

Title	細胞表面への細胞外マトリックス薄膜の形成による細胞積層化組織の構築
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満
Citation	バイオインダストリー. 2007, 24(12), p. 77-85
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50610
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

細胞表面への細胞外マトリックス薄膜の形成による 細胞積層化組織の構築

Fabrication of Cellular Multilayers with Extracellular Matrix Thin Films on Cell Surface

松崎典弥*¹ 明石 満*²

細胞表面へフィブロネクチン-ゼラチン薄膜を形成し、次層の細胞接着の足場を提供することで、生体外で積層化組織を構築することが可能であった。この手法を応用することで、ヒトの血管壁と同じ構造の積層化組織の構築にも成功した。本手法は、新しい再生医療技術として期待される。

1. はじめに

生体組織は、コラーゲン・プロテオグリカンなどのタンパク質・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¹⁾。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。このような細胞と ECM で構成される積層化組織を生体外で構築できれば、再生医療分野において有用であると期待される。

これまで、細胞とスキャットホルドの複合材料が活発に研究されてきたが^{2~5)}、三次元的な細胞の分布や配向を制御し、血管壁に見られるような細胞と ECM による階層構造の構築は困難であった。近年、東京女子医大の岡野らによる細胞シート法⁶⁾ や磁性リポソーム⁷⁾、キトサン薄膜形成⁸⁾ による細胞の積層化が報告されているが、複雑な操作や機器が必要であり、また ECM 層の種類や厚さの制御には至っていない。

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)^{9,10)} に着目した (図 1)。第一層目の細胞表面に ECM 成分で構成されるナノ薄膜 (ナノ ECM) を形成できれば、第二層目の細胞が接着する足場を提供し、第二層目の細胞が第一層目の細胞表面へ接着すると考えられる。細胞表面へのナノ薄膜形成と細胞接着を繰り返すことで、望みの細胞と ECM の組み合わせによる積層化組織が構築できると期待される。Rajagopalan らは、キトサンと DNA による静電相互作用を駆動力とした薄膜を肝細胞表面へ形成

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

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

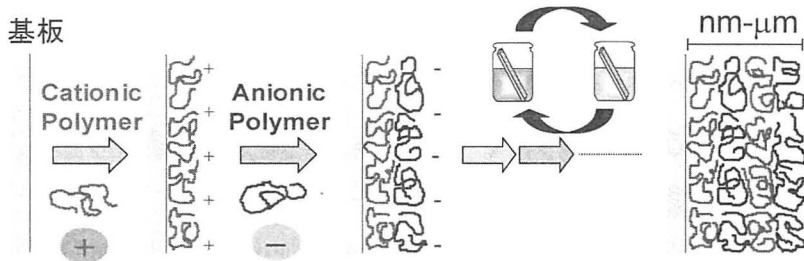


図1 交互積層法

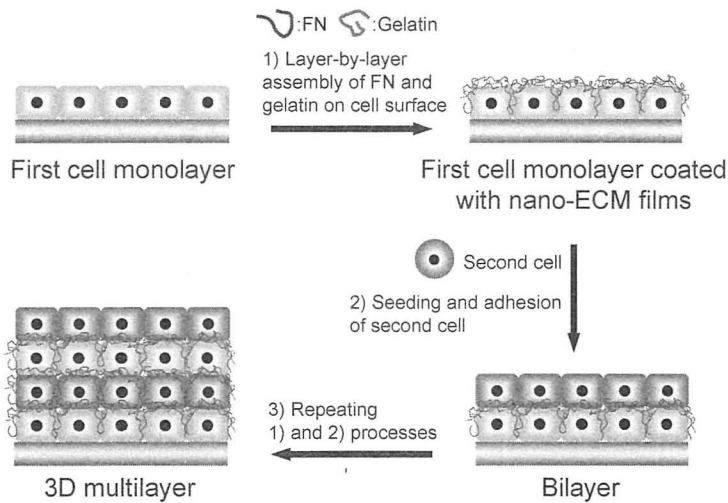


図2 細胞表面への細胞外マトリックス薄膜形成と細胞の積層化イメージ

することで2層構造が形成されることを報告している¹¹⁾。しかしながら、キトサンは細胞培養に必要な培地や中性バッファーへ溶解せず、また、カチオン性特有の細胞毒性が知られており^{12,13)}、ナノECMには適していない。そこで筆者らは、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ことが知られている^{14,15)}。また、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)、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⁾。

