

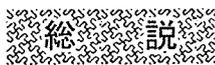


Title	高分子ナノ薄膜を用いた細胞表面の制御に基づく細胞積層技術
Author(s)	松崎, 典弥; パニニー, チャーパユーン; 西口, 昭広 他
Citation	科学と工業. 2012, 86(9), p. 318-324
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50292
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka



高分子ナノ薄膜を用いた細胞表面の 制御に基づく細胞積層技術

松崎 典弥, パニニー チャーパユーン, 西口 昭広, 明石 満

材料と細胞の相互作用, もしくは, 細胞と細胞の相互作用を制御することは, 生体材料の研究だけでなく医療機器開発においても重要である。我々は, 細胞表面に直接高分子ナノ薄膜を形成することで, 細胞-細胞間の接着を制御し, 細胞を自在に積層化できる細胞積層法を考案した。本手法により, 様々なヒト細胞で構成される三次元のヒト生体組織モデルを構築し, 生体外での薬剤応答評価への応用を検討した。さらに, 本手法を改良した細胞集積法により, 厚さ 100 μm 以上の組織を 1 日で作製できるだけでなく, 毛細血管やリンパ管に類似の脈管構造を有する組織モデルの構築が可能であった。これらの手法で得られるヒト生体組織モデルは, 動物実験の代替法として薬剤評価, 化粧品・化成品評価などへの応用が期待される。

キーワード: 細胞接着性, 交互積層法, ナノ薄膜, 細胞積層法, 細胞集積法, 生体組織モデル

1 はじめに

基材表面の性質を理解し, 細胞の接着・非接着性, タンパク質の吸着・非吸着性, 血液適合性を制御することは, 生体材料や人工臓器, 診断材料の開発において重要であり, 現在でも大きな課題の一つである。最近では, 基材表面の硬さ・柔らかさが細胞の接着性だけでなく移動性や幹細胞の分化誘導にも大きく影響を与えることが報告されており, 表面の化学的性質だけでなく物理的性質の重要性が明らかにされつつある。このように, 材料-細胞間の相互作用を理解することは, 細胞のパターニングだけでなく埋植材料や組織工学の足場材料の表面設計にも大変重要である。さらに, 材料-細胞間の相互作用だけでなく, 細胞-細胞間の相互作用を制御できれば, 細胞機能の高発現や細胞の三次元組織化が可能となり, 生体組織に類似の三次元構造と機能を併せ持つ生体組織モデルの構築が期待される。

本稿では, 材料表面への細胞接着, また, 細胞表面への材料形成 (ナノ薄膜形成) において重要となる要因を概説し, さらに, 細胞-細胞間の相互作用を応用した細胞の三次元組織化 (積層化) について著者らの研究を中心にまとめた。既にいくつかの書籍が材料と細胞の基本的な相互作用を解説しているため^{1,2)}, 詳細はそちらを参照されたい。

2 材料表面への細胞接着

材料表面への細胞接着において重要となるのが細胞接着性タンパク質である。細胞は材料表面に直接接着することはなく, 材料表面に吸着した接着性タンパク質との相互作用により材料表面へ接着する。図 1 は, 材料表面への細胞接着と増殖のイメージを示した。まず, 培養液中の接着性タンパク質が材料表面に吸着し, そのタンパク質に細胞が接触する。その後, 細胞はタンパク質と相互作用をして, 接着・伸展・増殖のプロ

Hierarchical Cell Manipulation by Cell Surface Control Using Polymeric Nanofilms

Michiya MATSUSAKI 国立大学法人大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻 助教 博士(工学) (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1)

