

Title	第5章 生体材料－細胞間の相互作用
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50600
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

第5章 生体材料—細胞間の相互作用

松崎典弥*1, 明石 満*2

1 はじめに

近年の微細加工技術や表面制御技術の進歩により、ナノ・マイクロオーダーでペプチドやタンパク質、DNAを配列したチップ（アレイ）が作製され、コンビナトリアル合成や医薬品評価などに用いられている¹⁻³。また、これらの技術を細胞に応用することで、一細胞レベルでの細胞パターンニングおよび細胞チップの作製が可能となり、薬剤の毒性評価やハイスループット解析への応用が期待されている⁴⁻⁷。このように、材料表面での細胞の配置を制御するためには、細胞が材料表面へ接着する機構を理解し、細胞接着および非接着に適した表面を設計する必要がある。また、材料—細胞間の接着や相互作用を理解することは、細胞のパターン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、細胞—細胞間の接着や材料—細胞間の相互作用を利用することで、細胞の三次元集積化・組織化を制御することが可能となり、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。

本章では、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—材料間の相互作用を応用した細胞の組織化・積層化の研究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詳細に解説しているため^{8,9}、本章では基礎的な内容は紹介程度にとどめ、その応用について、特に最近注目されている三次元の組織化を中心に解説する。

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ではなく、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のイメージを細胞培養のプロセスで示した。まず、培養液中の接着性タンパク質が材料表面に吸着し、そのタンパク質層に細胞が接触する。その後、細胞はタンパク質層に対して接着・伸展した後に増殖プロセスに入る。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、ビトロネクチンなどの細胞接着性糖タンパク質である。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

*1 Michiya Matsusaki 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 助教

*2 Mitsuru Akashi 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 教授

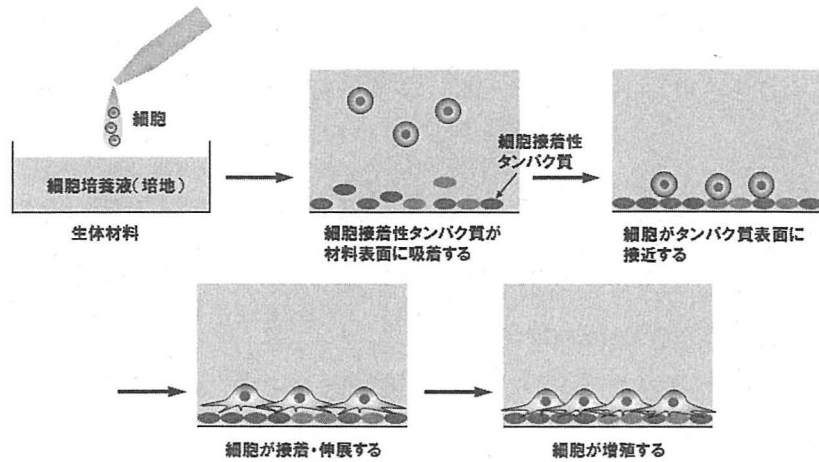


図1 生体材料表面への細胞接着のイメージ

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¹⁰⁾。従って、細胞接着性および非接着性の材料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大変重要である。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。必要な場所のみ光を照射することでBSAが除去され、FNを添加するとその部分のみFNが選択吸着することで細胞のパターニングを実現している⁶⁾。

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され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¹¹⁾。疎水性の 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 NH_3^+ 基や負電荷を有する 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ないOH基表面では、疎水性と電荷表面の間のような挙動をとることが報告されている。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と考えられている⁸⁾。

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もあった。近年、表面改質の簡便かつ精密制御が可能な手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漬するだけで薄膜を調製できる手法であり、簡便かつナノレベルでの膜厚制御に適している (図2a)¹²⁾。特に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、細胞など、様々な材料表面の改質に用いられてきた。これまで、高分子電解質薄膜の膜厚や最外層の電荷、高分子構造と細胞接着性^{13,14)}、増殖性¹⁵⁾、分化誘導^{16,17)}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

