60年前に遡る。Rosenbergはフッ素系液体 (FC-43, 75等) を含む各種疎水性液体界面において細胞が接着、伸展、増殖する現象を報告した³⁾。彼はこのとき「細胞は液体界面そのものに直接接着しているわけではない」と主張した。すなわち「細胞は、培地 (細胞培養に必須のタンパク質水溶液) に溶解するタンパク質成分が疎水性液体界面に集積吸着することで固体薄膜 (PNL) を形成し、そのPNLの力学/生化学的性質こそが細胞自身の接着ないしは生存を支持している」と予言した。事実、この洞察は正しく1980年代に入りKeese, Giaeverらによる入念な検討によってその存在が裏付けられた⁴⁻⁶⁾。彼らは液体界面に偶発的に形成されるPNLは力学的にとっても脆弱で細胞の接着を支持するのに不十分なケースがあることも指摘した。この問題を解決すべく、彼らはポリ(L-リジン) (PLL) のようなポリペプチ

ドあるいはウシ血清アルブミン (BSA) のようなタンパク質を疎水性液体界面に積極的に集積吸着させ、ペンタフルオロベンゾイルクロライドのような界面活性のある反応性試薬で疎水性液体界面にアンカーリングすることで、その力学的頑強性を飛躍的に向上させた⁵⁾。この方法は現在では疎水性液体界面で細胞培養を行うための界面改質 (PNLの力学強度向上のため) の手法として広く採用されている⁷⁾。

今回、我々は疎水性イオン液体 (IL) の界面を利用した細胞培養を報告する。従来、用いられてきたシリコンオイルやフッ素系液体は“無毒性で高密度、かつ培地 (水溶液) と明確な二相分離界面を形成する”という界面培養に適した性質を併せ持つが、その反面、化学構造は画一的で、選択肢の幅は狭い。このためサブフェーズに用いる液体のどのような物性が種々の界面現象、ひいては細胞の動態や運命を決定づけているか不明な点が多かった。一方、デザイナースルベントとして知られるILは液体足場材料として、原理的に無限の化学構造ライブラリを提供する。高極性でありながら水と相分離し、イオンのみからなる液体の液 | 液相分離界面は極めて特殊で、これまで検討されてきた非極性分子性液体とは一線を画したエキゾチックな培養空間を与えるであろう。本稿ではまず、界面培養に用いるIL構造を決定すべく、種々の疎水性ILに対して細胞毒性を評価した結果を報告する。次に三種類の疎水性無毒性ILの界面でヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) を培養した結果と、細胞接着を支配するIL界面におけるタンパク質の吸着挙動を、高速原子間力顕微鏡 (高速AFM) をはじめとする各種測定から検証した結果を議論する。本稿の最後では、上述のような界面改質とは異なる、全く新しいアプローチとして、ILをゲル化することで細胞挙動を制御した基礎検討の一部を示す。

イオン液体界面での細胞培養

02

2-1. 疎水性イオン液体の細胞毒性

細胞培養にIL界面を用いるに当たって、まず把握しておかなくてはならないのがIL自身の毒性である。ILの毒性に関しては数多くの研究が行われてきているものの^{8,9)}、ILの化学構造と各検体(細胞、微生物、カビ、動物など)に対する毒性を系統的に整理する考え方やILの毒性発現メカニズムは、著者らが知る限り、未だ提唱されていない。特に水溶性のILに関してはEC50, LC50のような定量データが蓄積されつつあるが、水と相分離する疎水性ILにおいては、その定量化は困難である。我々は、医療機器の生物学的評価に関するISO基準(ISO10993-5)の手法を参考に、疎水性ILの細胞毒性試験法を独自に考案、適用した。まず1 cm四方のガラス基板上にhMSCsを播種し80%コンフルエンスに到達するまで培養した。次にウェル内部をフレッシュな培地に交換し、培養環境に30 μLの疎水性IL液滴を導入、共存させたまま任意の期間、培養した。培養後、Live/Deadアッセイにより生細胞を染色、IL非共存下におけるガラス基板上的hMSCs生細胞の総接着面積で規格化した値をもってILの毒性と定義した。端的に言って、この毒性試験は培地に飽和溶解できる疎水性ILの濃度と、IL固有の細胞毒性の積を見積もっていることになる。26種類の疎水性IL(化学構造:図1(a))に対して毒性試験を1あるいは24時間行った結果を図1(b), (c)に示す。疎水性ILと細胞を24時間共存させるとイミダゾリウム系を含む種々の窒素系カチオンを

含むILは深刻な細胞毒性を示した。その一方、興味深いことにリンをカチオン中心に含むいくつかのアルキルホスフォニウム系ILは高い生存率を示した。しかもこの傾向はhMSCsに限らず、我々が試みたいいくつかのほ乳類細胞(HeLa, MDCK, A549等)についても同様であった。それぞれのILにおいて1H-NMRから飽和濃度を算出したが、その序列は毒性の結果と一致しなかった。つまり疎水性ILの毒性は自身の溶解性のみに支配されているわけではなく、各IL固有の何らかの特徴が細胞毒性を決定づけていることを暗示している。さらにそこには細胞種にも依存しない普遍的な毒性発現メカニズムが潜んでいることも示唆されたが、細胞毒性を決定づけるILの分子論的な機構は未解決で今後の課題である。

