

| | |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | 1. 細胞積層化技術の開発と生体組織モデルの構築 |
| Author(s) | 松崎, 典弥; 明石, 満 |
| Citation | |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/50604 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

第4章 細胞操作技術

1 細胞積層技術の開発と生体組織モデルの構築

松崎典弥*¹, 明石 満*²

1.1 はじめに

生体組織は、タンパク質・糖タンパク質で構成される細胞外マトリックス (ECM) と細胞により、複雑かつ高度に組織化された構造を有し、機能を発現している。例えば、皮膚は、角質層・顆粒層・有棘層・基底層で構成される表皮組織と真皮組織の階層構造であり、表皮組織は表皮細胞 (ケラチノサイト) とメラノサイト (色素細胞), 真皮組織は細胞成分として線維芽細胞, ECM成分としてコラーゲンやエラスチン, ヒアルロン酸から構成されている。血管壁は、血管内皮細胞で構成される内膜, 平滑筋細胞とコラーゲン・エラスチンで構成される中膜, 線維芽細胞による外膜の3層で構成され, 中膜のエラスチンが血管壁に弾性を与え, 内膜の血管内皮細胞が抗血栓性に重要な役割を担っている。細胞とECMで構成される組織を生体外で構築し, 欠損・疾患部位へ移植して再生医修復することを目的とした新しい医療が再生医療であり, 移植医療・再建外科医療に代わる「第三の医療」として期待されている¹⁾。再生医療では①幹細胞など細胞ソース, ②細胞接着・増殖のための足場材料, ③細胞増殖・分化誘導に重要な細胞増殖因子の3つのキーファクターを組み合わせる活用することが重要である。2007年末, 京都大学の山中教授らによりヒト皮膚細胞から人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を作り出す革新的な技術が報告された²⁾。iPS細胞の樹立により胚性幹細胞 (ES細胞) が抱えていた倫理的問題がクリアされ, 再生医療の実現化が現実味を帯びてきた。そこで求められているのが, 生体外での細胞組織化技術の開発である。

では, なぜ, 細胞の組織化が重要なのか? それは, 細胞だけでは再生医療の実現は困難だからである。たとえば, 細胞のみを用いた再生医療技術として細胞移植が挙げられるが, 移植細胞の流出や壊死により移植効率が極端に低いため, 十分な治療効果を得ることが難しい³⁾。もし, iPS細胞から分化誘導された複数種類の細胞を用いて生体類似組織を構築できれば, 再生医療の本来の目的である組織構築と移植による治療が実現される。また, 生体類似組織は薬剤や化粧品の効果判定にも有効であるため, 再生医療だけでなく創薬や化粧品分野への応用が期待される。

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

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

細胞をECM成分と共に組織化するためには、3次的に細胞を操作する技術が必要である。これまで、生分解性の高分子足場材料を用いた組織形成と移植が研究されてきたが⁴⁻⁷⁾、複数種類の細胞とECMを精密に組織化することは困難であった。また、従来の細胞操作技術として報告されている手法は細胞アレイなどを目的とした細胞の2次元パターンニングがほとんどであり⁸⁻¹⁰⁾、細胞シート法¹¹⁾や磁性粒子法¹²⁾による細胞の積層化も報告されているが、操作が複雑であり、またECM成分と細胞の複合的な組織化は困難である。

