

## 乳酸センサータンパク質内包コアシェル不織布の機能評価と細胞培養材料への応用

(名工大院工) ○加藤柚奈、水野稔久

【緒言】これまで当研究室では、蛋白質や機能性核酸などの生体高分子を不織布繊維内部に内包固定化する手法を検討してきており、紡糸途中に架橋反応が進行する後架橋可能な水溶性高分子を利用した SCES(In Situ Crosslinking during Electro-Spinning)法を確立することで、これらの変性を抑えた内包固定化に成功している。本研究では、この手法が適応可能な新たな後架橋可能な親水性高分子として、生体適合性の高いメタクリルアミド系モノマー2-Hydroxypropyl methacryl amide(HPMA)とケトン基を側鎖に持つ Diacetone methacrylamide(DAMA)からなるコポリマーPoly(HPMA/DAMA)を開発し、架橋剤として adipic dihydrazide(ADH)、また表面コートする疎水性高分子として Nylon 6 を用いたコアシェル不織布の作製法確立を行った (Fig. 1)。次に繊維内部に内包固定化するセンサー蛋白質として L-乳酸応答性の蛍光センサー eLACCO1.1 を選択し、コア繊維の前駆体水溶液に添加することによる繊維内部への固定化と、得られる eLACCO1.1 固定化不織布の乳酸溶液に対する蛍光応答性の評価を行った。またこの乳酸センサー不織布の細胞センサーとしての将来的な応用を目指し、これを細胞培養足場基材として用いた際の、細胞の接着・増殖性、さらに細胞から分泌される乳酸に対する応答評価を行なった。

【実験・結果】eLACCO1.1 固定化不織布の、乳酸に対する蛍光応答性は、0~100 mM の乳酸を含むバッファー溶液中に不織布を浸漬することにより評価し、濃度上昇に応じた蛍光強度の上昇と飽和挙動が見られた。また終濃度 10 mM の乳酸溶液を不織布へ添加し時間経過ごとに蛍光測定を行なったところ、溶液中と同等の応答速度が見られ、さらに乳酸の除去により一旦蛍光強度の減少が見られつつも、新たな乳酸添加時には同程度の蛍光応答強度、速度が維持された (Fig. 2)。細胞接着・増殖性評価では、不織布を 15 mmφ の円形に切り抜き 24 穴ウェルの底面に設置、10%FBS を含んだ DMEM に浸漬後、30000 cells/well の NIH3T3 細胞を播種し、各培養期間での細胞数の変化を MTT アッセイ、共焦点顕微鏡観察により評価した。その結果、ポジティブコントロールとして用いたカバーガラスと同等の、細胞接着・増殖性を示すことがわかり、Poly(HPMA/DAMA)/ADH-nylon6 不織布が、細胞培養足場材として利用可能であった (Fig. 3)。最後に、この eLACCO1.1 を内包させた不織布上で、ガン細胞、線維芽細胞の細胞種の異なる細胞を培養した際の蛍光応答性の評価をおこない、予想通りにガン細胞にて有意な乳酸分泌量の増加が見られた。この結果は、今回検討を行っている poly(HPMA/DAMA)/ADH-nylon6 不織布が、様々なセンサー蛋白質を培養材料の中で働かせる場として有効であることを示唆した。

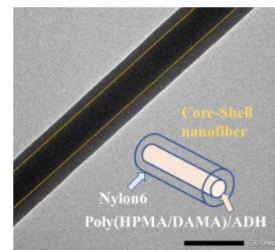


Fig. 1 TEM image of nanofibers in the eLACCO1.1-encapsulated fibermat, consisting of Poly(HPMA/DAMA)/ADH (for core fibers) and Nylon 6 (for shell) ( $D = 411.5 \pm 16.9$  nm).

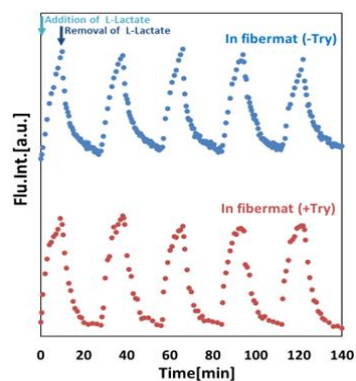


Fig. 2 Fluorescence responses to L-lactate (10 mM) of the eLACCO1.1-encapsulated fibermat before (upper) and after (lower) treatment of trypsin digestion.

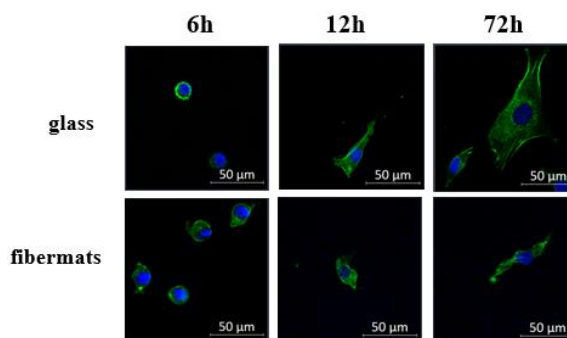


Fig. 3 Alteration of cell morphologies of NIH3T3 cells onto the poly(HPMA/DAMA)/ADH-nylon6 fibermats, according to cell incubation for 6, 12, and 72 hr in DMEM with 10% FBS at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.

Functional evaluation of core-shell fibermats encapsulated with lactate sensor proteins and their application to cell incubation ○Yuna Kato, Toshihisa Mizuno\*, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 488-8555 Japan, TEL: +81-52-735-5237, E-mail: y.kato.824@stn.nitech.ac.jp