2-2. IL界面におけるhMSCsの接着・伸展

我々は細胞毒性が低かった3種類のIL、すなわち[P2,2,2,5][TFSI]、[P4,4,4,1][TFSI]、[P6,6,6,14][TFSI]を選択し、その界面に細胞を播種した。図2(a)-(d)にそれぞれのIL界面およびガラス基板上に接着した細胞の位相差画像を示す。IL界面における細胞の細胞面積、伸展度はそのカチオン構造に応じて変化した(図2(e), (f))。一般的に接着性細胞は硬い界面ではより伸展し、軟らかい界面では球状に丸まる性質を持っている。定性的に、hMSCsは[P4,4,4,1][TFSI]や[P6,6,6,14][TFSI]の界面を硬く感じており、[P2,2,2,5][TFSI]界面を軟らかく感じていそうである。続いて細胞の接着ないしはFA形成を評価するため、FAに集積する代表的なタンパク質であるビンキュリンを染色し

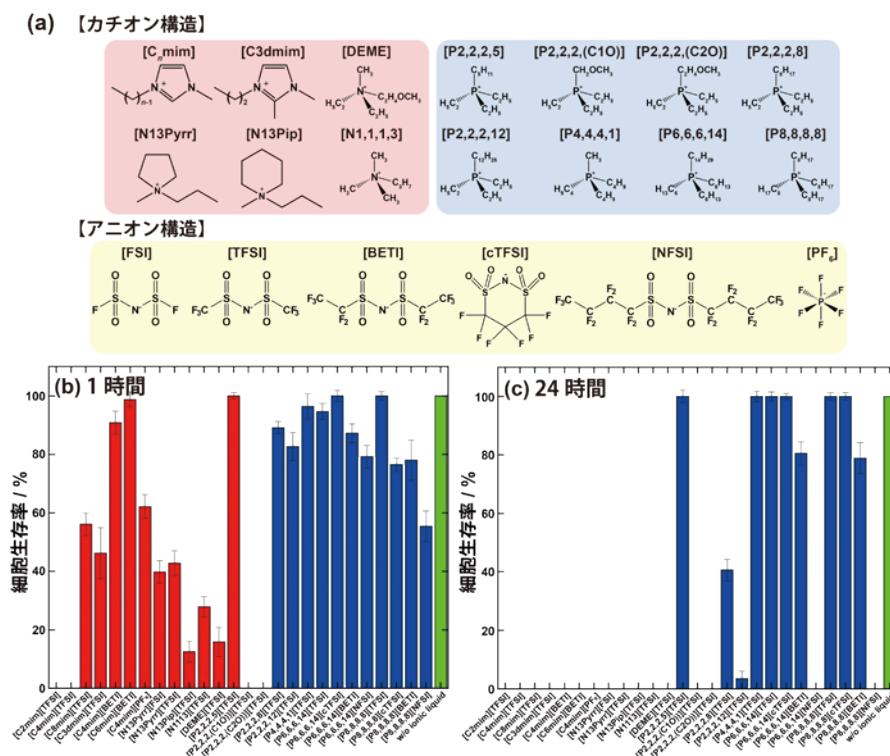


図1 (a) 本研究の細胞毒性試験に用いたイオン液体のカチオン構造とアニオン構造。(b) 1時間および(c) 24時間イオン液体共存下における細胞生存率。カチオン中心として窒素を含むものを赤、リンを含むものを青のバーで示している。イオン液体非共存下(ポジティブコントロール)は緑のバーで示している。

