

Title	4. ナノ薄膜による細胞の三次元操作
Author(s)	松崎, 典弥; 西口, 昭広; 門脇, 功治 他
Citation	
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50601
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

4 ナノ薄膜による細胞の三次元操作

松崎典弥*¹, 西口昭広*², 門脇功治*³, 明石 満*⁴

4.1 はじめに

近年の微細加工技術やインクジェットプリント技術の進歩により、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、1細胞レベルでの細胞パターン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⁴⁻⁸。しかしながら、これらの技術では基板上の細胞の配置を二次元（x-y平面）で制御することは可能であるが、縦方向（z方向）への細胞の配置を制御することは困難である。複数種類の細胞の縦方向の配置を制御して組織化することができれば、立体的な（三次元）生体組織の類似構造を生体外で構築できるため、薬剤に対する細胞—細胞間の相互作用や機能伝達が評価可能となり、生体組織モデルとしての応用が期待される。

生体組織は、種々の細胞と細胞の足場となる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フィブロネクチン（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⁹。したがって、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、ゲル内に細胞を三次元配置する手法や¹⁰、高分子溶液の相分離を応用した細胞の2層構造の形成¹¹、細胞シートを重ねる手法¹²などによる細胞の三次元化・重層化が報告されてきた。これらの手法は大変有力な手法であるが、特殊な装置が必要、操作が煩雑、ECM成分の形成と制御が困難、などの課題があった。

筆者らは、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1）¹³。本手法は、ECMの成分や膜厚を制御しながら細胞を1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。本節では、細胞積層法を用いた細胞の積層構造体の構築と生体組織モデルとしての応用、さらに、インクジェットプリント技術へ応用した組織チップの構築と薬剤評価を紹介する。

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

*2 Akihiro Nishiguchi 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 博士前期課程学生

*3 Koji Kadowaki 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 博士後期課程学生

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

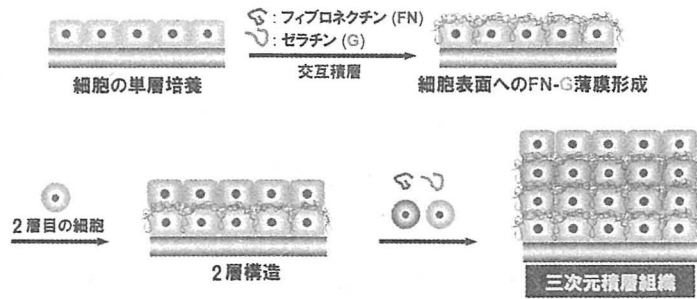


図1 細胞積層法のイメージ

4.2 細胞積層法

細胞表面へECM薄膜を形成する手法として、筆者らは、ナノメートルオーダーで高分子薄膜を調製できる交互積層法 (LbL法) を用いた¹⁴⁾。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。接着タンパク質として知られるFNとコラーゲンの変性体であるゼラチン (G) の交互積層薄膜 (FN-G薄膜) をおよそ6 nmの膜厚で細胞表面に形成すると、2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、FN溶液に一度だけ浸漬してFNのみを吸着させた場合、2層構造は確認されなかった。また、10 nmや20 nmのより厚いFN-G薄膜を形成した場合においても、2層構造の形成が確認された。したがって、少なくとも6 nm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。

交互積層薄膜では静電的相互作用を駆動力とするナノ薄膜がよく用いられるが、この場合、正に荷電した高分子が細胞膜に強く吸着するため膜厚依存的に細胞毒性が発現する¹⁵⁾。一方、FNとGは中性緩衝液中で共に負電荷を帯びているためFN-G薄膜は細胞毒性を示さない。また、ナノ薄膜成分としてタンパク質以外にも合成高分子、糖、ポリアミノ酸なども検討したが、最終的にFN-G薄膜がもっとも細胞適合性に優れているだけでなく、次層の細胞の接着効果も高い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2)。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^{16, 17)}。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よい三次元環境であると考えている。