最近筆者らは、FNとゼラチン、ヘパリン、エラスチンなど、FNをベースとした交互積層膜が形成できることを見出した¹⁷⁾。FNとゼラチンは

生理条件下でどちらもアニオン性であるが、FNのコラーゲン結合ドメインを介して相互作用する。そこで、第一層目の細胞表面にFNとゼラチン(G)の薄膜が形成できれば、ECMと同じ成分のナノECMを細胞表面に形成可能となり、第二層目の接着足場を提供し、細胞とECMによる積層化組織が構築できると期待される(図2)。筆者らは、積層化組織の構築に必要なFN-G薄膜の膜厚を明らかにし、ヒト血管平滑筋細胞と血管内皮細胞による血管壁類似組織の構築に成功した¹⁸⁾。

2. フィブロネクチン-ゼラチン薄膜の形成

FN-G薄膜の形成は、水晶発振子マイクロバランズ(QCM)を用いて評価した。QCMの金基板を0.2 mg/mLのFN/トリス緩衝液(50 mM, pH = 7.4)に37℃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、0.2 mg/mL のゼラチン/トリス緩衝液 (50 mM, 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 とゼラチンの溶液に交互に QCM 基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 12.5 nm 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¹⁰⁾。FN とゼラチンは、中性条件下で共にアニオン性を有しているにも関わらず、薄膜を形成す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も形成できることも見出した¹⁷⁾。形成した FN-G 薄膜は 10% のウシ胎仔血清 (FBS) を含む Eagle's 培地中でも安定であり、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などが起こらず安定に存在することが示唆された。FN とゼラチンが 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¹⁹⁾ 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 とゼラチン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 3)。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, 21.1 nm の FN-G 薄膜が形成されることが明らかとなった。

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) を使い、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 °C で 15 分間浸漬した後、50 mM 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 のゼラチン/トリス緩衝液 (50 mM, pH=7.4) に 37 °C 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 6.2 nm 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胞の蛍光像 (図 4 a) と Rh-FN-G 薄膜の蛍光像 (図 4 b)、これらの重ね合わせ画像 (図 4 c) の表面および断面イメージを図 4 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