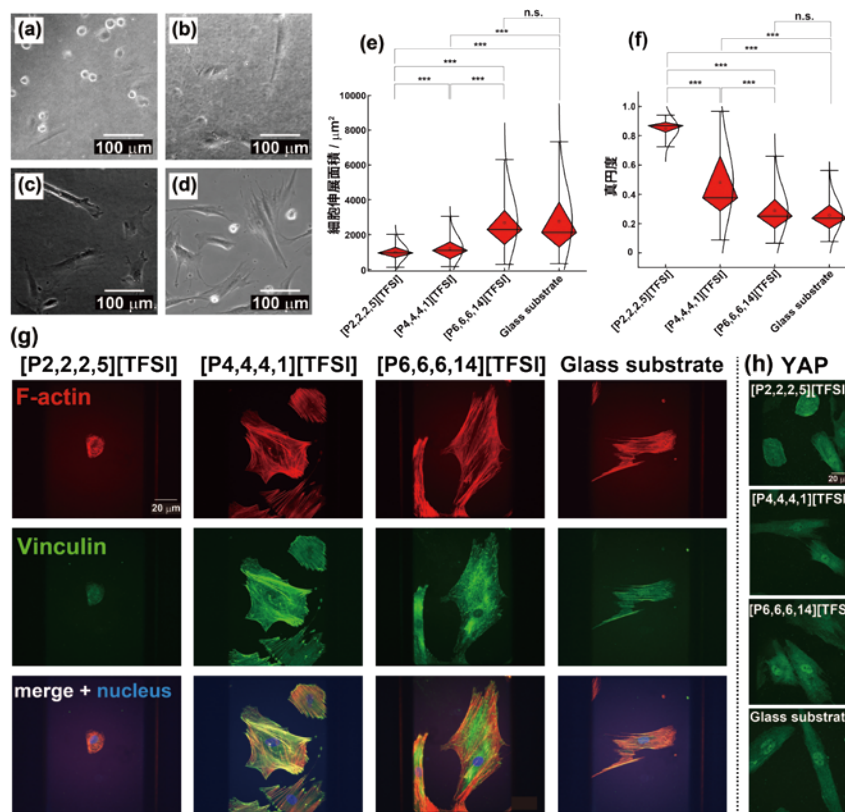


図2 (a) [P2,2,2,5][TFSI], (b) [P4,4,4,1][TFSI], (c) [P6,6,6,14][TFSI]および(d) ガラス基板上に接着したhMSCsの位相差画像。(e) 各イオン液体およびガラス基板上の細胞伸展面積および(f) 真円度。(g) 各イオン液体およびガラス基板における細胞の蛍光染色画像。赤: F-アクチン, 緑: ビンキュリン, 青: 核を示している。(h) Yes Associated Protein (YAP) の蛍光染色画像。

た(図2(g))。ビンキュリンはインテグリンと呼ばれる膜タンパク質が細胞外マトリックスとアクチン線維(細胞骨格)を連結する応力集中点に集合し、細胞内外の結合そのものを強化する機能を有する。[P4,4,4,1][TFSI]、[P6,6,6,14][TFSI]では細胞の辺縁部において、アクチンの末端にビンキュリンが局在化する様子が見られ、確かにFAを形成していることがわかる。これに対して[P2,2,2,5][TFSI]ではそのような共局在は見られない。さらにYes Associated Protein (YAP) と呼ばれる細胞内タンパク質の染色を行った。YAPは細胞内におけるメカノトランスデューサーの一種であり、細胞が界面を「硬い」と認識すると核に集積化する一方、「柔らかい」と認識すると細胞質に留まる性質がある。ILごとに比較するとやはり[P4,4,4,1][TFSI]と[P6,6,6,14][TFSI]では核内に移行しているが、[P2,2,2,5][TFSI]では核への局在化はみられない(図2(h))。以上の結果から細胞の表現型はサブフェーズに用いるILの種類によって大きく異なることがわかった。すなわちhMSCsは[P2,2,2,5][TFSI]の界面を柔らかく感じており、[P4,4,4,1][TFSI]および[P6,6,6,14][TFSI]界面を硬いと認識しているようである。そこで次にIL界面に形成されるPNLのキャラクタリゼーションを行った。

2-3. IL界面に形成されるPNL

まずIL界面に形成されたPNLを原子間力顕微鏡(AFM)によって観察した(図3(a)-(c))。培地の主成分でありタンパク吸着の

モデル物質として古くから研究されている¹⁰ウシ血清アルブミン(BSA)に注目し、これを1 mg mL⁻¹溶解させたPBS水溶液に三種類の疎水性ILを接触させ、PNLを形成させた。BSAが吸着する前は極めて平坦なIL界面が観測されたが吸着後はBSA粒子が集積した、若干粗い界面に変化した。次にAFMのカンチレバーの触圧を上昇させ、形成したPNLを矩形に削り取った。平坦な液体界面との高さをPNLの厚みとして評価したところ、その厚みは[P2,2,2,5][TFSI]から[P4,4,4,1][TFSI]、[P6,6,6,14][TFSI]に構造が変化するにつれて4 nmから1.5 nmへと僅かながら薄くなる傾向がみとれた(図3(d)-(f))。BSAの短軸の長さはおおよそ3 nmと報告されていることからBSAはIL界面に単分子の層として吸着していることが示唆された。次にPNLの法線方向にAFMのカンチレバーを押しつけ、その際の応力と歪みの関係からPNLの見かけのヤング率を算出した。結果としてその値は15.0 kPa ([P2,2,2,5][TFSI])、30.6 kPa ([P4,4,4,1][TFSI])、45.9 kPa ([P6,6,6,14][TFSI])とILの構造変化に従って2~3倍も変化することが明らかになった(図3(g))。hMSCsは各IL界面のPNLの硬さに応じてその伸展度を変化させたが、PNLの見かけのヤング率の序列とこれらの結果は良く合致している。それでは細胞の表現型に強い影響を与えるPNLの力学特性はILのどのような性質を反映しているのだろうか。

Fischerらは水と相分離する種々の分子性有機液体(オクタン誘導体等)の界面で形成されるPNLの厚みと力学特性の相関を

検討した^{11, 12}。彼らはPNLの力学特性および、その厚みは液体自身のバルク極性に依存すると結論づけた。彼らの報告によると低極性の疎水性液体(例えば*n*-オクタン)界面においては硬く、薄いPNLが形成された。タンパク質が吸着する際、界面でタンパク質の高次構造の崩壊を伴うような強い吸着変性が起きるためである。一方、比較的高極性の疎水性液体(例えばオクタノール)界面ではタンパク質は高次構造をある程度維持した状態で吸着した。その結果としてPNLは軟らかく、厚くなる。今回の場合、ILの構造が[P2,2,2,5][TFSI]から[P6,6,6,14][TFSI]に変化するに従って、PNLは硬く、薄くなった。そこで各IL界面におけるBSAの変性度合いをFT-IR ATRによって調べてみたところ、一般的なタンパク質変性の指標であるアミドIバンド(1650 cm⁻¹付近)とアミドIIバンド(1575 cm⁻¹付近)の強度比は[P6,6,6,14][TFSI] < [P4,4,4,1][TFSI] < [P2,2,2,5][TFSI]の順序で大きくなっていった。やはり[P2,2,2,5][TFSI]界面ではあまり変性が進行せず、逆に[P6,6,6,14][TFSI]ではより変性が進行しているようである(図3(h))。それでは実際に、これら三種類のIL自身の極性はどの程度違いがあるのだろうか。我々はILの極性を表す指標としてよく用いられる $E_T(30)$ を各種ILについて評価した。その結果 $E_T(30)$ は[P2,2,2,5][TFSI]が47.4 kcal mol⁻¹、[P4,4,4,1][TFSI]が46.6 kcal mol⁻¹、[P6,6,6,14][TFSI]が45.5 kcal