生体組織中の細胞は、コラーゲンやフィブロネクチンなどのECM成分に覆われ、3次的に相互作用することで他の細胞と組織化している¹³⁾。しかし、通常の細胞培養では、ほとんどのECM成分は細胞下部において基板への接着をサポートしているだけである。そこで筆者らは、細胞の表面にECMの薄膜を形成できれば、次の細胞の接着足場が提供され、細胞の表面に細胞が接着できると考えた。つまり、細胞の表面にECMののりづけを形成することで細胞を1層ずつ積み上げていく方法である。また、ECM薄膜形成と細胞接着を繰り返すことで、望みの積層数と細胞種、適したECMで組織化された積層化組織が構築できると期待される。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。ECM薄膜成分として、接着タンパク質として知られているフィブロネクチン(FN)とゼラチン(G)に着目した。FNは柔軟な多機能性糖タンパク質であり、細胞の接着だけでなく移動や分化誘導にも重要な役割を果たしている¹⁵⁾。また、FNは細胞表面の $\alpha_6\beta_1$ インテグリンやコラーゲン(ゼラチン)、ヘパリンなどのグリコサミノグリカンとの相互作用ドメインを有している¹⁶⁾。最近我々は、FNとG、ヘパリン、エラスチンなど、FNをベースとした交互積層膜の作製を見出している¹⁷⁾。

そこで、様々な細胞表面へFNとGの薄膜(FN-G薄膜)を形成し、薄膜形成と細胞接着を繰り返すことで細胞の積層化を試みた(図1)¹⁸⁻²⁰⁾。また、本手法を用いて、ヒト血管平滑筋細胞と血管内皮細胞による血管モデルの構築に取り組んだ。

1.2 フィブロネクチン-ゼラチン薄膜の形成

FNとゼラチン(FN-G)薄膜の形成は、水晶発振子マイクロバランス(QCM)を用いて評価した。QCMの金基板を0.2mg/mLのFN/トリス緩衝液(50mM, pH=7.4)に37°Cで15分間浸漬し、トリス緩衝液を用いて洗浄後に振動数を測定した。次に、0.2mg/mLのG/トリス緩衝液(50mM, pH=7.4)に37°Cで15分間浸漬し、洗浄後に振動数を測定した。このステップを繰り返した際の振動数変化よりFN-G薄膜の形成を評価した。FNとGの溶液に交互にQCM基

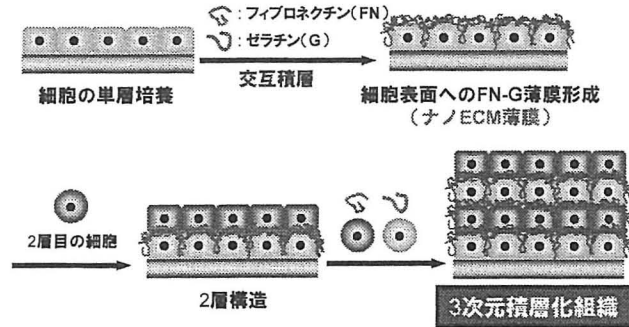


図1 細胞表面へのFN-G 薄膜形成と細胞積層化のイメージ

板を浸漬することで、振動数の逐次的な減少が観察され、FN-G 薄膜の形成が示唆された。交互浸漬を9ステップ繰り返すことで、およそ12.5nmの薄膜の形成が確認された。これまで、高分子電解質による静電的相互作用を駆動力とした薄膜形成が広く研究されている。FNとGは、中性条件下で共にアニオン性であるにも関わらず薄膜が形成されることが明らかとなった。これは、FNのコラーゲン結合ドメインを介した特異的認識を駆動力として薄膜が形成されたと考えられる。筆者らは、FNがヘパリン結合ドメインを有していることに着目し、FN-ヘパリンやFN-デキストラン硫酸薄膜が形成できることも見出している¹⁷⁾。形成したFN-G薄膜は10%のウシ胎仔血清 (FBS) を含むEagle's培地中で安定であり、細胞表面へ薄膜形成後の培養時に膜の剥離や血清タンパク質の吸着が起こらず安定に存在することが示された。FNとGがQCM基板上で薄膜を形成することが確認されたが、実際に細胞膜表面へのFN-G薄膜の形成を検討するため、細胞膜モデルとしてリン脂質二分子膜を用いてFN-G薄膜の形成を評価した。Krishnaらの報告²¹⁾に従い、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) と1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DPPA) の4:1の二分子膜をQCM基板上に作成し、FNとG溶液に交互に浸漬した結果、FN-G薄膜の形成が確認された(図2)。形成される膜厚はQCM基板と比較して減少したが、1, 7, 23ステップで2.3, 6.2, 21.1nmのFN-G薄膜の形成が明らかとなった。また、実際の細胞膜表面への薄膜形成を評価する目的で、ローダミンラベル化FN (Rh-FN) を用い、マウスL929線維芽細胞表面への薄膜形成を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により観察した。基板としてカバーガラスを用い、セルトラッカーグリーンで蛍光ラベル化したマウスL929線維芽細胞を播種した後に6時間インキュベートすることで接着・伸展させた。0.2 mg/mLのRh-FN/トリス緩衝液 (50 mM, pH=7.4) に37℃で15分間浸漬した後、50mMのトリス緩衝液に1分間浸漬することで洗浄し、0.2 mg/mLのG/トリス緩衝液 (50 mM, pH=7.4) に37℃で15分間浸漬させた後に洗浄した。このステップを7回繰り返すことでおよそ6.2nmのRh-FN-G薄膜を細胞表面に形成し、CLSM観察を行った。セルトラッカーグリーンによる細

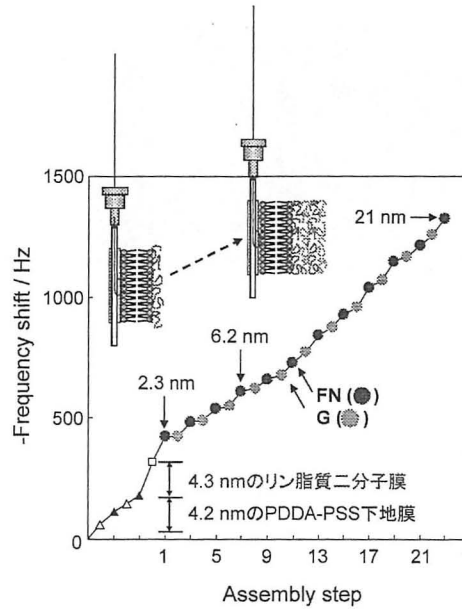


図2 リン脂質二分子膜上へのFN-G薄膜形成によるQCMの振動数変化

胞の蛍光像とRh-FN-G薄膜の蛍光像，これらの重ね合わせ画像の表面および断面イメージを図3に示した。細胞由来の緑の蛍光と薄膜由来の赤の蛍光像が完全に一致し，重ね合わせることで黄色になったことから，本手法により細胞表面へのRh-FN-G薄膜の形成が示唆された。また，薄膜形成を定量的に評価する目的で，交互積層ステップ数と薄膜の蛍光強度の関係を図3dに示した。ステップ数の増加に伴いRh-FNの蛍光強度が増加したことから，細胞膜表面においても逐次的な薄膜の形成が確認された。また，図3dの挿入図にラインスキャンによる細胞と薄膜由来の蛍光強度を示した。セルトラッカーグリーンで染色したL929細胞とRh-FNの蛍光範囲が一致したことから，細胞膜表面のみにRh-FN-G薄膜が形成されていることが明らかとなった。

以上より，交互積層法を用いることで細胞膜表面へのFN-G薄膜の形成が可能であり，各溶液への浸漬回数によりその膜厚をナノレベルで制御できることが明らかとなった。

1.3 細胞積層化の検討

細胞表面へのFN-G薄膜の形成が確認されたため，実際にFN-G薄膜形成による細胞の積層化を検討した。基板としてカバーガラスを用い， $8 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ の細胞密度（コンフルエント密度）でマウスL929線維芽細胞を播種し，6時間インキュベートすることで接着させた。この基板をFNとGの溶液に交互に浸漬し，7回繰り返すことでおよそ6.2nmのFN-G薄膜を細胞表

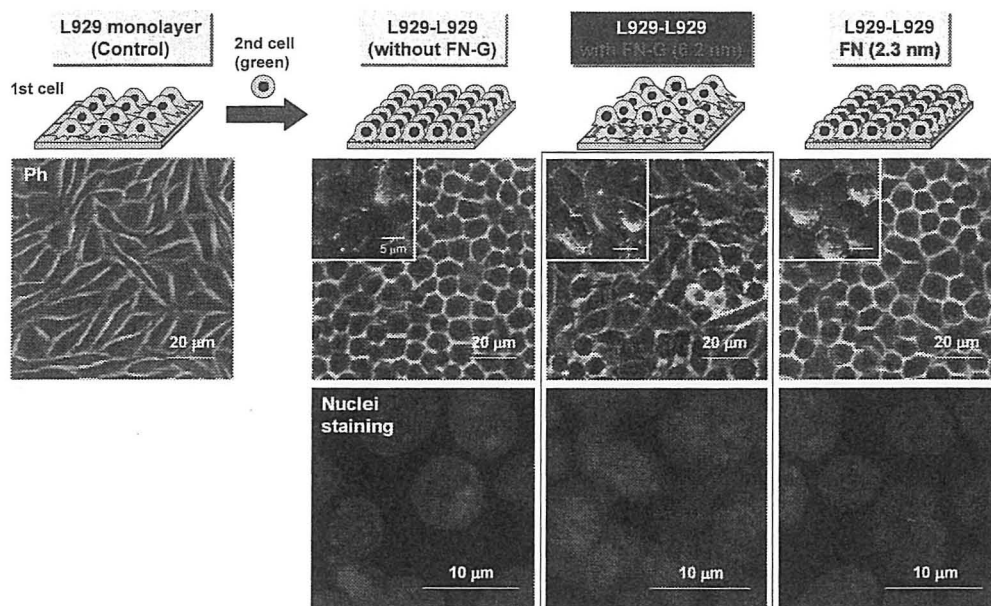


図4 FN-G 薄膜存在・非存在下でのL929細胞表面への蛍光ラベル化L929細胞接着の評価(巻頭カラー参照)

1.4 細胞の3次元積層化

第1層目の細胞表面に6.2nmのFN-G薄膜を形成することで第2層目の細胞の接着が明らかとなったため、本手法を用いて細胞の3次元積層化を試みた。まず、マウスL929線維芽細胞の4層積層化組織の構築を試みた。上記手法より第1層目の細胞表面に6.2nmのFN-G薄膜を形成し、第2層目の細胞を播種して12時間インキュベートすることで細胞を積層化させた。再びFNとGの溶液に交互に浸漬することで第2層目の細胞表面に薄膜を形成し、第3層目の細胞を接着・伸展させた。この操作を繰り返すことで、L929細胞の4層積層化組織を構築した。セルトラッカーグリーンで蛍光ラベル化したL929細胞を4層積層化し、CLSMにより表面および断面観察の3次元イメージを解析した。細胞が積層化している様子が確認され、その厚さはおよそ25 μm であった。図3aに示したように、接着したL929細胞の単層の厚さがおよそ6.6 μm であり、理論的な4層の厚さと一致することから、L929細胞の4層構造が示唆された。また、4層積層化組織のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色により積層化構造を詳細に評価した。HE染色による4層積層化構造(図5a)の切片を観察した結果、青く染色された核が縦方向に4層連なり、桃色に染色された細胞質および細胞外マトリックスが観察されたことから、4層の積層化構造が確認された。厚さはおよそ24 μm で、CLSMの3次元イメージと良く一致していた。一方、単層のL929細胞の場合、4層構造とは明らかに異なり、細胞が1層で存在していることが確認された(図5b)。また、L929細胞の積層数と厚さの関係調べるため、1, 3, 4層

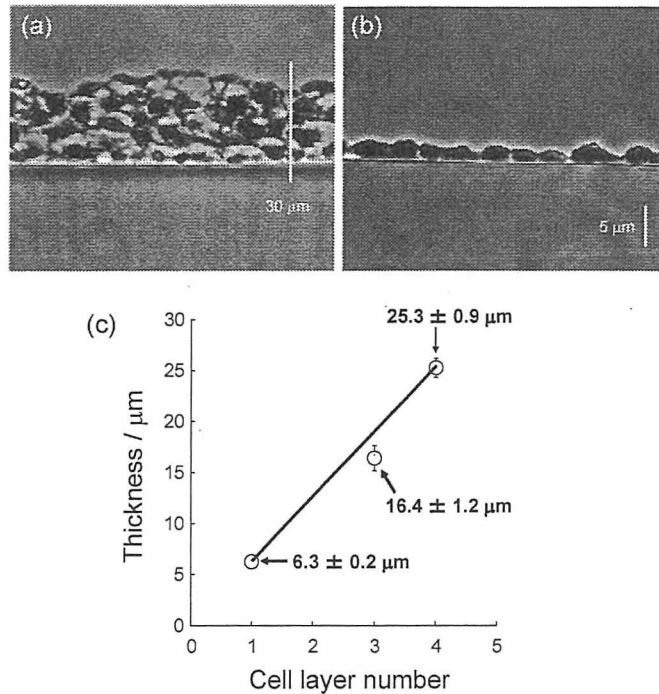


図5 ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による4層 (a) および1層 (b) 構造のパラフィン切片写真。共焦点レーザー顕微鏡観察より求めた厚さと層数の関係 (c)

の積層構造を作成し、CLSMの3次元解析より厚さを測定した。各層数の厚さはそれぞれ 6.3 ± 0.2 、 16.4 ± 1.2 、および $25.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ であり、積層数と厚さは1次式の関係で理論的な厚さと良く一致することが確認された (図5c)。以上の結果より、細胞表面に形成された 6.2 nm のFN-G薄膜は次層の細胞の接着足場として十分に機能することが明らかとなり、マウスL929細胞の4層積層化組織を容易に作成することができた。さらに、ヒト線維芽細胞を用いた10層の積層化組織も構築可能であり、1週間培養後も安定に存在していることが確認された。

この4層積層化組織を1週間培養することで、ピンセットを用いて容易に剥離回収することができた (図6a)。これは、FN-G薄膜を介して細胞が十分に組織化され、積層構造を安定に保っていることを示唆している。剥離した4層組織を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察したところ、1枚のシートを形成し、組織化している様子が確認された。また、SEM観察から見積られた厚さは $23.8 \mu\text{m}$ であり、CLSM観察およびHE染色の結果と一致していた (図6b)。

積層化組織中の細胞の生存率をWST-1法により求めた。各層ごとの生存率を評価することは困難であるため、積層化組織全体の細胞生存率を評価した結果、1週間培養後も細胞生存数に変化はなく、細胞は良好に生存していることが確認された。細胞表面へのFN-G薄膜の形成や積

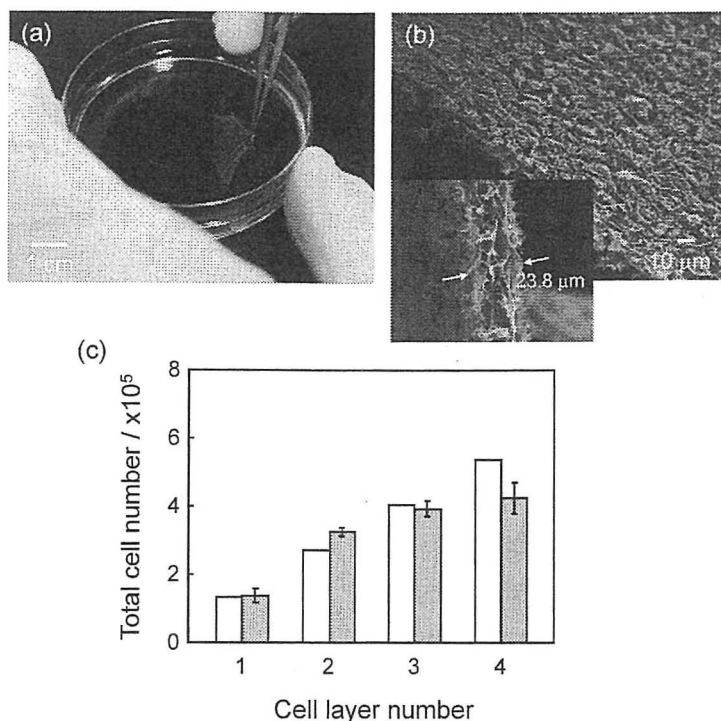


図6 マウスL929細胞の4層組織における1週間培養後の剥離写真(a)および走査型電子顕微鏡写真(b), 各積層組織形成後の理論細胞数(□)と実測細胞数(■)(c)

層化が細胞への栄養成分の供給を阻害することが懸念されたが、細胞表面へ薄膜を形成しても細胞増殖に影響はなく、また、積層化後の細胞数が理論値と良く一致していた(図6c)。詳細は今後検討する必要があるが、細胞表面に形成されたFN-G薄膜が培地中に含まれる栄養成分を透過するため、細胞生存率に影響しなかったと考えている。

1.5 血管モデルの構築

本手法の再生医療分野への応用を目的とし、ヒト初代細胞を用いた血管モデルの積層化組織の構築を検討した。基板にカバーガラスを用い、 $4 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ の細胞密度でヒト臍帯動脈血管平滑筋細胞(UASMC)を播種し、12時間インキュベートすることで接着・伸展させた。その後、基板を0.2mg/mLのFN/トリス緩衝液(50mM, pH=7.4)と0.2mg/mLのG/トリス緩衝液(50mM, pH=7.4)へ7回浸漬することで6.2nmのFN-G薄膜をUASMC表面に形成し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を $6.0 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ の細胞密度で播種し、6時間インキュベートすることで接着・伸展させた。UASMCとHUVECの積層化構造は、蛍光ラベル化による

CLSM観察より評価した。UASMCはセルトラッカーグリーンでHUVECはセルトラッカーオレンジで蛍光ラベル化した。UASMC表面にFN-G薄膜を形成していない場合、2層目のHUVECがUASMC表面に接着できず、UASMCとHUVECが共に基板へ接着した不均一な単層構造を示した。一方、UASMC表面に6.2nmのFN-G薄膜を形成した場合、UASMC表面へHUVECが接着し、2層構造が形成された。以上の結果より、細胞表面へFN-G薄膜をナノレベルで形成することで、株化細胞であるマウスL929線維芽細胞だけでなくヒト初代細胞においても細胞の積層化が可能であることが示唆された。

より血管構造に近い積層化組織を構築する目的で、UASMCの4層構造を作製し、6.2nmのFN-G薄膜をUASMC層の最表面に形成した後、HUVECを接着させた。図7に4層のUASMCと1層のHUVECから構成される5層組織を3日間培養した後のパラフィン切片写真を示した。HE染色写真から5層構造が確認され、HUVECに特異的な第Ⅷ因子の免疫染色写真より、最外層にHUVECが存在している様子が明らかとなった。さらに、Ⅳ型コラーゲンの免疫染色の結果、すべての層においてⅣ型コラーゲンの産生が確認された。4週間培養後もHUVECが最外層に安定に存在しており層間での細胞の移動が見られなかったことから、各層の細胞が基底膜を構築し、お互いに安定に組織化していることが示唆された。

以上より、本手法を用いることでヒト初代細胞の積層化も可能であり、また、異種類の細胞で

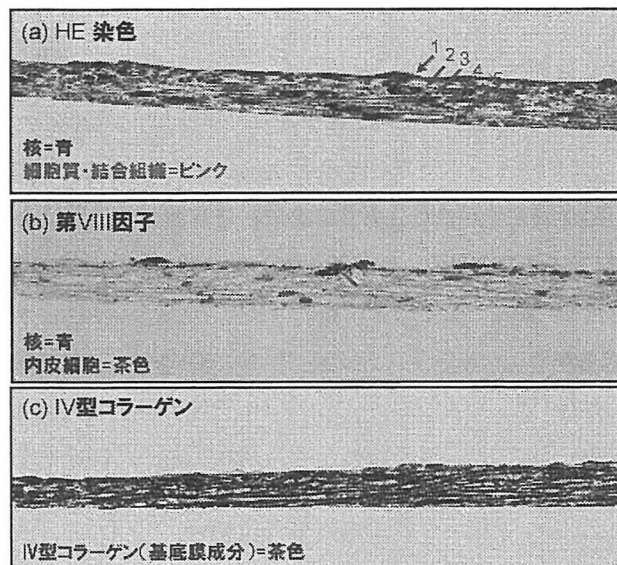


図7 4層のヒト血管平滑筋細胞層と1層のヒト血管内皮細胞による血管モデル組織の3日間培養後のHE染色(a)、第Ⅷ因子の免疫染色(b)、Ⅳ型コラーゲンの免疫染色写真(c) (巻頭カラー参照)

ある平滑筋細胞と血管内皮細胞を積層化することで血管モデルの構築に成功した。本手法は、細胞が接着する表面であればサイズや形状を問わずどこでも積層組織を構築することが可能である。例えば、小口径の人工血管の内壁に患者自身の細胞を用いて血管モデル構造を作製することで、血液適合性に優れた小口径の人工血管が得られ、生細胞で構築された安全性に優れた人工血管として期待される。

1.6 おわりに

交互積層法を用いることで、細胞の表面にナノメートルオーダーの細胞外マトリックス薄膜 (FN-G 薄膜) を形成することができた。また、動物種や細胞の種類を問わず、細胞を1層ずつ積層することが可能であり、複数種類の細胞で構築された積層組織を生体外で容易に構築できることを見出した。本手法は、様々なヒト初代細胞に応用することが可能であるため、血管モデル以外にも結腸組織や肝組織、骨格筋組織、心筋などのモデル組織の作製にも取り組んでいる。また、FN-G 薄膜以外の ECM 成分の薄膜においても膜厚の制御や細胞の積層化が可能であることをすでに見出している。本手法は、細胞と ECM を3次元的に精密に操作できる革新的な細胞操作技術として期待される。

文 献

- 1) R. Langer *et al.*, *Science*, **260**, 920 (1993)
- 2) K. Takahashi *et al.*, *Cell*, **131**, 861 (2007)
- 3) K. Suzuki *et al.*, *FASEB J.*, **18**, 1153 (2004)
- 4) K. Y. Lee *et al.*, *Chem. Rev.*, **101**, 1869 (2001)
- 5) M. P. Lutolf *et al.*, *Nat. Biotech.*, **23**, 47 (2005)
- 6) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **73A**, 485 (2005)
- 7) M. Matsusaki *et al.*, *Biomaterials*, **28**, 2729 (2007)
- 8) K. Prime *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10714 (1993)
- 9) H. Otsuka *et al.*, *Chem. Bio. Chem.*, **6**, 850 (2004)
- 10) J. Nakanishi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16314 (2004)
- 11) N. Matsuda *et al.*, *Adv. Mater.*, **19**, 3089 (2007)
- 12) A. Ito *et al.*, *Tissue Eng.*, **10**, 833 (2004)
- 13) B. C. Isenberg *et al.*, *Materialstoday*, **9**, 54 (2006)
- 14) G. Decher *Science*, **277**, 1232 (1997)
- 15) R. O. Hynes “Fibronectins”, Springer, New York (1990)

- 16) Y. Mao *et al.*, *Matrix Biol.*, **24**, 389 (2005)
- 17) Y. Nakahara *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **18**, 1565 (2007)
- 18) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007)
- 19) 松崎典弥, *化学*, **63** (6), 32 (2008)
- 20) 松崎典弥, *治療*, **90** (4), 1595 (2008)
- 21) G. Krishna *et al.*, *Chem. Commun.*, 2796 (2005)