Paninee CHETPRAYOON 同 上

Akihiro NISHIGUCHI 同 上

Mitsuru AKASHI 同 上

教授 工学博士

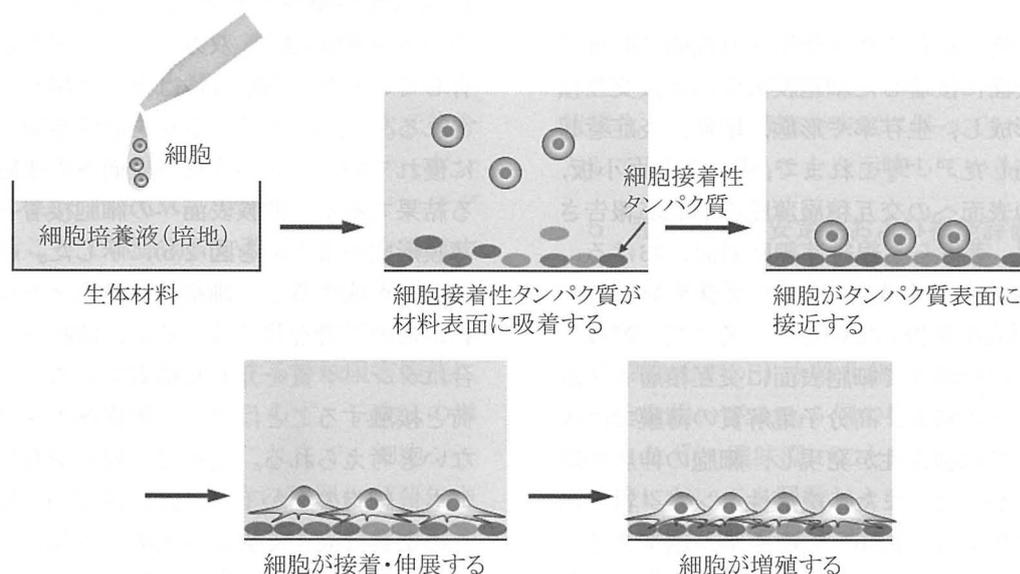


図1 生体材料表面への細胞接着のイメージ

セスに入る。細胞接着性タンパク質として重要なのがフィブロネクチン (FN) やラミニン, コラーゲンなどのタンパク質である。FN はアルギニン-グリシン-アスパラギン (RGD) のアミノ酸配列部位を有しており, このサイトを通して細胞膜タンパク質である $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと相互作用することが知られている³⁾。従って, 細胞接着性および非接着性の表面を設計するためには, FN などの細胞接着性タンパク質の吸着特性を制御することが重要である。例えば, 中西らは, 光刺激に応答して解離する官能基を材料表面に設計し, 細胞非接着性の牛血清アルブミン (BSA) をコーティングした表面を作製した⁴⁾。光を照射した場所でのみ BSA が除去され, FN を添加するとその部分において FN が選択的に吸着する。これにより, 細胞の微細なパターンニングを実現した。

材料表面の親水性や疎水性, 電荷は, 細胞接着と密接に関係していることが知られている。有馬らは, 異なる末端官能基を有するアルカンチオールを用いて調製した自己組織化単分子膜表面への細胞接着を経時的に評価した⁵⁾。疎水性のメチル (CH_3) 基表面では細胞の接近は見られるが接着はほとんど起こらないのに対して, 正電荷を有するアミノ (NH_3^+) 基や負電荷を有するカルボキシル (COO^-) 基表面では 30 分後には多くの細胞が接着する様子が観察されている。一方, 親水性で電荷を有していない OH 基表面では, 疎水性と電荷表面の中間の挙動をとることが明らかにされており, この官能基の違いと細胞接着の関係には, やはり FN などの細胞接着性タンパク質の吸着が関与して

いる¹⁾。

材料の基本的性質を変えずに細胞接着性を付与する手法として, 表面改質は大変有効である。これまで, Langmuir-Blodgett (LB) 法やアルカンチオールの単分子膜作製などが用いられてきたが, 特殊な装置が必要であることや基板が限定的であるなどの課題があった。近年, 簡便かつ精密な表面改質法として交互積層法 (LbL 法) が注目されている。交互積層法は, 相互作用を有する 2 種類の溶液に基板を交互に浸せきするだけで薄膜を調製できる手法であり, ナノレベルでの膜厚制御が可能である (図 2(a))⁶⁾。また, 基板の形態に限定されないため, バルク材料やフィルム, 粒子, カーボンナノチューブなど, 様々な材料表面に適用できる。これまで, 高分子電解質 LbL 薄膜の膜厚, 電荷, 構造に対する細胞接着性^{7,8)}, 増殖性⁹⁾, 分化誘導^{10,11)}との関係が報告されている。簡単にまとめると, 正電荷および負電荷を有する最外層において高い細胞接着性や増殖性が観察され, 前述のアルカンチオールの結果と相関している。しかし, 例えば正電荷の NH_3^+ 基を有する高分子を細胞培養液に添加すると, 負電荷の細胞膜に非特異的に吸着・凝集して細胞膜を破壊し, 高い細胞毒性が発現することも知られている¹²⁾。つまり, 材料表面への細胞接着性に関するこれまでの議論においては, 材料-細胞接着性タンパク質の相互作用が評価されており, 材料-細胞間の相互作用は直接的に評価されていないことに注意が必要である。

3 細胞表面に形成したナノ薄膜の影響

著者らは、細胞と材料の相互作用を直接的に評価するため、基板表面に接着した細胞膜表面に直接交互積層ナノ薄膜を形成し、生存率や形態、増殖、炎症惹起への影響を評価した^{13,14)}。これまで、赤血球や血小板、酵母菌や細菌の表面への交互積層薄膜の形成が報告されており^{15~17)}、著者らも線維芽細胞表面における、細胞接着性タンパク質である FN とゼラチンの薄膜 (FN-G 薄膜) 形成を報告している¹⁸⁾。そこで、溶液では毒性を発現しない濃度で細胞表面に交互積層ナノ薄膜を形成した。その結果、高分子電解質の薄膜では膜厚の増加に伴って細胞毒性が発現し、細胞の伸展や増殖は観察されなかった。また、炎症性タンパク質であるインターロイキン 6 (IL-6) の産生量が増加することも確認された。一方、FN との特異的相互作用がある FN-G 薄膜や FN-DS 薄膜 (FN-デキストラン硫酸薄膜) の場合、良好な伸展形態と高い増殖性が観察され、細胞毒性は全く無く、IL-6 の産生量に変化はなかった。これらの原因は、高分子の電荷に起因すると考えられる。高分子電解質薄膜の場合、正電荷の高分子が薄膜

形成により濃縮されることで細胞膜と強く相互作用し、細胞毒性が発現したと考えられる。一方、FN-G や FN-DS 薄膜の場合、双方とも中性緩衝液中で負電荷を有しているため細胞毒性は全く発現しなかったと推察される。これらは、“正電荷を有する表面が細胞接着性に優れている”という材料表面への細胞接着とは異なる結果である。薄膜表面への細胞接着と細胞表面への薄膜形成のまとめを図 2(b)に示した。細胞表面にナノ薄膜を形成すると、細胞膜は薄膜と直接接触するため正電荷の影響を強く受けるが、薄膜への細胞接着の場合はタンパク質を介した接着であるため直接的に正電荷と接触することはなく、細胞へのダメージは発現しないと考えられる。従って、同じ交互積層薄膜であっても、細胞の上か下か、直接接触か間接触かで細胞への影響は大きく異なるため、生体材料を設計する上で細胞との接触を考慮することは重要である。

4 細胞積層法

細胞表面へナノ薄膜を形成する手法は、臓器移植における免疫隔離膜形成¹⁹⁾や標的部位への細胞移植²⁰⁾などへの応用が期待されている。著者らは、細胞表面

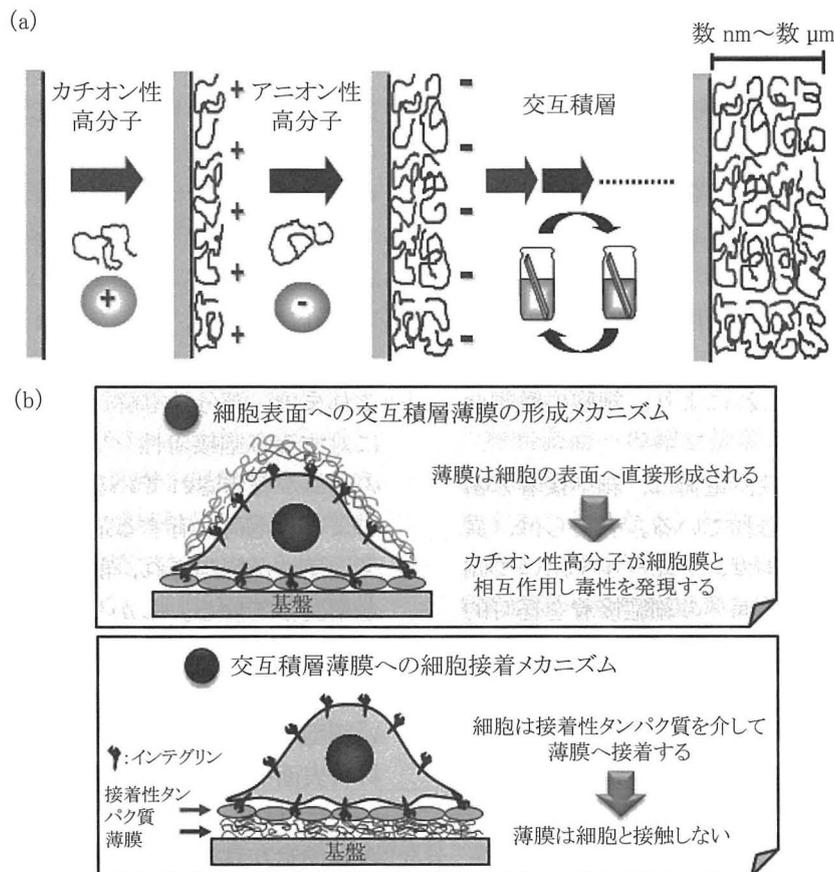


図 2 交互積層法

(a), プロセスのイメージ; (b), 細胞表面および下部の薄膜と細胞の関係

へ FN-G 薄膜を形成することで細胞-細胞間の相互作用を制御し、生体外で三次元組織の構築を可能とする「細胞積層法」を考案した。

生体組織は、種々の細胞と細胞接着性タンパク質の細胞外マトリックス (ECM) で構成される三次元複合構造体である。細胞と細胞の間に存在するコラーゲンや FN, ラミニンなどの ECM 成分が細胞膜のインテグリンと結合することで細胞接着や遊走, 増殖を誘導する。従って, 細胞を用いて三次元的な構造体を形成するためには ECM 成分が必要不可欠である。通常の細胞培養法では, 過密になると発現する接触阻害機能により自発的な三次元構造形成が起こらず, 二次元の単層構造しか得ることができない。これまで, 細胞シートを重ねる手法²¹⁾などによる細胞の重層化が報告されているが, 操作が煩雑であった。著者らは, 単層の細胞表面へ ECM 成分のナノ薄膜を形成し, 次層の細胞の接着足場を提供することで, 細胞の三次元構造体を形成できるのではないかと考えた。つまり, 細胞積層法とは細胞の表面に ECM の“ナノレベルののりづけ”をつくることで細胞を1層ずつ積み上げる手法である (図 3)¹⁸⁾。本手法は, ECM の成分や膜厚を制御しながら細胞を一層ずつ積層できるため, 望みの細胞と ECM 成分を望みの場所に配置した三次元構造を容易に作製できる, 新しい細胞の三次元形成法である。

FN-G 薄膜の膜厚を検討した結果, 少なくともおよそ 6 nm の薄膜を細胞表面に形成するだけで 2 層目の細胞が接着できることを見出した。FN は細胞表面の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンやコラーゲン, ゼラチンとの相互作用ドメインを有しているため, わずか 6 nm という膜厚でも細胞接着足場として機能したと考えられる。一方, 薄膜を形成しない場合や 6 nm 以下の場合, 積層構造を得ることができなかった。本細胞積層法によって, 線維芽細胞や筋芽細胞, 血管平滑筋細胞, 心

筋細胞など, 種々の細胞をその層数を制御して積層できた (図 4)。得られた積層組織は, ピンセットを用いて容易に基板から剥離回収することができた。これは, FN-G 薄膜を介して各層の細胞がお互い十分に接着・組織化して積層構造を安定に保っているため, 移植材として有用であることを示唆している。

5 積層組織の安定性および機能評価

積層組織がいつまで安定に構造を維持できるか明らかにするため, 初代細胞である正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (NHDF) と株化細胞であるマウス L929 線維芽細胞を用いて 1, 3, 5 層の構造を作製し, 最大 4 週間培養した²²⁾。興味深いことに, NHDF の積層構造は 4 週間後においても層数および細胞数がほぼ一定に保たれていたが, L929 細胞の場合, 培養時間に伴い構造が不均一に隆起し, 細胞数も無秩序に増加する結果となった。これは, 初代細胞と株化細胞の性質の違いに起因すると考えられる。初代細胞の場合, お互いが接触すると接触阻害により増殖が停止するが, 株化細胞の多くはこの機能が失われており, がん細胞と同様に際限なく増殖する。この性質の違いにより, 構造安定性が全く異なる結果を示したと推察される。従って, 積層組織を作製する場合は初代細胞を用いることが重要である。

また, 三次元の積層構造と二次元の単層構造が細胞機能に与える影響を評価した^{23, 24)}。通常, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は, 血管内皮増殖培地 (EGM) などの専用培地を用いなければ安定に培養することができない。しかし, 4 層の NHDF 構造の上に HUVEC を積層して培養することで, 一般的なダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) でも安定に培養できることを見出した。この効果は単層の NHDF では全く確認されなかった。さらに, IL-6 の産生量を比較すると, 4 層

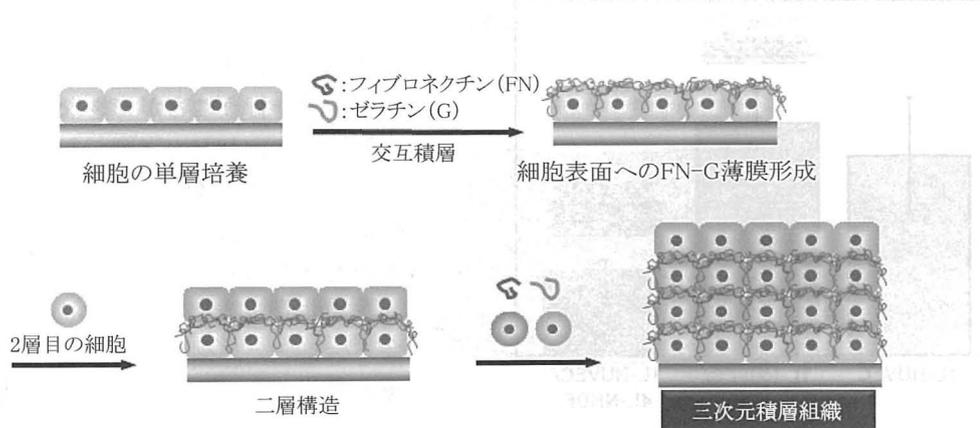


図 3 細胞積層法のイメージ

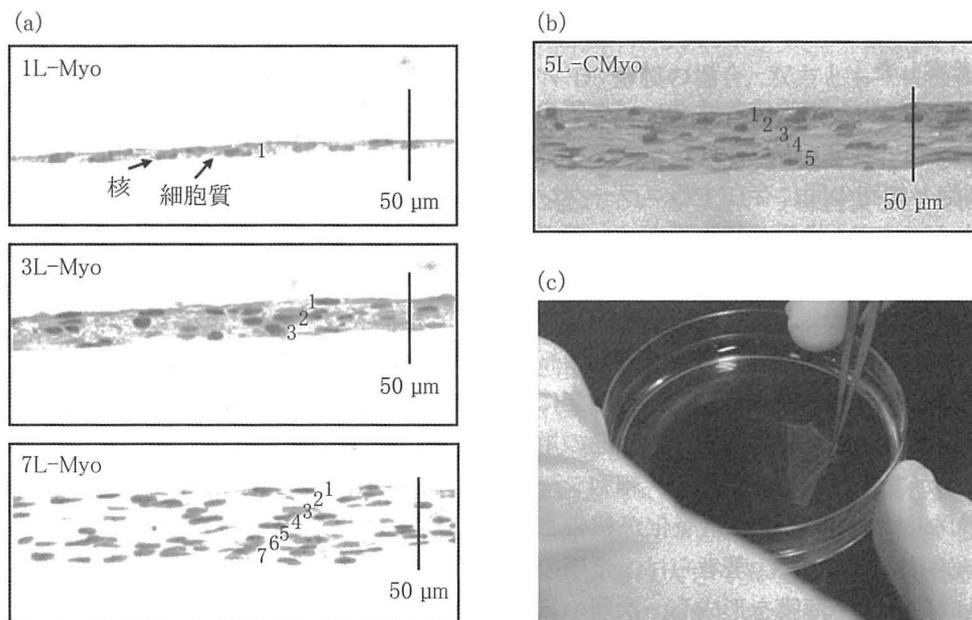


図4 細胞積層法の実施例

(a), マウス C2C12 筋芽細胞 (Myo) の 1, 3, 7 層構造のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色組織切片写真; (b), ラット初代心筋細胞 (CMyo) の 5 層構造の HE 染色写真; (c), 4 層のマウス L929 線維芽細胞組織をピペットで基板から剥離している様子

の NHDF 構造の上で培養することで、単層や通常の培養容器と比較して産生量が半分以下に低下することが明らかとなった (図 5)。また、ストレスを受けた時に産生されるヒートショックタンパク質 (HSP) の産生量を比較すると、驚くべきことに 4 層構造では通常の培養容器の 1/10 に減少することが確認された。通常の培養容器はプラスチックであり、生体内には存在しない物質であるため、炎症を惹起していたと考えられる。一方、積層構造では、ECM 成分である FN-G 薄膜と細

胞のみで構成される生体類似の微小環境を細胞に提示するため、細胞にとって居心地の良い三次元環境であると考えている。

6 血管壁モデルの構築および薬剤刺激応答評価

細胞積層法で血管壁の構造モデルを構築し、生体外での薬剤応答評価への応用を検討した。血管壁は、数層~数十層の血管平滑筋細胞層である中膜と、1 層の血管内皮細胞層である内膜から構成される。血圧の低下は、血管内皮細胞が産出した一酸化窒素 (NO) 分子を受け取ることで周囲の平滑筋細胞が弛緩し、血管が拡張して起こる。そのため、動脈硬化や高血圧薬の開発には、NO 分子の産生と拡散を評価することが重要である。これまでは、動物実験でしかこのような薬剤応答試験を行うことができなかったが、動物とヒトの応答性の違いなどの課題があった。

そこで、ヒト動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) の 4 層構造とヒト動脈血管内皮細胞 (HAEC) の 1 層構造からなるヒト動脈壁モデルを構築し、ホルモン剤に応答した HAEC からの NO 分子の産生と AoSMC 層への拡散を定量的に評価した。別途、NO 分子に応答して蛍光を発するセンサー粒子²⁵⁾を調製して本動脈壁モデルの各層へ配置した。NO 誘導ホルモン剤であるブラジキニンを所定濃度添加し、センサー粒子の蛍光強度の変化を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に三次元観察

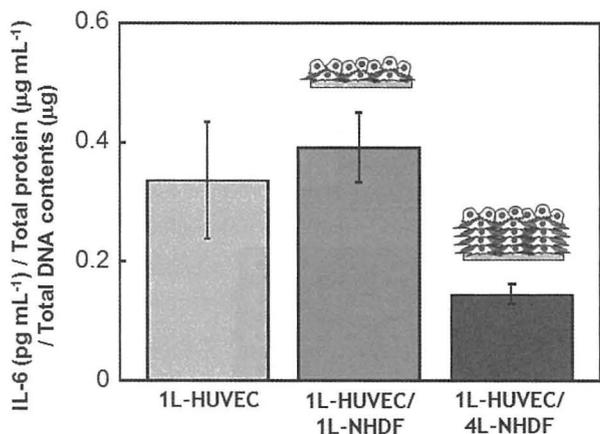


図5 積層構造が IL-6 産生量に与える影響

細胞 1 個が産生する全タンパク質量に対する IL-6 産生量の割合

することで、動物実験と同等の NO 分子の拡散距離を求めことに初めて成功した²⁶⁾。動物実験に代わる新しい生体外での薬剤応答評価方法として期待される。

7 細胞集積法による血管網を有する積層組織の短期構築

以上のように、細胞積層法は望みの細胞種を望みの場所に一層ずつ積層することができる簡便かつ画期的手法であるが、各層の細胞が安定に接着するまで待つ必要があり、一日 2 層の作製が限度であった。より短時間で積層構造を構築できれば、幅広い応用展開が期待される。そこで、単一細胞表面に FN-G ナノ薄膜を形成することで、短時間で積層構造が構築できる細胞集積法を考案した (図 6(a))。各細胞が FN-G 薄膜を介して三次元的に相互作用することで、一度に多層構造が構築できると期待される。

多孔質膜を介して下部から培地を供給できるセルカルチャーインサートを用いて実験を行った。FN-G 薄膜を形成した NHDF をセルカルチャーインサートに播種し、24 時間培養後に組織切片を観察すると、およそ 8 層の積層構造が確認された。一方、薄膜を形成しない場合は空隙や凝集が観察され、均一な構造は得られなかった。これは、FN-G 薄膜が三次元的な細胞接着に機能したことを示している。また、培地の量を最適化することで、最大 20 層、厚さ 100 μm 以上の組織をわずか 1 日の培養で得られることを見出した (図 6(b))。しかし、組織厚が 100~200 μm を超す場合、内部への栄養透過性が低下するため内部細胞がネクロ

シスを起こすと予想される。そこで、組織内部への毛細血管網の構築を試みた。4 層の NHDF 層を形成後、最上層に 1 層の HUVEC 層を形成し、その上に 4 層の NHDF 層を形成して HUVEC をサンドイッチ培養すると、毛細血管網に類似の HUVEC のチューブネットワークが全体かつ均一に形成することを見出した (図 7)²⁷⁾。ネットワークが占める面積は 50~60 % であり、チューブ間距離は 50~150 μm であった。これは、生体内の毛細血管の割合に非常に近い値である。また、リンパ管内皮細胞を同様にサンドイッチ培養することで、リンパ管網類似のネットワークが形成されることも見出しており、さらに、両者を共存されることで、毛細血管およびリンパ管網を有する三次元積層構造が構築できることを世界で初めて見出した。本技術を用いることで、脈管構造を再現したヒト三次元組織モデルの構築が期待される。

8 まとめ

本稿では、材料表面への細胞接着において重要な要因について説明し、また、細胞表面に直接材料を形成する場合とは異なることを概説した。また、細胞表面へのナノ薄膜形成を応用し、生体外での三次元組織構築を目的とした著者らの細胞積層法・細胞集積法について紹介した。最近では、細胞間接着の機構を模倣した表面設計による胚性幹 (ES) 細胞の制御も報告されており²⁸⁾、材料-細胞間の相互作用を理解して応用することは再生医療において大変重要である。

(平成 24 年 6 月 21 日受理)

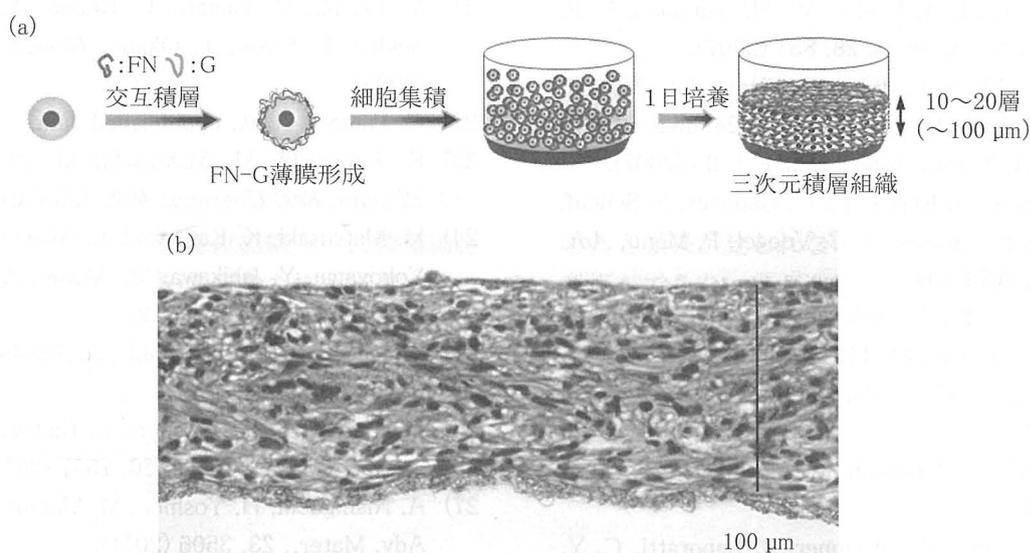


図 6 細胞集積法

(a)、プロセスのイメージ; (b)、細胞集積法により構築した NHDF 積層組織の HE 染色組織切片写真

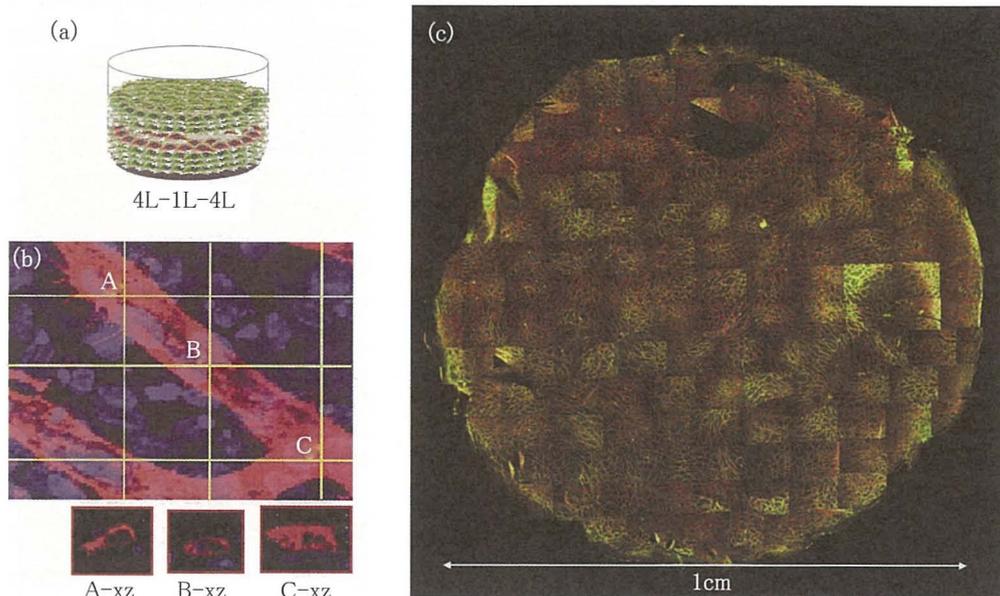


図7 サンドイッチ培養

(a) 4層のNHDFで1層のHUVECをサンドイッチ培養したイメージ; (b) 一週間培養後のCLSMによる三次元観察写真 (HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色し, 核を青に染色した際のA-Cの箇所のx-z平面観察写真); (c) サンドイッチ培養にて一週間培養後のセルカルチャーインサート全体の蛍光観察写真 (NHDFをセルトラッカーグリーンにて緑に染色し, HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色したもの)

文 献

- 1) 岩田博夫, バイオマテリアル, 共立出版 (2005).
- 2) 赤池敏宏, 生体機能材料学, コロナ社 (2005).
- 3) K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **266**, 12809 (1991).
- 4) J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, H. Nakayama, K. Yamaguchi, M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16314 (2004).
- 5) Y. Arima, H. Iwata, *J. Mater. Chem.*, **17**, 4079 (2007).
- 6) G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997).
- 7) D. L. Elbert, C. B. Herbert, J. A. Hubbell., *Langmuir*, **15**, 5355 (1999).
- 8) C. R. Wittmer, J. A. Phelps, W. M. Saltzman, P. R. Van Tassel, *Biomaterials*, **28**, 851 (2007).
- 9) C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J. C. Voegel, S. Muller, J. F. Stoltz., *Biomaterials*, **24**, 3521 (2003).
- 10) E. Jan, N. A. Kotou, *Nano Lett.*, **7**, 1123 (2007).
- 11) N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schoaf, J-F. Stoltz, P. Lacolley, J. C. Voegel, P. Menu, *Adv. Mater.*, **20**, 2674 (2008).
- 12) D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials*, **24**, 1121 (2003).
- 13) K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Langmuir*, **26**, 5670 (2010).
- 14) K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Chem. Lett.*, **41**, 523 (2012).
- 15) B. Neu, A. Voigt, R. Mitlohner, S. Leporatti, C. Y. Gao, E. Donuth, H. Kiesewetter, H. Mohwold, H. J. Meiselman, H. Baumler, *J. Microencapsulation*, **18**, 385 (2001).
- 16) A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi., *Langmuir*, **18**, 5047 (2002).
- 17) B. Wang, P. Liu, W. Jiang, H. Pan, X. Xu, R. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 3560 (2008).
- 18) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara, M. Akashi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007).
- 19) S. Miura, Y. Teramura, H. Iwata, *Biomaterials*, **27**, 5828 (2006).
- 20) N. G. Veerabadrán, P. M. Goli, S. S. Stewart-Clerk, Y. M. Lvov, D. K. Mills, *Macromol. Biosci.*, **7**, 877 (2007).
- 21) Y. Joseph, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai, T. Okano, *Biomaterials*, **26**, 6415 (2005).
- 22) C. Paninee *et al.*, unpublished data.
- 23) K. Kadowaki, M. Matsusaki, M. Akashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 153 (2010).
- 24) M. Matsusaki, K. Kadowaki, E. Adachi, T. Sakura, U. Yokoyama, Y. Ishikawa, M. Akashi, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, **23**, 63 (2012).
- 25) S. Amemori, M. Matsusaki, M. Akashi, *Chem. Lett.*, **39**, 42 (2010).
- 26) M. Matsusaki, S. Amemori, K. Kadowaki, M. Akashi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 7557 (2011).
- 27) A. Nishiguchi, H. Yoshida, M. Matsusaki, M. Akashi, *Adv. Mater.*, **23**, 3506 (2011).
- 28) M. Nagaoka, Y. Hagiwara, K. Takemura, Y. Murakami, J. Li, S. A. Duncan, T. Akaike, *J. Biol. Chem.*, **283**, 26468 (2008).