mol⁻¹であった。確かに $E_T(30)$ の序列も[P2,2,2,5][TFSI] > [P4,4,4,1][TFSI] > [P6,6,6,14][TFSI]ではあるものの、その差はごく僅かで、2~3倍のPNLの固さ変化を説明するのは難しくそうである。Fischerらが用いた*n*-オクタンでは $E_T(30)$ が31.1 kcal mol⁻¹、オクタノールでは48.1 kcal mol⁻¹と17kcal mol⁻¹の差があることも考慮に入れると、IL界面ではバルク極性以外のなにか別のファクターがPNL形成を後押ししているように思える。そこで次に我々はIL界面でPNLが形成されるプロセスを直接可視化し、この界面現象に迫ろうとした。

2-4. 高速AFMによるPNL形成過程の直接可視化

図4(a)-(c)にPNLが形成していく様子を各IL界面の各時間におけるスナップショットとして示す。白い点状に見えるのがBSAのタンパク粒子である。いずれの界面でも時間経過につれて界面が徐々にBSAで覆われていく様子がみとれる。興味深いことに、溶液バルクから拡散してきたBSA粒子はIL界面と接触した瞬間、吸着と同時にその動きを止めるのではなく、BSA自身が液体界面でブラウン運動した後動きを止めることがわかった。しかもそのマイクロブラウン運動のダイナミクスはILの種類に依存して変化する。図4(d)-(f)に高速AFMの画像解析によって得た液体界面のBSAの重心位置の軌跡をトレースした結果を示す。

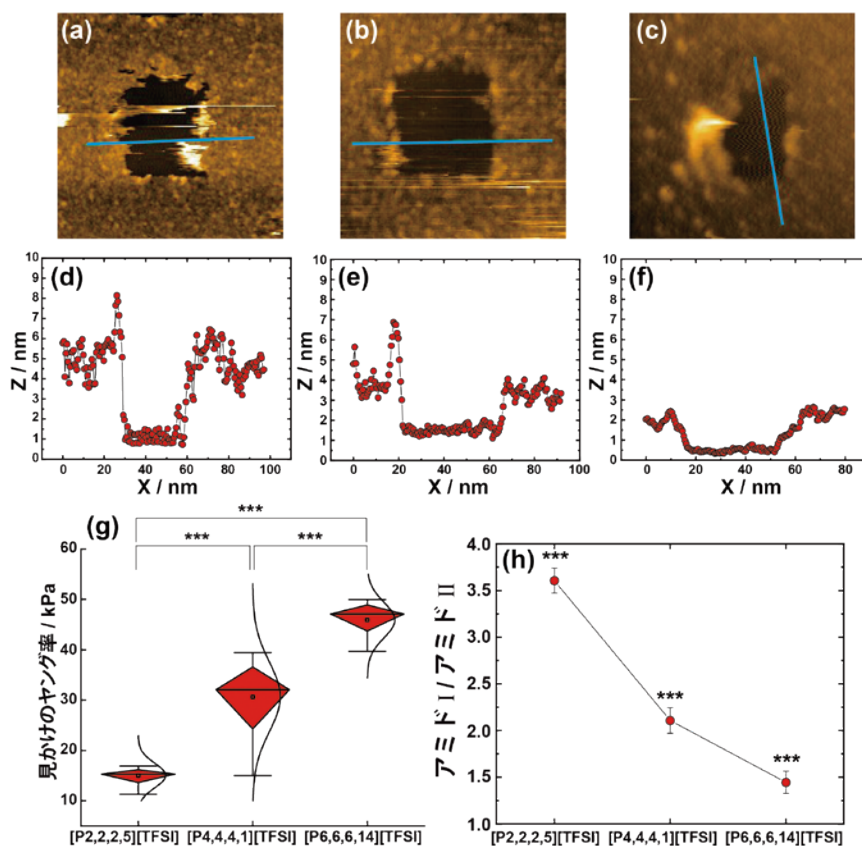


図3 (a) [P2,2,2,5][TFSI], (b) [P4,4,4,1][TFSI], (c) [P6,6,6,14][TFSI]界面に形成されたプロテインナノレイヤー(PNL)のAFM観察画像。カンチレバーの触圧を上げ、液体界面に形成されたプロテインナノレイヤーを矩形に削り取っている。(d) [P2,2,2,5][TFSI], (e) [P4,4,4,1][TFSI], (f) [P6,6,6,14][TFSI]界面に形成されたプロテインナノレイヤーの厚み。それぞれ(a)-(c)画像中の青いラインの高さプロファイルを解析している。(g) ナノインデンテーションにより測定された各イオン液体界面に形成されたプロテインナノレイヤーの見かけのヤング率。(h) 各イオン液体界面に形成されたプロテインナノレイヤーのFT-IR ATRのアミドI, アミドIIバンドの強度比から評価したタンパク質の変性度。

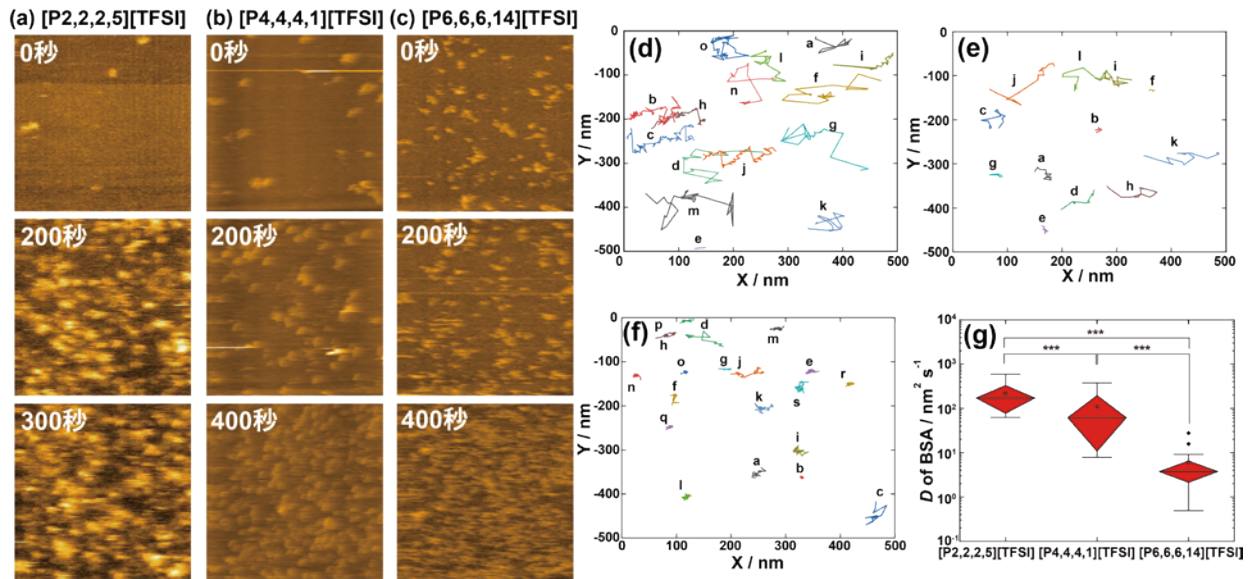


図4 高速AFM測定により観察した(a) [P2,2,2,5][TFSI], (b) [P4,4,4,1][TFSI], (c) [P6,6,6,14][TFSI]界面におけるPNLの形成過程(あるいはBSAの吸着挙動)。(d) [P2,2,2,5][TFSI], (e) [P4,4,4,1][TFSI], (f) [P6,6,6,14][TFSI]各イオン液体におけるBSAの輝点の重心変位。(g) 平均二乗変位と時間の関係から求められる各イオン液体界面におけるBSAの輝点の二次元拡散係数。

BSAの液体界面における二次元拡散はIL構造に応じて明確に変化することがわかる。そこで我々はこのダイナミクスを定量化すべく、平均二乗変位と時間の関係からBSAの二次元拡散係数を算出した(図4(g))。結論としてBSA粒子の拡散係数(D)はIL構造変化に従ってその値を1~2桁もの広範囲で変化させることがわかった($D = 1.71 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ([P2,2,2,5][TFSI]), $D = 6.18 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ([P4,4,4,1][TFSI]), $D = 3.73 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)。この拡散係数の序列はPNLsの見かけのヤング率の序列と逆相関にあったことから、吸着初期におけるダイナミクスの違いこそが見かけのヤング率にして2~3倍にも及ぶ力学強度の差を生んでいると考えた。[P6,6,6,14][TFSI]においてはBSAが液体界面に接触した際、直ちに界面で変性が起き、内部の疎水性アミノ酸からなるタンパク質構造が露出、IL界面との間で疎水性相互作用が発生していると予想される。このタンパク質内部の疎水性アミノ酸と液体界面との引力的相互作用が二次元拡散に対する抵抗成分として働くためブラウン運動を抑制し、結果として拡散係数の低下を生じさせる。対照的に界面に接触したBSAが激しくブラウン運動する[P2,2,2,5][TFSI]ではBSAの界面変性の程度が弱く、高い拡散係数を与える。つまりIL界面において形成されるPNLの力学特性は必ずしもバルクの極性だけで決まるわけではなく、ILの配向を反映した界面の極性環境が強い影響を与えるということである。

最近、西らは3つの長鎖アルキル(オクチル基)と1つのメチル基からなるIL(トリオクチルメチルアンモニウム トリフルオロメタン sulfon イミド: [N8,8,8,1][TFSI])と水が形成する界面における[N8,8,8,1]カチオンの配向を調べた¹³⁾。[N8,8,8,1]カチオンは、オクチル基よりも極性の高いメチル基を水との二相分離界面に向ける傾向があり、その界面はよりメチル基リッチにな