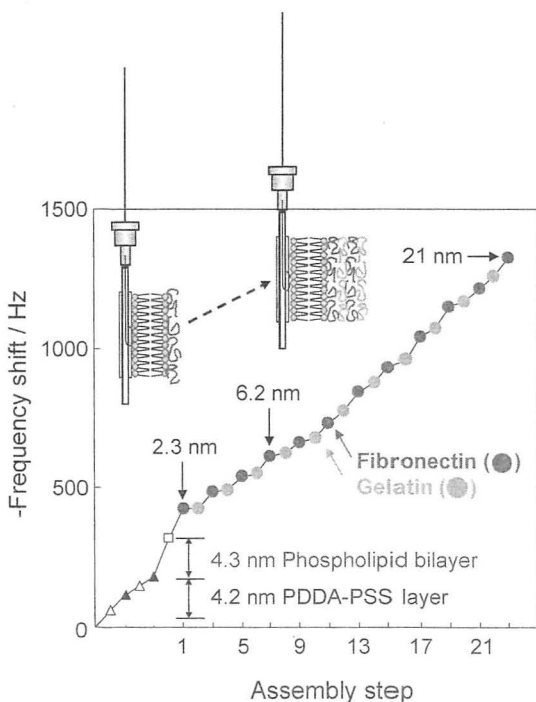


図 3 リン脂質二分子膜上への FN-G 薄膜形成による QCM の振動数変化

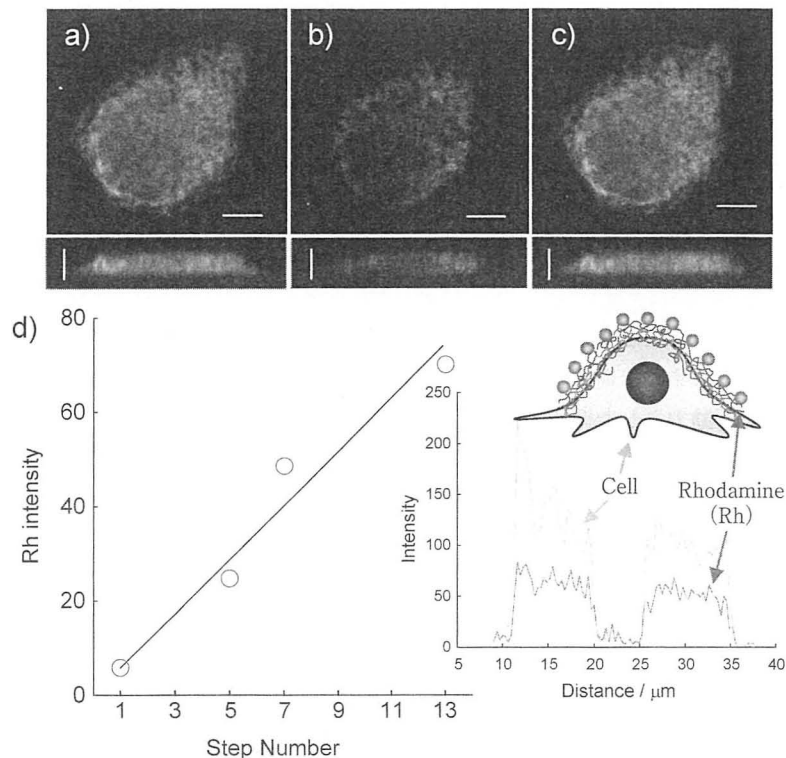


図4 蛍光ラベル化 L929 細胞(a)と細胞表面へ形成したローダミンラベル化 FN (Rh-FN)-G 薄膜(b)の共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による表面および断面イメージ

(a)と(b)の重ね画像(c)。水平および垂直のスケールバーはそれぞれ5, 6.6 μm 。薄膜形成のステップ数と Rh-FN の蛍光強度の関係(d)。蛍光画像のラインスキャンによる細胞と薄膜の蛍光強度分布。

り細胞表面へ Rh-FN-G 薄膜を形成可能であることが示唆された。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 4d 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 4d 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、積層ス

テップ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。

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 とゼラチンの溶液に交互に浸漬し、7 回繰り返すことでおよそ 6.2 nm の FN-G 薄膜を細胞表面に形成した。第二層目の細胞としてセルトラッカーグリーンで蛍光ラベル化した L929 細胞を同

じ細胞密度で播種し、6時間インキュベート後の様子を位相差および蛍光顕微鏡で観察した(図5)。第一層目の細胞表面に6.2 nmのFN-G薄膜(7ステップ)を形成した場合、第一層目の細胞表面に第二層目の細胞が接着している様子が位相差および蛍光顕微鏡より確認された。また、DAPIによる核染色の蛍光顕微鏡観察において核の重なりが観察されたことから、細胞の積層化が可能であることが明らかとなった。

一方、FN-G薄膜非存在下では第二層目の細胞が第一層目の細胞の隙間から基板に接着し、細胞が緻密にパッキングしている様子が観察された。また、核の重なりも観察されず、細胞が積層化されないことが確認された。第一層目の細胞表面に2.3 nmのFNのみの薄膜を形成した場合、同様に細胞の積層化は観察されなかった。

以上の結果より、第二層目の細胞の接着足場には、少なくとも6 nm以上のFN-G薄膜が必要であることが明らかとなった。細胞の積層化に対するECM層の膜厚の効果を明らかにしたのは本研究が初めてである。筆者らは、細胞の積層化に必要なECM成分としてFNだけでは不十分であり、天然のECMに見られるようなコラーゲンや