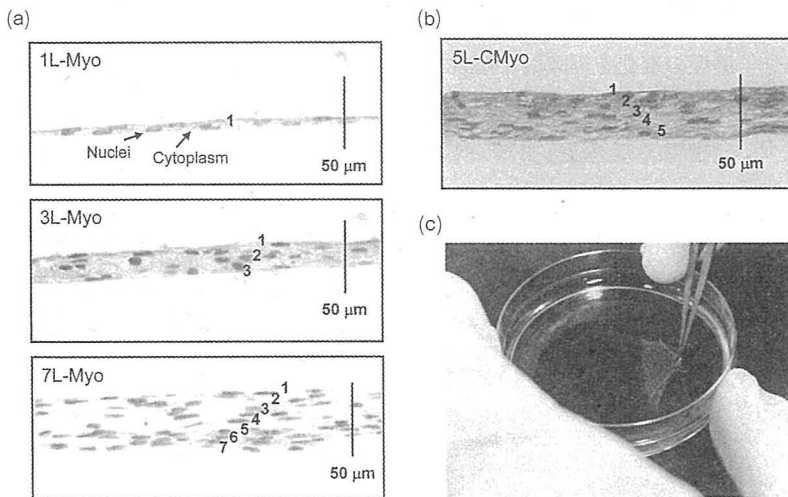


図2 (a) マウスC2C12筋芽細胞の1, 3, 7層構造のヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色組織切片写真。(b) ラット初代心筋細胞の5層構造のHE染色写真。(c) 4層のマウスL929線維芽細胞組織をピンセットを用いて基板から剥離している様子。

4.3 血管モデル組織の構築と薬剤応答評価

血管モデル組織内に拡散したNO分子の濃度を定量的に評価する目的で、NO分子に反応して蛍光を発するマイクロセンサー粒子を作製した¹⁸⁾。NO分子は血管内皮細胞から分泌され、NO分子を受け取った周囲の平滑筋細胞が弛緩することにより血管が拡張し、血圧が降下する。したがって、血管内における内皮細胞から平滑筋細胞へのNO分子の拡散を血管モデル組織により生体外で定量的かつ空間的に評価することができれば、高血圧や糖尿病などの創薬研究において大変重要な知見となる。これまで主に用いられた動物実験による評価系では、低い再現性、動物種差間の差異、定量性の欠如などの問題があった。ヒト細胞を用いて生体外で三次元的な血管モデル組織が構築できれば、動物実験に代わる新しいNO分子の三次元拡散の定量法として有用である。

NO蛍光プローブである4,5-ジアミノフルオレセイン (DAF-2) を直径 $1.6\ \mu\text{m}$ のメソポーラスシリカ粒子に内包し、生体適合性高分子であるキトサン (CT) とデキストラン硫酸 (DS) の交互積層薄膜で粒子をキャップすることで、1ヶ月以上安定なセンサー粒子が調製できた。このセンサー粒子は濃度範囲が $5\sim 500\ \text{nM}$ のNO分子を検出できるため、血管内皮細胞が産出する数百nMのNO分子の検出に最適である。細胞積層法を用いてヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) とヒト大動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) を積層する際に、このセンサー粒子をFN-G薄膜表面へ吸着させることで、各細胞層間にセンサー粒子を配置した5層構造のハイブリッド血管組織を作製した (図3)。ブラジキニンなどのNO産生薬剤を添加することで内皮細胞からNO分子が産出され、下層の平滑筋層へ拡散する。この拡散の際に、平滑筋層に存在するセンサー粒子はNO分子と反応することで蛍光を発するため、センサー粒子の蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡により定

量することで、各層の所定の位置のNO分子濃度を検出できる。本手法を用いて、ブラジキニン添加後のNO分子濃度の変化を経時的に解析した結果、内皮細胞上部と比較して下部へのNO産生が多いことや、平滑筋細胞と積層することで内皮細胞のNO産生量が2倍以上向上することが明らかとなった¹⁹⁾。さらに、共焦点レーザー顕微鏡観察の結果から平滑筋細胞層へのNO拡散距離を算出したところ、およそ60 μm と見積られた(図4)。これまでの*in vivo*および*ex vivo*動物実験により、NO拡散距離はおよそ100 μm と見積られている²⁰⁾。また、血管壁内部でおよそ40%のNO分子が化学反応により消費されるため²⁰⁾、本研究で見積られたNO拡散距離は生体内の血管と