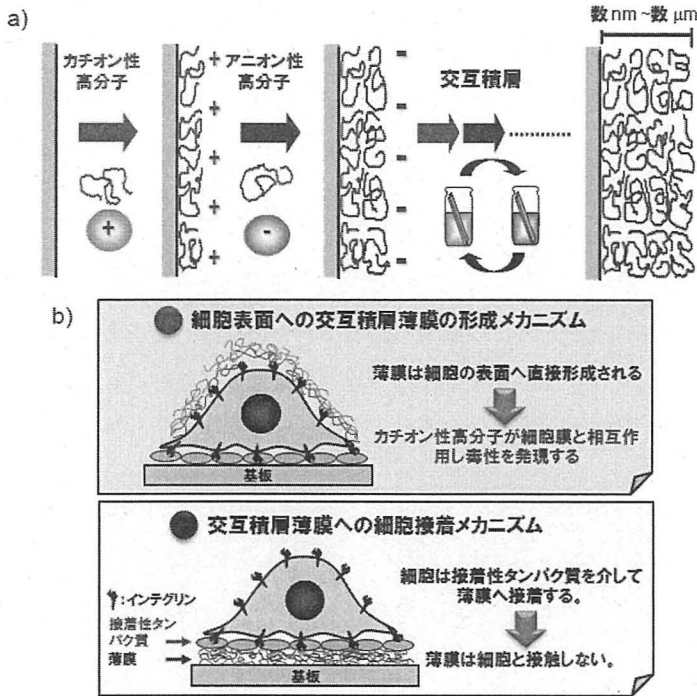


図2 (a)交互積層法のイメージ。(b)細胞表面および下部の薄膜と細胞の関係。

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。しかしながら、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、細胞膜と強く相互作用することで凝集して細胞膜を破壊し、結果として細胞毒性が発現することも知られている¹⁸⁾。つまり、これまでの材料表面への細胞接着性の議論は、材料—細胞接着性タンパク質の相互作用に依存して細胞接着性が評価されており、直接的な材料—細胞間の相互作用では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、増殖への影響を評価した¹⁹⁾。これまで、赤血球や血小板、酵母菌や細菌表面への交互積層薄膜の形成が報告されており^{20~22)}、著者らも線維芽細胞表面への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²³⁾。そこで、それぞれ単独の高分子溶液で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。一方、FNとの特異的相互作用があるFN-G薄膜やFN-デキストラン硫酸薄膜(FN-DS薄膜)の場合、細胞毒性は全く観察されず、良好な伸展形態と高い増殖性が観察され、高い細胞適合性を有していることが確認された。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。これらの結果は、正電荷を有する表面は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2b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、直接的接触か間接的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、臍島移植における免疫隔離膜形成²⁴⁾や標的部位への細胞移植²⁵⁾などへの応用が期待されている。著者らは、細胞表面へFN-G薄膜を形成することで、生体外での三次元組織構築を検討した。

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、自発的な三次元構造形成を誘起するほどのECM成分は産生されず、さらに、細胞の接触阻害機能もあるため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²⁶⁾などによる細胞の三次元化・重層化が報告されており、大変有力な手法であるが、操作が煩雑などの課題もあった。

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、細胞の表面にECMの“ナノレベルのりづけ”をつくることで細胞を1層ずつ積み上げる手法である (細胞積層法, 図3)²³⁾。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操作法として期待される。

接着タンパク質であるFN-G薄膜をおよそ6nmの膜厚で細胞表面に形成すると、二層目の細胞が接着した。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6nm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、FN溶液に一度だけ浸漬してFNのみを吸着させた場合、二層構造は確認されなかった。また、10nmや20nmのより厚いFN-G薄膜を形成した場合においても、

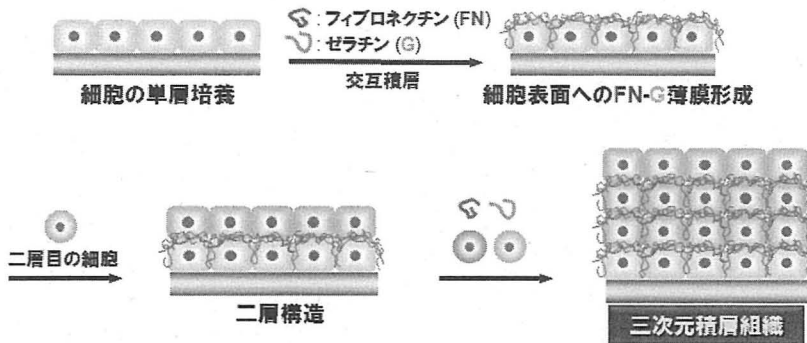


図3 細胞積層法のイメージ

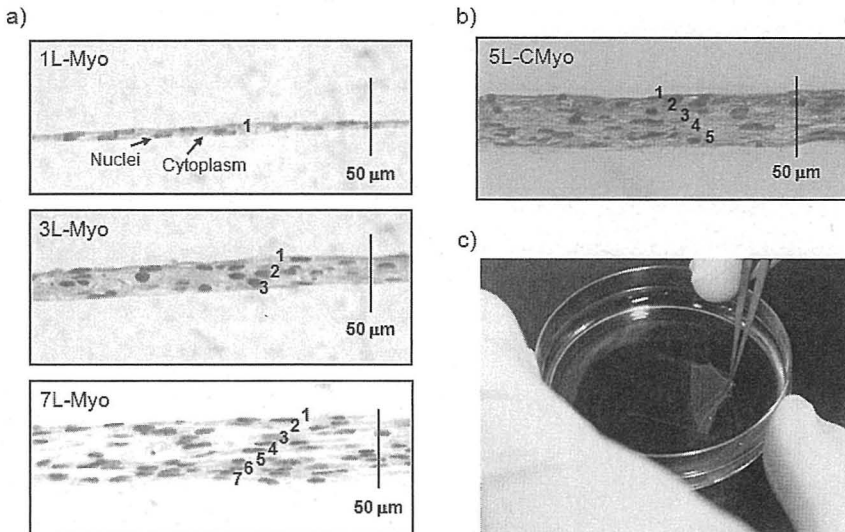


図4 (a) マウス C2C12 筋芽細胞の1, 3, 7層構造のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色組織切片写真。(b) ラット初代心筋細胞の5層構造のHE染色写真。(c) 4層のマウス L929 線維芽細胞組織をピンセットで基板から剥離している様子。

二層構造の形成が確認された。従って、少なくとも6nm以上のFN-G薄膜を細胞表面に形成することで細胞の積層化が可能であることが明らかとなった。本細胞積層法によって、線維芽細胞や筋芽細胞、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ることが確認された(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、積層構造を安定に保っていることを示唆している。さらに、積層化することで単層と比較して細胞がプラスチック培養皿から受けていた炎症が軽減されることや、生体内と同様の高い機能が得られることも見出された^{27, 28)}。これらの機能発現は積層数に依存する傾向であり、ECM成分であるFN-G薄膜と細胞のみで構成される微小環境が生体を模倣した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。さらに、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞を積層

して構築した血管モデル組織と一酸化窒素 (NO) に応答して蛍光を発するセンサー粒子²⁹⁾を組み合わせることで、薬剤刺激に応答した血管内皮細胞からの NO 分子の産生と、周囲の平滑筋細胞層への三次元拡散を、生体外で定量的に評価することに初めて成功した³⁰⁾。平滑筋細胞が NO 分子を受け取ることで血管が弛緩し、血圧が低下するため、高血圧や動脈硬化の薬剤開発において NO 分子の血管内の三次元拡散を評価することは大変重要である。動物実験で求められた NO 拡散距離と同程度の NO 拡散距離が評価できることが確認されたため、動物実験に代わる新しい生体外での評価方法として期待される。

5 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。より短期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、短期間で積層構造が構築できる細胞集積法を考案した (図5)。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 薄膜を形成した細胞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

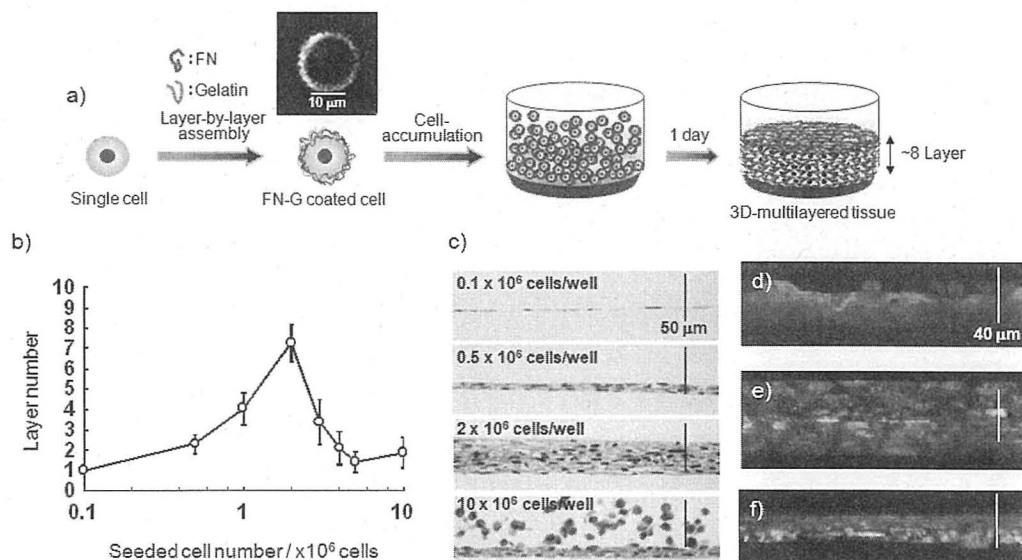


図5 (a)細胞集積法のイメージ。挿入図は、ローダミンラベル化FNとFITC-Gの薄膜をコーティングしたヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の蛍光顕微鏡写真を示した。(b)播種細胞数と得られる層数の関係および (c)HE染色による組織切片写真。(d-f)ヘテロ構造体の構築。セルトラッカーグリーンとセルトラッカーレッドで染色したNHDFを用い、(d)8層+8層、(e)4層+4層、(f)2層+2層+2層構造を作製し、24時間培養後に観察したCLSM写真。

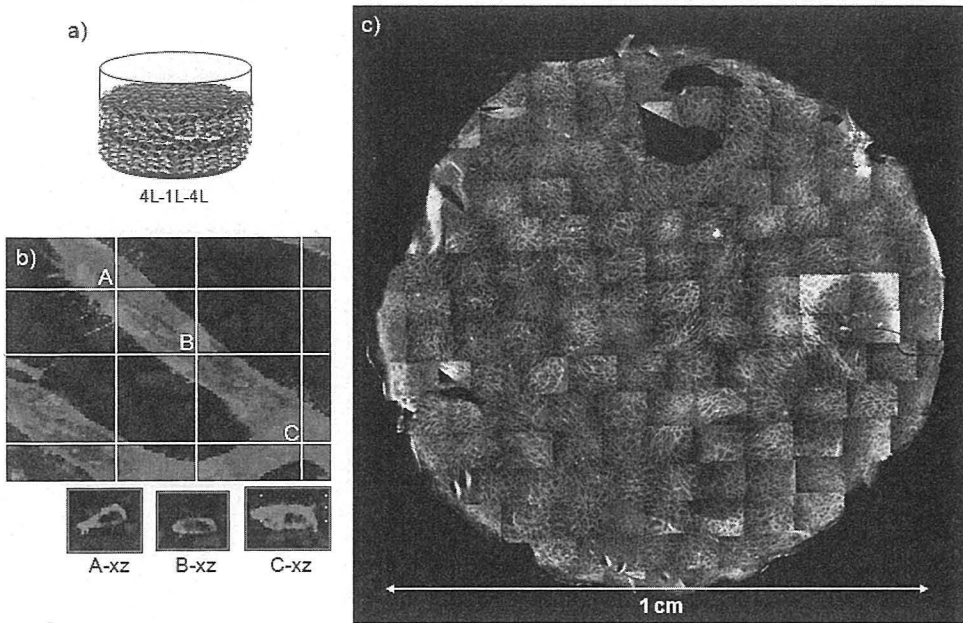


図6 (a)4層のNHDFで1層のHUVECをサンドイッチ培養したイメージ。(b)一週間培養後のCLSMによる三次元観察写真。HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色し、核を青に染色した。A-Cの箇所のx-z平面観察写真。(c)サンドイッチ培養にて一週間培養後のセルカルチャーインサート全体の蛍光観察写真。NHDFはセルトラッカーグリーンにて緑に染色し、HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色した。

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。インサートへの播種細胞数を変化させることで1層から8層まで層数を制御できたが、過剰な細胞を播種すると栄養・酸素供給不足となり、得られる層数が減少することが分かった。また、8層構築後にさらに8層分の細胞を播種しても接着は観察されず、やはり栄養・酸素供給の問題で最大層数が8層であることが確認された。一方、4層+4層や2層+2層+2層など、8層以内でヘテロな積層構造を作製できることが明らかとなった。さらに、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ことで、毛細血管網のような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6)³¹⁾。ネットワークが占める面積はおよそ63%であり、チューブ間距離は50~150 μ mであった。

以上より、単一細胞表面にFN-G薄膜を形成することで、一日で約8層の積層構造の構築が可能であった。また、血管網を有する三次元積層構造も作製できるため、様々な生体組織モデルの構築が期待される。

6 まとめ

本章では、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³²⁾、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。

文 献

- 1) S. P. A. Fodor *et al.*, *Nature*, 364, 555 (1993)
- 2) G. MacBeath *et al.*, *Science*, 289, 1760 (2000)
- 3) R. Singhvi *et al.*, *Science*, 264, 696 (1994)
- 4) E. A. Roth *et al.*, *Biomaterials*, 25, 3707 (2004)
- 5) S. Yamamura *et al.*, *Anal. Chem.*, 77, 8050 (2005)
- 6) J. Nakanishi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 16314 (2004)
- 7) J. Wu *et al.*, *Biomaterials*, 32, 841 (2011)
- 8) 岩田博夫, バイオマテリアル, 共立出版 (2005)
- 9) 赤池敏宏, 生体機能材料学, コロナ社 (2005)
- 10) K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.*, 266, 12809 (1991)
- 11) Y. Arima *et al.*, *J. Mater. Chem.*, 17, 4079 (2007)
- 12) G. Decher, *Science*, 277, 1232 (1997)
- 13) D. L. Elbert *et al.*, *Langmuir*, 15, 5355 (1999)
- 14) C. R. Wittmer *et al.*, *Biomaterials*, 28, 851 (2007)
- 15) C. Boura *et al.*, *Biomaterials*, 24, 3521 (2003)
- 16) E. Jan *et al.*, *Nano Lett.*, 7, 1123 (2007)
- 17) N. Berthelemy *et al.*, *Adv. Mater.*, 20, 2674 (2008)
- 18) D. Fischer *et al.*, *Biomaterials*, 24, 1121 (2003)
- 19) K. Kadowaki *et al.*, *Langmuir*, 26, 5670 (2010)
- 20) B. Neu *et al.*, *J. Microencapsulation*, 18, 385 (2001)
- 21) A. Diaspro *et al.*, *Langmuir*, 18, 5047 (2002)
- 22) A. L. Hillberg *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 3560 (2008)
- 23) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 4689 (2007)
- 24) S. Miura *et al.*, *Biomaterials*, 27, 5828 (2006)
- 25) N. G. Veerabadrán *et al.*, *Macromol. Biosci.*, 7, 877 (2007)
- 26) Y. Joseph *et al.*, *Biomaterials*, 26, 6415 (2005)
- 27) K. Kadowaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402, 153 (2010)

- 28) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* (2011), DOI : 10.1163/092050610X541953
- 29) S. Amemori *et al.*, *Chem. Lett.*, **39**, 42 (2010)
- 30) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 7557 (2011)
- 31) A. Nishiguchi *et al.*, *Adv. Mater.* **23**, 3506 (2011)
- 32) M. Nagaoka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **283**, 26468 (2008)