プロテオグリカンとFNの複合化、および膜厚の制御が重要であると考えている。

4. 細胞の三次元積層化

第一層目の細胞表面に6.2 nmのFN-G薄膜を形成することで第二層目の細胞が接着することが明らかになったため、本手法を用いて細胞の三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。上記手法より第一層目の細胞表面に6.2 nmのFN-G薄膜を形成し、第二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とゼラチンの溶液に交互に浸漬することで第二層目の細胞表面に薄膜を形成し、第三層目の細胞を接着・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。

図6aに、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層積層化後のCLSMによる表面および断面観察の三次元イメージを示した。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4a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

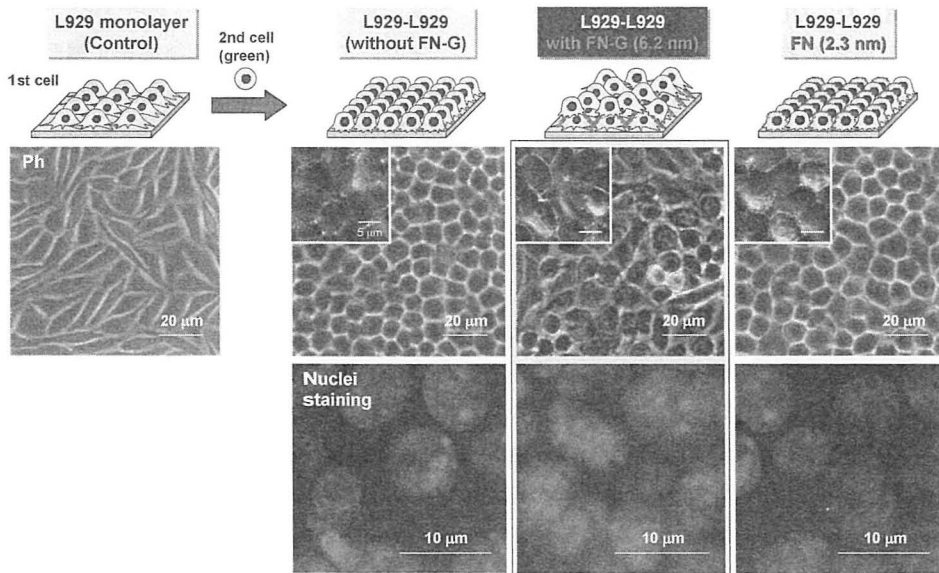


図5 FN-G薄膜存在・非存在下でのL929細胞表面への蛍光ラベル化L929細胞接着の評価

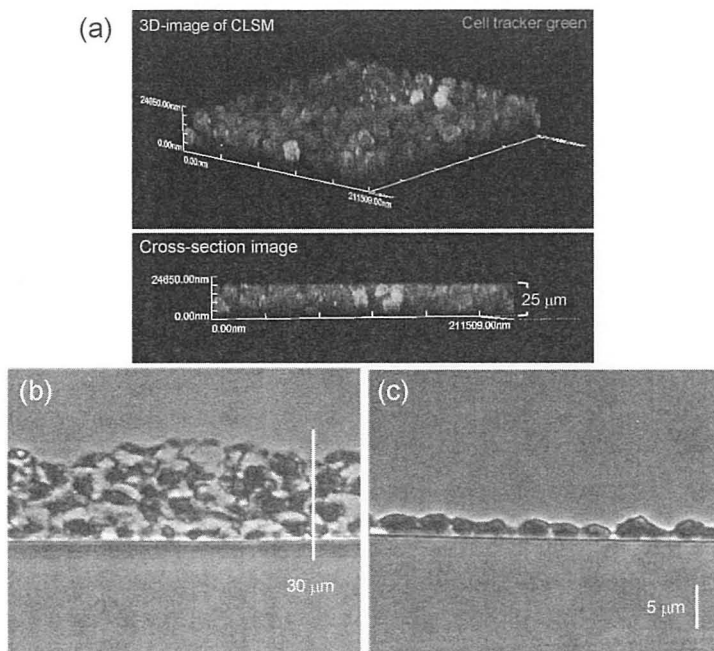


図6 4層積層化した蛍光ラベル化 L929 細胞の CLSM 表面および断面イメージ(a), ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による 4 層(b)および 1 層(c)構造の切片写真

とから L929 細胞の 4 層構造が明らかとなった。また、4 層積層化組織の切片を作製し、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 6b) 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確認されたことから、4 層の積層化構造が明らかとなった。厚さはおよそ $24 \mu\text{m}$ で、CLSM の三次元イメージ (図 6a) 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 6c)。また、L929 細胞の積層数と厚さの関係を知るため、1, 3, 4 層の積層構造を作成し、CLSM の三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、積層数と厚さは一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。

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可能であった。

また、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可能であった (写真 1a)。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 層積層化組織の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察の結果を写真 1b に示した。各層の細胞が組織化され、一枚のシートを形成している様子が確認された。また、SEM 観察から見積られ厚さは $23.8 \mu\text{m}$ であり、CLSM 観察および HE 染色の結果と一致していた。

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

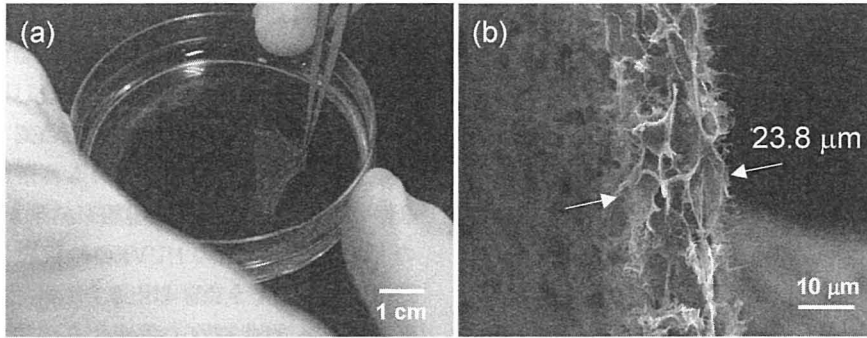


写真1 4層積層化組織の剥離写真(a)と剥離組織の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察写真(b)

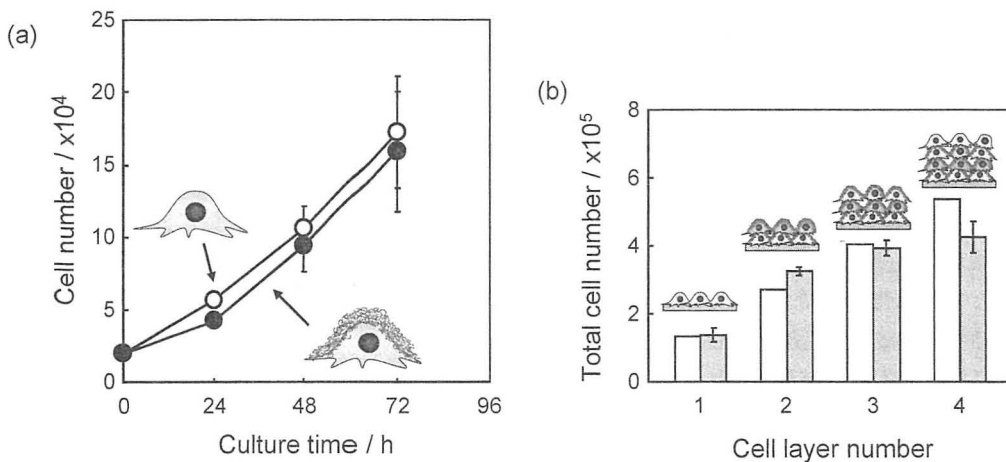


図7 細胞表面へ6.2nmのFN-G薄膜存在(●), 非存在下(○)での細胞増殖曲線(a)と, 各積層組織形成後の理論細胞数(□)と実測細胞数(▣)(b)

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(図7a)、また、積層化後の細胞数が理論値と良く一致していた(図7b)。Galeskaらは、フミン酸と Fe^{3+} イオンの交互積層膜のグルコース透過性と膜厚の関係を研究しており²⁰⁾、20層以下であればグルコース透過性が高いことを報告している。また、Sukhorukovらは、ポリスチレンスルホン酸とポリアリルアミン塩酸塩の交互積層膜が分子量2,000以下の物質を透過することを報告している^{21,22)}。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。

5. 血管壁類似組織の構築

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壁類似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、 4×10^4 cell/cm²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0.2 mg/mLのFN/トリス緩衝液(50 mM, pH=7.4)と0.2 mg/mLのゼラチン/トリス緩衝液(50 mM, pH=7.4)へ7回浸漬することで6.2 nm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 6.0×10^4 cell/cm² 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の積層化構造は各細胞を蛍光ラベル化し、CLSM観察より確認した。また、4層のUASMCと1層のHUVECから構成される5層の血管壁類似組織の構築を試みた。

写真2にCLSMによる断面観察の三次元イメージを示した。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(写真2a)。一方、UASMC表面に6.2nmのFN-G薄膜を形成するとUASMC表面へHUVECが接着し、2層構造の形成が確認された(写真2b)。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、4層のUASMCと単層のHUVECから構成

される5層組織を作製した。写真2cに単層のUASMCを、写真2dに5層構造の組織切片写真を示した。単層のUASMCと比較して積層化構造の形成が明確に確認され、HUVECがUASMCの最表面に接着・伸展している様子が明らかとなった。また、蛍光顕微鏡観察結果からも、4層のUASMCと1層のHUVECの積層化構造を確認することができた。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、異種細胞で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壁類似の積層化組織の構築に成功した。

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化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壁類似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ると期待される。

6. おわりに

FNとゼラチンから構成される細胞外マトリクス薄膜を細胞膜表面に形成可能であり、交互積層回数により膜厚をナノレベルで制御することが

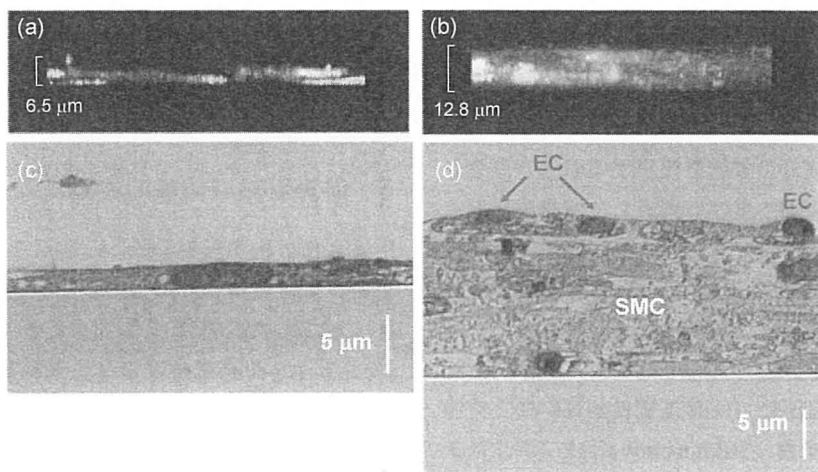


写真2 FN-G薄膜非存在(a)・存在下(b)でのヒト血管平滑筋細胞(SMC:緑)とヒト血管内皮細胞(EC:赤)による積層化構造のCLSM断面蛍光イメージ、および単層の平滑筋細胞(c)とFN-G薄膜形成により構築された血管壁類似の5層組織(4層SMC+1層EC:d)の位相差顕微鏡写真

できた。また、細胞表面に形成されたおよそ6 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し、マウス線維芽細胞だけでなくヒト初代細胞による血管壁類似積層化組織の構築に成功した。積層化組織はFN-G 薄膜を介して十分に組織化され、容易に剥離回収できることが明らかとなった。

本手法は、積層化させる細胞とナノECMの種類を自在に変えることができるため、望みの積層化組織を積層数とECMを制御して構築することが可能であり、新しい再生医療技術として応用が期待される。

文 献

- 1) B. C. Isenberg *et al.*, *Materialstoday*, **9**, 54 (2006)
- 2) K. Y. Lee *et al.*, *Chem. Rev.*, **101**, 1869 (2001)
- 3) M. P. