The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ナノ薄膜を用いた細胞の界面制御によるハイブリッド血管組織の創製
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	高分子. 2011, 60(10), p. 749-750
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50605
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

特集 バイオポリマーインターフェース－生体分子が拓く新たな高分子界面－

ナノ薄膜を用いた細胞の界面制御によるハイブリッド血管組織の創製

3D-Hybrid Artery Models Prepared by Cell Surface Control Using Nanofilms

Abstract: Three-dimensional (3D) analysis of nitric oxide (NO) diffusion in blood vessels in response to drug stimulation was achieved using 3D-artery models including NO sensor particles. This method would be useful as *in vitro* bioassays of tissue responses instead of animal experiments.

Keywords: Artery Models / Biosensors / Nitric Oxide / Layer-by-Layer / Pharmaceutical Assays

1. はじめに

血管は組織や臓器への栄養供給という重要な役割を担っているだけでなく，薬剤送達や血圧調節，癌細胞の転移など，さまざまな生理現象や疾患に関与している。血管は一般的に，血管内皮細胞の単層構造である内膜，複数層の平滑筋（壁）細胞で構成される中膜，線維芽細胞の結合組織からなる外膜，の三成分の層構造で構成される。血管内皮細胞は物理化学的刺激に応答するセンサー表面として働いており，血管の機能においてとくに重要な役割を果たしている。内皮細胞は，血管弛緩性ペプチドホルモンであるブラジキニンを受け取ると一酸化窒素（NO）などのシグナル分子を産出し，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[1]。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。これまでおも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。

筆者らは，望みの細胞を一層ずつ積層できる“細胞積層法”を用い，NO分子に応答するマイクロセンサー粒子を三次元的に配置した“ハイブリッド血管組織”を作製した。人工的に作製したこの血管モデル組織を用いることで，薬物に応答したNO分子の産生と三次元拡散を経時的かつ定量的に解析することに成功した。本手法は，血管以外のさまざまな生体組織モデルとシグナル分子に適用できるため，幅広い応用展開が期待される。

2. 細胞積層法

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，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[2]。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。そこで筆者らは，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”を作ることで，細胞を一層ずつ積み上げる手法である（細胞積層法）[3]。接着タンパク質として知られるフィブロネクチン（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，二層目の細胞を接着することができた。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[4]。一方，FNとGは中性緩衝液中でとも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。FNとGは静電的に反発するが，FNはGと相互作用するドメイン構造を有しているためナノ薄膜が形成される。ナノ薄

松崎典弥 Michiya MATSUSAKI
大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻
[565-0871]吹田市山田丘2-1
助教，博士（工学）．
専門は機能性高分子，バイオマテリアル．
（写真左）

明石 満 Mitsuru AKASHI
同左
教授，工学博士．
専門は高分子化学，機能性高分子．
（写真右）

©2011 The Society of Polymer Science, Japan

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薄膜が最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，各層の細胞の種類が制御されたさまざまな三次元積層構造が構築できるだけでなく，単層と比較して細胞の機能も向上する[5),6)]。

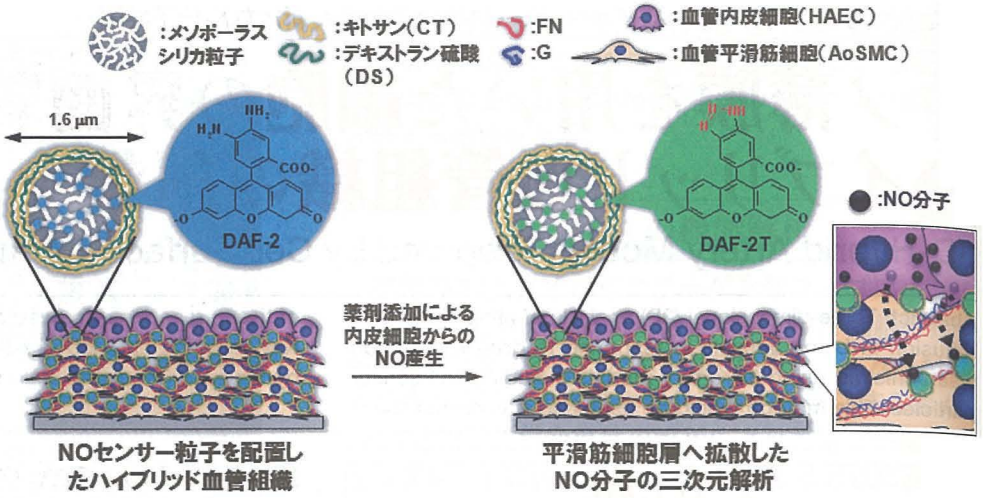

図1　ハイブリッド血管組織によるNO分子の三次元拡散の解析

3. ハイブリッド血管組織の構築

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分子に応答して蛍光を発するマイクロセンサー粒子を作製した[7)]。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 μm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カ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5～500 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五層構造のハイブリッド血管組織を作製した（図1）。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[8)]。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と見積もられた。これまでの動物実験などにより，NO拡散距離はおよそ100 μmと見積もられており[9)]，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[10)]，本研究で見積もられたNO拡散距離は，生体内の血管とほぼ同等であると考えられる。これにより，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ことになる。

4. おわりに

細胞積層法を用いて細胞界面を制御することで，ハイブリッド血管組織の作製に成功した。また，マイクロセンサー粒子を用いることで血管内の各微小領域におけるNO濃度を経時的かつ定量的に評価できた。本血管モデル組織は生体血管に近い薬剤応答を示すため，NO産生以外のほかの薬剤応答評価への応用が可能である。さらに，細胞積層法を用いてほかの組織モデルを構築し，pHやカルシウムイオンを検知するさまざまなセンサー粒子を組み合わせることで，本稿の成果を医療・創薬分野における幅広い対象に応用展開することが可能である。

謝　辞

本研究の一部は，科学技術振興機構さきがけ，平成18年度NEDO産業技術研究助成事業（06B44017a），野口遵研究助成金（NJ200910）の支援を受け実施された。

文　献

1) W. K. Alderton, C. E. Cooper, and R. G. Knowles, *Biochem. J.*, **357**, 593 (2001)
2) K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **266**, 12809 (1991)
3) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara, and M. Akashi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007)
4) K. Kadowaki, M. Matsusaki, and M. Akashi, *Langmuir*, **26**, 5670 (2010)
5) K. Kadowaki, M. Matsusaki, and M. Akashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 153 (2010)
6) M. Matsusaki, K. Kadowaki, E. Adachi, T. Sakura, U. Yokoyama, Y. Ishikawa, and M. Akashi, *J. Biomater. A: Sci. Polymer Edn.*, in press
7) S. Amemori, M. Matsusaki, and M. Akashi, *Chem. Lett.*, **39**, 42 (2010)
8) M. Matsusaki, S. Amemori, K. Kadowaki, and M. Akashi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 7557 (2011)
9) T. Malinsk and Z. Taha, *Nature*, **358**, 676 (1992)
10) T. Malinsk, Z. Taha, and S. Grunfeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 1076 (1993)

©2011 The Society of Polymer Science, Japan