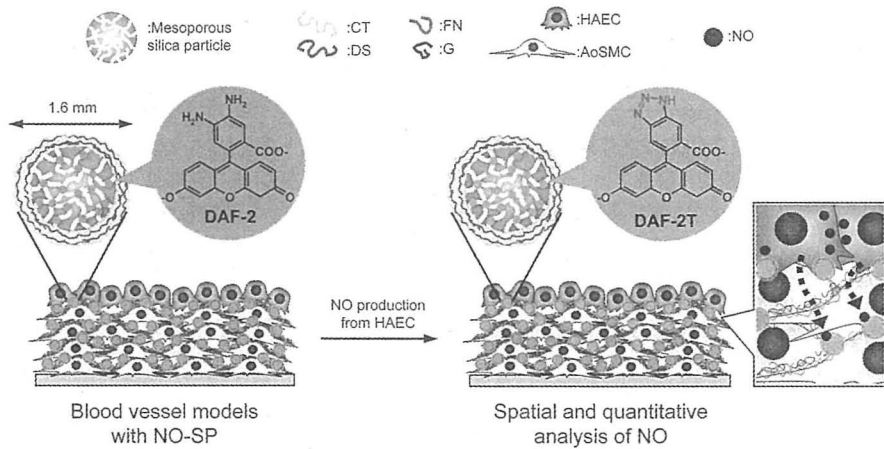


図3 NOセンサー粒子を各層に配置した、動脈内皮細胞(HAEC)と動脈平滑筋細胞(AoSMC)で構成される血管モデル組織によるNO分子の三次元拡散解析のイメージ

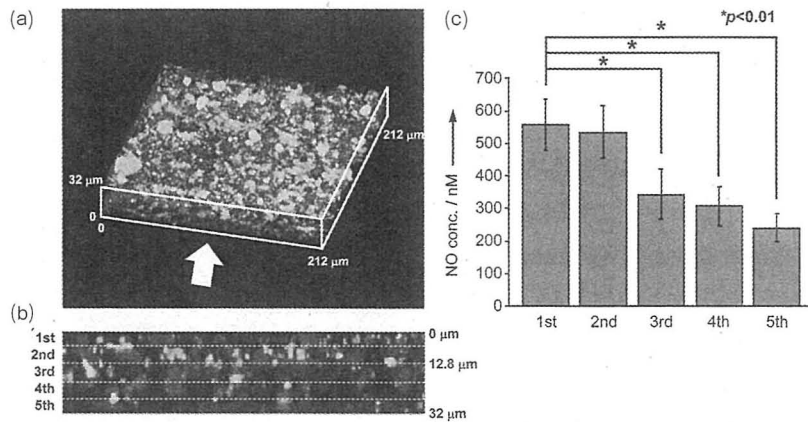


図4 (a) 血管組織内のNO分子に反応したセンサー粒子の共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察写真。青:核, 緑:センサー粒子。(b) (a)の矢印方向から観察した断面写真。(c) センサー粒子の蛍光強度から見積もられた各細胞層のNO分子濃度。

ほぼ同等であると考えられる。以上より、生体外で人工的に構築した血管モデル組織を用いて、NO分子の拡散を定量的かつ空間的に評価することに初めて成功した。

4.4 インクジェットプリントを応用した組織チップの構築と薬剤応答評価

細胞積層法で構築した積層構造体を生体組織モデルとして薬剤応答評価に応用するためには、細胞種や層数が異なる組織モデルを大量に作製する必要がある。マイクロメートルサイズの様々な組織モデルを集約した「組織チップ」が構築できれば、医薬品評価において大変有効である。筆者らは、ピコリットル (pL) オーダーで定量・定点配置が可能なインクジェットプリントに着目した。これまで、インクジェットプリントによる細胞のパターニング⁸⁾や高分子材料と細胞の複合三次元造形²¹⁾が報告されており、特にピエゾ式のインクジェットは発熱などの影響がないため、高い生存率が得られることが知られている。そこで、細胞積層法の手法をピエゾ式のインクジェットに応用して実験に取り組んだ (図5)。

プリンターヘッドの口径と吐出液滴数を変えることで、細胞の吐出数を1個から10,000個まで精密に制御可能であった。また、どの吐出細胞数においても細胞生存率は95%以上と高く、また、NHDF, C2C12, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) など細胞の種類を変えても生存率は95%以上であることが確認された。細胞は自発的に移動するため、チップ化するためには細胞を空間に留める必要がある。そこで、直径500 μm 、高さ200 μm のウェルを440個有するウェル基板を用いた (図6(a)~(c))。このウェル基板へマウスC2C12筋芽細胞を吐出して接着させ、FN溶液とG溶液を交互に吐出することで細胞表面にナノ薄膜を形成した。その後、再び筋芽細胞を吐出することで、筋芽細胞の2層構造を作製することができた (図6(d))。さらに、望みの場所に定量・定点配置できる特性を活かして、ある列だけ1層のHAECをさらに積層した3層構造にすることも容易に可能であった (図6(e))。

組織チップとして薬剤評価への応用を目的として、ヒト肝癌細胞 (HepG2) とHUVECのヘテロ積層組織チップの作製に取り組んだ。肝臓は薬物や化合物を分解する重要な臓器であり、薬物毒性の7割は肝臓で発現するため医薬品開発ではもっとも重要な臓器である。しかし、ヒト初代肝細胞は日本国内では入手困難であるため輸入する必要があり、また、継代培養ができないため

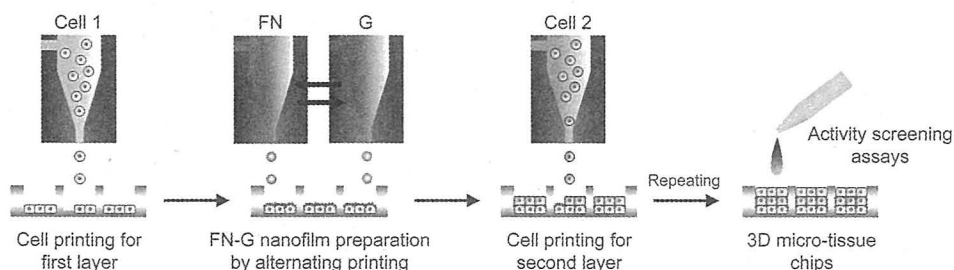


図5 インクジェットプリントによる三次元組織チップの構築イメージ

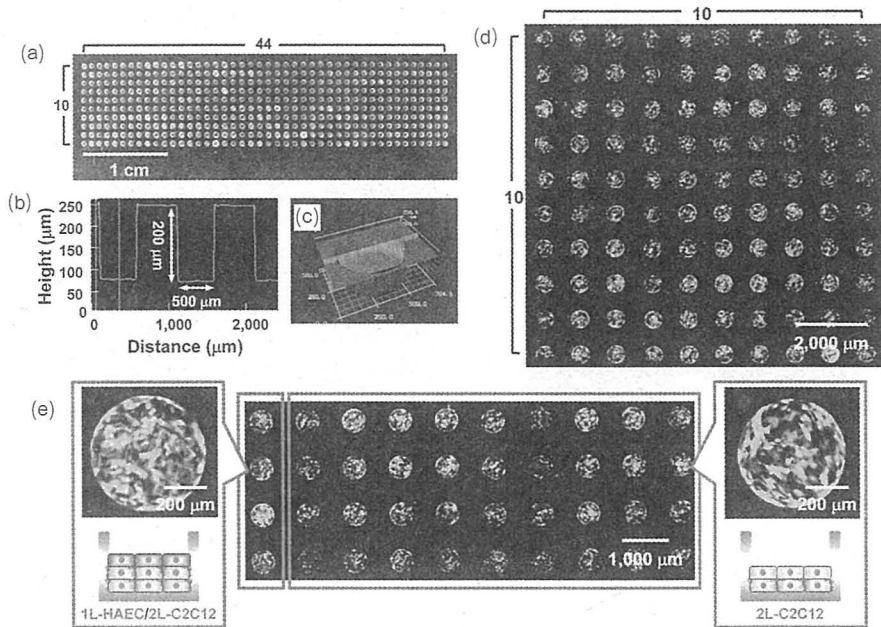


図6 (a) 使用した440マイクロウェル基板。(b), (c) レーザー顕微鏡によるウェルの構造解析。(d) C2C12筋芽細胞の2層構造を作製したチップの蛍光顕微鏡写真。細胞はセルトラッカーグリーンで蛍光染色した。(e) 1層のHAECと2層のC2C12細胞の3層構造(赤枠内)とC2C12細胞の2層構造(緑枠内)を有するヘテロ組織チップの蛍光顕微鏡写真。

高価な初代肝細胞を大量に購入して使用しているのが現状である。一方、HepG2のように株化されて継代培養が可能な肝癌細胞も市販されているが、初代肝細胞と比較して代謝活性が激減している。したがって、HepG2細胞の機能を高めて初代肝細胞に近づけることができれば、薬剤評価に大変有用である。肝組織は肝細胞が血管に挟まれた三次元構造であるため、HepG2をHUVECで挟んだ積層構造を構築することでHepG2の代謝活性の向上が期待される。そこで、HepG2とHUVECの1～3層構造を1枚のチップの中に作製して種々の活性を評価した(図7(a))。肝細胞機能の指標となるアルブミン産生量を評価した結果、7日間培養後において3層構造が1層構造と比較して4倍以上のアルブミンを産生することが明らかとなった(図7(b))。また、薬物代謝酵素の一種であるシトクロムP450 3A4 (CYP3A4)の産生量と活性を評価した結果、やはり3層構造がもっとも高い産生量と代謝活性を有していることが確認された(図7(c), (d))。そこで、実際に毒性がある薬物を用いて評価を行った。トログリタゾン(TGZ)は、インスリン抵抗性を軽減する糖尿病治療薬として市販されたが、肝障害が明らかとなり2000年に自主回収された薬剤である。その後の分析で、CYP3A4で代謝された反応性代謝物が毒性を示すことが明らかとなった²²⁾。そこで、CYP3A4代謝活性が高いほど低濃度のTGZで毒性が発現して死細胞数が増加するため、近年ではCYP3A4の薬物代謝活性試薬として用いられている。図7(e)に、TGZ濃度に対する

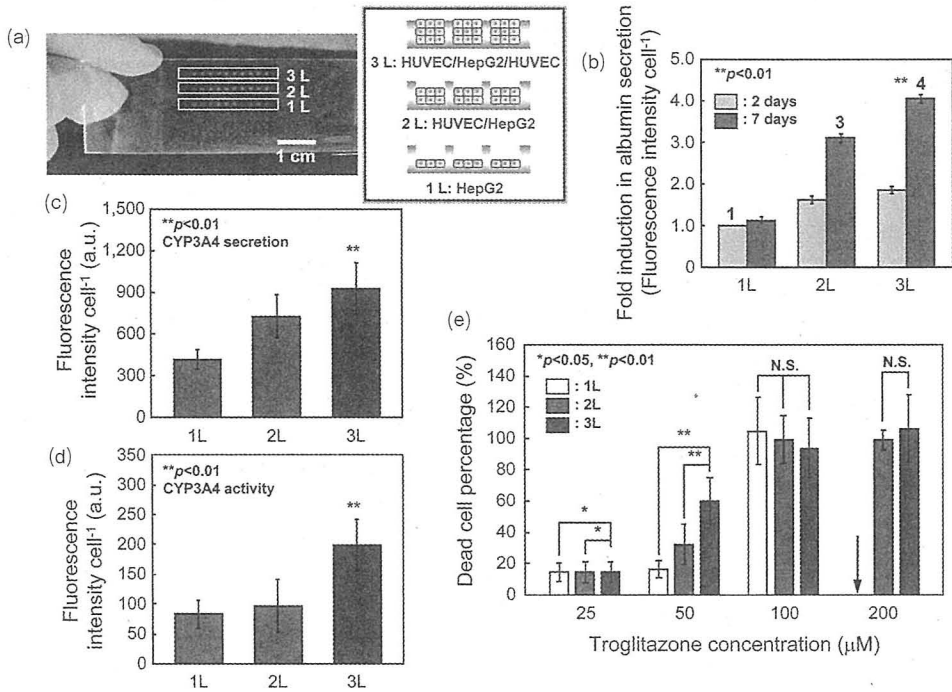


図7 (a) ヒト肝癌細胞 (HepG2) とヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) で作製した1~3層構造の肝組織チップの写真。(b) アルブミン発現量と層構造の関係。抗アルブミン抗体で蛍光染色した各ウェルの蛍光強度で比較した。(c) CYP3A4発現量および(d) 活性と層構造の関係。抗CYP3A4抗体での蛍光染色で発現量を評価し、vivid redを用いて活性を評価した。(e) トログリタゾン濃度に依存した死細胞の割合と層構造の関係。LIVE/DEADアッセイにより死細胞を蛍光強度で評価した。矢印は死細胞が剥離して定量できなかったことを示す。

1~3層構造の死細胞数変化のグラフを示した。3層構造においてより低濃度でも死細胞が顕著に観察され、特にTGZが50 μMの場合、1層構造では16%の死細胞割合であったのに対して3層構造では60% (約4倍) まで増加し、HUVECで挟んだ3層構造にすることでHepG2の薬物代謝活性が向上することが明らかとなった。以上より、肝組織のハイスループットな薬剤評価を可能とする革新的な肝組織チップとして応用が期待される。

4.5 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1層ずつ積層することができる簡便かつ画期的な手法であるが、各層の細胞が安定に接着するまで待つ必要があり、1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8(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(図8(b), (c))。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(図8(d))。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(図8(e), (f))。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9)²³⁾。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50~1,501 μm であった。最近、細胞シート法においてHUVECをサンドイッチ培養することでチューブ形成が起こることが報告されており²⁴⁾、本研究においても同様の現象が見出されたと考えられる。

以上より、単一細胞表面にFN-G薄膜を形成することで、1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

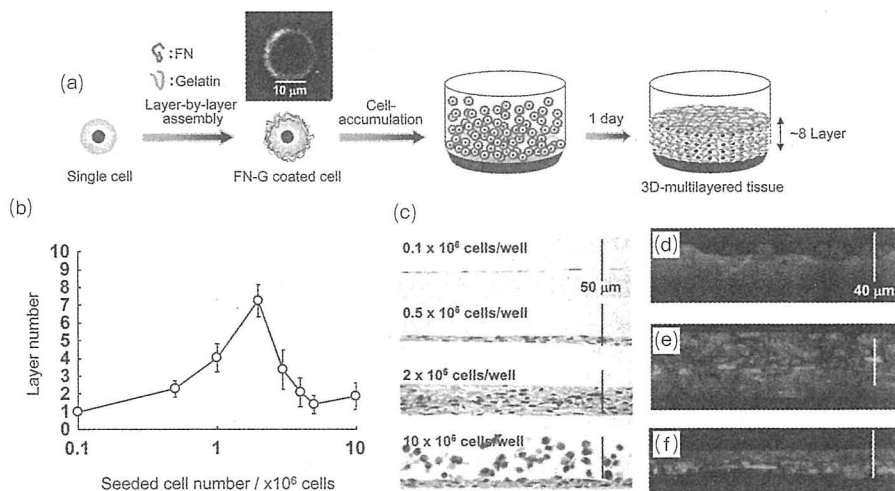


図8 (a) 細胞集積法のイメージ。挿入図は、ローダミンラベル化FNとFITC-Gの薄膜をコーティングしたヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)の蛍光顕微鏡写真を示した。(b) 播種細胞数と得られる層数の関係および(c) HE染色による組織切片写真。((d)~(f)) ヘテロ構造体の構築。セルトラッカーグリーンとセルトラッカーレッドで染色したNHDFを用い、(d) 8層+8層、(e) 4層+4層、(f) 2層+2層+2層構造を作製し、24時間培養後に観察したCLSM写真。

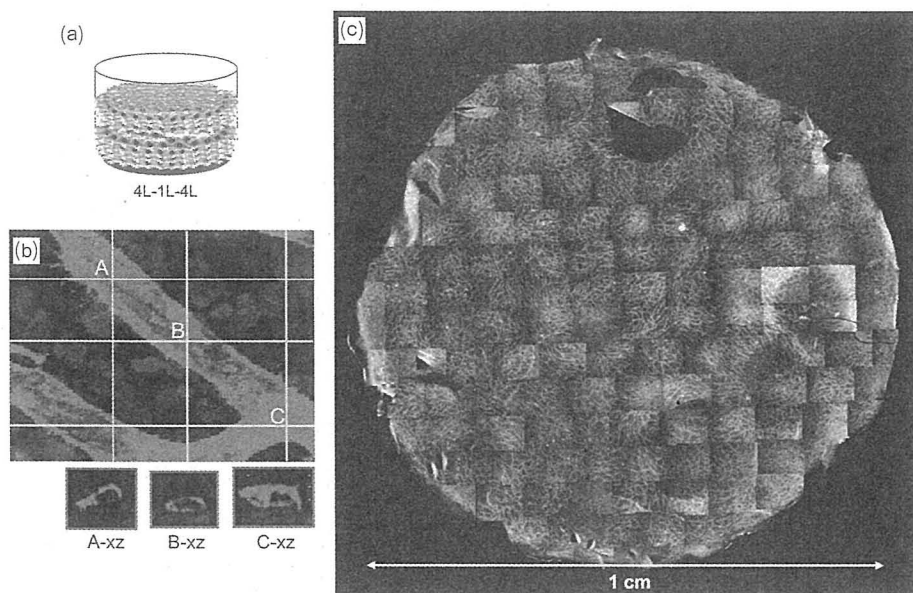


図9 (a) 4層のNHDFで1層のHUVECをサンドイッチ培養したイメージ。(b) 1週間培養後のCLSMによる三次元観察写真。HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色し、核を青に染色した。A-Cの箇所のx-z平面観察写真。(c) サンドイッチ培養にて1週間培養後のセルカルチャーインサート全体の蛍光観察写真。NHDFはセルトラッカーグリーンにて緑に染色し、HUVECを抗CD31抗体にて赤に染色した。

構築が期待される。

4.6 まとめ

細胞の三次元操作を目的として、ECMのナノ薄膜を細胞表面に形成する細胞積層法を考案し、望みの細胞を望みの場所に1層ずつ積層した組織体が構築できることを見出した。得られた積層構造体は、生体組織モデルとして薬物評価などに応用できる可能性を有していた。また、本手法をインクジェットプリント技術へ応用することで様々な積層構造を1枚のチップに集約した組織チップが作製可能であり、作製した肝組織チップが薬物毒性試験に有用であることを明らかにした。さらに、細胞積層法の課題を改善した細胞集積法により1日で10層近くの積層構造が構築可能であり、毛細血管網を有した三次元組織モデルが作製できた。これらの手法は、創薬分野・再生医療分野への応用が期待される。

謝辞

本研究の一部は、NEDO産業技術研究助成事業（06B44017a）ならびにJST-さきがけ事業により実施された。

文 献

- 1) S. P. A. Fodor *et al.*, *Nature*, **364**, 555 (1993)
- 2) G. MacBeath *et al.*, *Science*, **289**, 1760 (2000)
- 3) T. Okamoto *et al.*, *Nat. Biotech.*, **18**, 438 (2000)
- 4) R. Singhvi *et al.*, *Science*, **264**, 696 (1994)
- 5) J. Wu *et al.*, *Biomaterials*, **32**, 841 (2011)
- 6) S. Yamamura *et al.*, *Anal. Chem.*, **77**, 8050 (2005)
- 7) E. Mercey *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 3156 (2010)
- 8) E. A. Roth *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 3707 (2004)
- 9) M. P. Lutolf *et al.*, *Nat. Bioetch.*, **23**, 47 (2005)
- 10) D. R. Albrecht *et al.*, *Nat. Methods*, **3**, 369 (2006)
- 11) H. Tavana *et al.*, *Adv. Mater.*, **22**, 2628 (2010)
- 12) Y. Joseph *et al.*, *Biomaterials*, **26**, 6415 (2005)
- 13) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007)
- 14) G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997)
- 15) K. Kadowaki *et al.*, *Langmuir*, **26**, 5670 (2010)
- 16) K. Kadowaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 153 (2010)
- 17) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* (2011), DOI:10.1163/092050610 X541953
- 18) S. Amemori *et al.*, *Chem. Lett.*, **39**, 42 (2010)
- 19) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2011), **50**, 7557 (2011)
- 20) T. Malinsk *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 1076 (1993)
- 21) P. Calvert, *Science*, **318**, 208 (2007)
- 22) M. Smith, *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 679 (2003)
- 23) A. Nishiguchi *et al.*, *Adv. Mater.*, **23**, 3506 (2011)
- 24) T. Sasagawa *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 1646 (2010)