ることを突き止めた。今回の系で考えると[P6,6,6,14][TFSI]においては、カチオン構造に含まれるアルキル鎖はいずれも長いため、[N8,8,8,1]カチオンとは異なり、水のような高極性液体界面でも長鎖アルキルリッチな界面を与えると想像できる。逆に[P2,2,2,5][TFSI]や[P4,4,4,1][TFSI]ではカチオン構造中にエチル基あるいはメチル基を含むため[P6,6,6,14][TFSI]の界面よりは極性が高く、水にに適した、タンパク質がソフトに吸着する界面が露出していると考えられる。バイオマテリアル界面のサイエンスでは古くからポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスフォルルコリン)¹⁴⁾やポリスルフォベタイン¹⁵⁾のような、構成カチオンとアニオン間の距離が比較的短い双性イオン型構造の高分子界面が優れた抗タンパク質吸着性を示すことから、抗血栓性材料、抗タンパク吸着コーティング材料として研究されてきた。チャージを帯びた界面におけるタンパク吸着現象においては、比較的制限された狭い空間でのカチオン/アニオンの共存、イオン間距離、あるいは界面のイオン性¹⁶⁾やイオン配向のような概念を導入することによって、ダイナミクスまで含めたタンパク吸着メカニズムと平衡構造の定量的理解に繋がるかもしれない。ちなみに低極性のフッ素系液体(パーフルオロオクタン:PFO)界面においても同様の高速AFM観察を試みたが、PNLの形成はBSAを系中に導入した直後、瞬時に完了した。つまりPFO界面ではBSAが液体界面に接触すると同時に(全くブラウン運動を起こさず)界面変性して膜化するため、その形成プロセスを捉えることは今回の高速AFMの時間分解能では不可能であった。裏を返すとPNL形成プロセスはIL相当の高極性界面であったからこそなし得た、通常の液体界面では可視化が極めて困難な自然現象だったということである。

高速AFMによる検討を続けていったところ、我々はPNLがセ

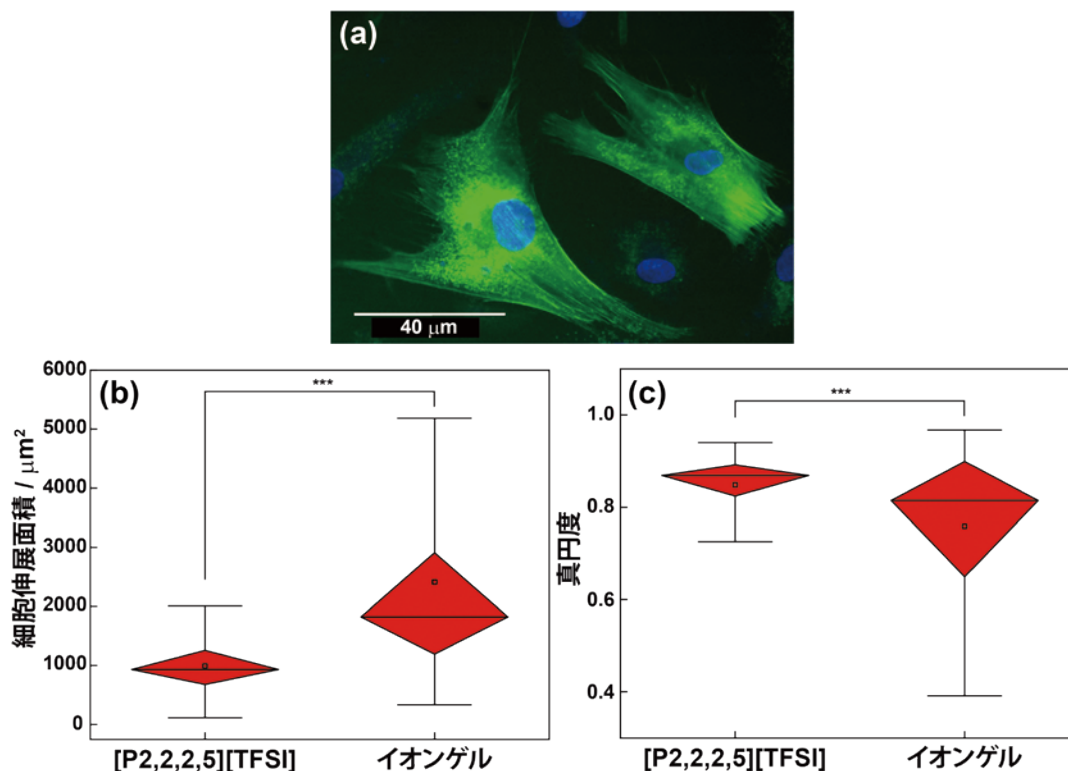


図5 (a) [P2,2,2,5][TFSI]とP(nBuMA)からなるイオンゲル界面におけるLife-Act GFPを発現させたhMSCsの伸展の様子。[P2,2,2,5][TFSI]の液体界面および[P2,2,2,5][TFSI]からなるイオンゲル界面における(b) 細胞伸展面積および(c) 真円度。

ルフヒーリング能力を兼ね備えている事実を見出した。2-3項で示したようにPNLにカンチレバーで矩形の穴を開け、その後、BSAを導入した。BSAは露出した液体界面にみるみるうちに再吸着していき、PNLは数分で元の状態に戻った。このプロセスをよく観察すると、既に吸着したBSAの上には、BSAが新たに積層していかないことがわかった。つまりこの直接観察もIL界面のPNLがモノレイヤーであることを支持している。ここまでの考察からBSAは疎水性アミノ酸をIL界面に向けて吸着しており、その反対の水溶液方面には吸着に用いられなかった親水性アミノ酸を向けていると予想できる。水溶液方面に曝された親水性アミノ酸は、水溶液バルクから界面に向かって拡散、接近してくるBSAに対して排除体積効果やイオン反発等の斥力的相互作用を発揮し、二層目以降の積層吸着を妨げるのであろう。また、これら一連の結果はIL界面においてBSAのような球状タンパク質が、その高次構造を、ある程度保ったまま二次元に濃縮可能であることを示している。この濃縮効果は吸着に深刻なタンパク変性を伴うPFOのような無極性／疎水性液体の界面では起こりえない。このような現象を利用すれば、例えば酸化還元酵素のような機能性タンパク質を配列することで高感度なセンサー等に適用ができるかもしれない。IL界面へのタンパク質吸着現象は基礎学術的に未踏であり、同時に材料工学的にも大きなポテンシャルを秘めている。

2-5. イオンゲルを利用した細胞培養

ここまで液体界面における細胞の表現型は、その界面に形成されるPNLの力学特性に大きく依存することを示した。しかし、液体界面に形成されるPNLはタンパク質の自発的な物理集合からなる極薄の構造体であるため、実は力学的にかなり脆弱である。液体へのタンパク質アンカーリングによるPNLの力学補強は、液体界面における細胞接着を安定化させる優れた手段であることは本稿の冒頭で紹介したとおりである。さて、ここでは界面修飾によるPNL改質とは異なるアプローチで、細胞伸展の安定化ないしは表現型の制御に成功した結果を示す。キーポイントになったのは、ILの高分子(ゲル)に対する高い溶解(膨潤)性である¹⁷⁾。三種類のILおよび細胞培養によく用いられるフッ素系液体の典型例としてPFOと、パーフルオロデカリン(PFD)の各種汎用ビニルポリマーに対して溶解性試験を行った結果を表1に示す。PFOやPFDでは高分子を溶解させることはできなかったが、その一方ILはポリメタ(ア)クリル酸類や一部のポリアクリルアミド類など広範な高分子構造に対して優れた溶解性を示した。我々はその中でもポリ(メタクリル酸-n-ブチル) (PnBuMA) モノマーがこれら三種類のILに溶解、重合後も均一透明性を維持することに注目し、架橋剤としてエチレングリコール二メタクリル酸(EGDMA) 共存下、重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を用いたラジカル重合反応を行うことにより化学架橋イオンゲルを合成した。これをイオンゲル足場材料として細胞

培養に利用した際のhMSCsの様子を**図5(a)**に示す。[P2,2,2,5] [TFSI]液体界面で培養したときと状況は大きく異なり、ILをゲル化することで細胞自身がよく伸展するようになることがわかる。液体界面とゲル界面で培養したときの細胞伸展面積と真円度をプロットすると、伸展度は明らかに大きくなる(**図5(b), (c)**)。イオンゲルと膨潤に用いるILが、その界面環境においても同一か否かは議論の余地があるものの、界面(すなわちPNL)そのものに手を加えることなく、疎水性の液体を高分子(網目)と複合化し、その力学特性をチューニングすることで細胞の表現型を変調させた新しい方法論といえる。我々はILの中で温度等の外部刺激に応じて溶解性を変化させる高分子も既に見出している。メカノバイオロジーの研究分野では細胞に対して所望のタイミング、時空間領域でメカニカルストレスを与えるハイドロゲル細胞足場材料の設計も一つの潮流になっている。今後、ILに対する優れた高分子の溶解性や、高分子(ゲル)の相転移現象を利用した力学特性の変化やスイッチングにも挑戦していきたい。

め、環境に拡散していかない。さらにIL足場は使用後に水洗、真空乾燥、乾熱滅菌まで行うことができるためリユース可能な環境に優しい液体足場として、その利用価値は極めて高いと考えられる。基礎学術の面でも、IL界面における細胞の振る舞い(伸展、増殖、分化等)はもとより、液体界面へのタンパク質の吸着現象自体、食品・化粧品・農産物等に関わる重要な現象である。「水と相分離するが高極性」という希有な特徴が盛り込まれたILの界面現象はまだ未解決な問題も多く、生物化学や高分子科学、バイオマテリアルだけでなく、分光計測、計算化学など異分野研究者を巻き込んだ大きな展開が望めるものと確信している。

おわりに

03

今回我々は、新しい細胞培養プラットフォームとしてILの界面を用いる試みを紹介した¹⁸⁾。ILはイオンのみを構成成分としているが水と相分離する。このため従来、液体界面の細胞培養のサブフェーズとして用いられてきた分子性液体とは質的に異なる分子環境を与える。特に液体界面培養の鍵を握るPNLの形成過程の直接観察まで含めた詳細なキャラクタリゼーションから、ILの界面ないしは、その特殊環境における細胞動態の特徴を浮き彫りにした。

世界最速で高齢化が進む我が国で幹細胞を用いる再生医療工学の確立は不可欠である。液体界面培養においては、液体材料の変形性や高い操作性を活かした分散エマルジョン培養への応用展開を見据えた研究が進められている。このようなoil-in-waterエマルジョン培養系が実現可能になれば、従来のプラスチックディッシュを用いた二次元培養系と比べて有効な幹細胞資源の培養効率(体積当たりの培養表面積)を圧倒的に引き上げることができる¹⁹⁾。マイクロデバイス内でのフロー型培養系に加え、濾過による細胞の分離・回収によるオートメーション化など従来のプラスチック材料ではなしえない新しい技術革新への期待が膨らむ。本材料をMEMS技術と組み合わせれば、小型かつ高効率化が実現され、脱プラスチックや低炭素化社会に適合した培養技術としての展開も望める。デジタルトランスフォーメーションの旗印の下、自動化への転換が著しいバイオ産業では全プロセスのライン化が可能な液体細胞培養は合目的である。その一方、界面培養が可能な液体として古くから検討されてきたフッ素系液体は近年、その自然環境下における極めて低い化学的分解性が懸念され、「永遠の化学物質」あるいは「PFAS (PFOS, PFOA) 問題」としてクローズアップされている。今回、足場に用いたILは分子性液体と異なり蒸気圧を持たず水溶性も低いた

参考文献

1. X. Jia, K. Minami, K. Uto, A. C. Chang, J. P. Hill, J. Nakanishi, and K. Ariga. Adaptive Liquid Interfacially Assembled Protein Nanosheets for Guiding Mesenchymal Stem Cell Fate. *Adv. Mater.* 2020, 32, e1905942.
2. X. Jia, J. Song, W. Lv, J. P. Hill, J. Nakanishi, and K. Ariga. Adaptive liquid interfaces induce neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through lipid raft assembly. *Nat. Commun.* 2022, 13, 3110.
3. M. D. Rosenberg. "Cell surface interactions and interfacial dynamics." *Cellular control mechanisms and cancer.* Amsterdam: Elsevier, 1964, 146-164.
4. I. Giaever and C. R. Keese. Behavior of cells at fluid interfaces. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 1983, 80, 219-222.
5. C. R. Keese and I. Giaever. Cell growth on liquid interfaces: Role of surface active compounds. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 1983, 80, 5622-5626.
6. C. R. Keese and I. Giaever. Cell growth on liquid microcarriers. *Science.* 1983, 219, 1448-1449.
7. D. Kong, L. Peng, M. Bosch-Fortea, A. Chrysanthou, C. V. J. Alexis, C. Matellan, A. Zarbakhsh, G. Mastroianni, A. Del Rio Hernandez, and J. E. Gautrot. Impact of the multiscale viscoelasticity of quasi-2D self-assembled protein networks on stem cell expansion at liquid interfaces. *Biomaterials.* 2022, 284, 121494.
8. C. W. Cho, T. P. T. Pham, Y. Zhao, S. Stolte, and Y. S. Yun. Review of the toxic effects of ionic liquids. *Sci. Total Environ.* 2021, 786, 147309.
9. N. Abramenko, L. Kustov, L. Metelytsia, V. Kovalishyn, I. Tetko, and W. Peijnenburg. A review of recent advances towards the development of QSAR models for toxicity assessment of ionic liquids. *J. Hazard. Mater.* 2020, 384, 121429.
10. Y. F. Yano. Kinetics of protein unfolding at interfaces. *J. Phys.: Condens. Matter.* 2012, 24, 503101.
11. J. Bergfreund, P. Bertsch, and P. Fischer. Adsorption of proteins to fluid interfaces: Role of the hydrophobic subphase. *J. Colloid & Interf. Sci.* 2021, 584, 411-417.
12. J. Bergfreund, M. Diener, T. Geue, N. Nussbaum, N. Kummer, P. Bertsch, G. Nystrom, and P. Fischer. Globular protein assembly and network formation at fluid interfaces: effect of oil. *Soft Matter.* 2021, 17, 1692-1700.
13. K. Ishii, T. Sakka, and N. Nishi. Potential dependence of the ionic structure at the ionic liquid/water interface studied using MD simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021, 23, 22367-22374.
14. Y. Iwasaki and K. Ishihara. Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2012, 13, 064101.
15. S. Jiang and Z. Cao. Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Adv. Mater.* 2010, 22, 920-932.
16. K. Ueno, H. Tokuda, and M. Watanabe. Ionicity in ionic liquids: correlation with ionic structure and physicochemical properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 1649-1658.
17. R. Tamate and T. Ueki. Adaptive Ion-Gel: Stimuli-Responsive, and Self-Healing Ion Gels. *Chem. Rec.* 2023, e202300043.
18. T. Ueki, K. Uto, S. Yamamoto, R. Tamate, Y. Kamiyama, X. Jia, H. Noguchi, K. Minami, K. Ariga, H. Wang, and J. Nakanishi. Ionic liquid interface as a cell scaffold. *Adv. Mater.* 2024, 2310105.
19. L. Peng and J. E. Gautrot. Long term expansion profile of mesenchymal stromal cells at protein nanosheet-stabilised bioemulsions for next generation cell culture microcarriers. *Mater. Today Bio.* 2021, 12, 100159.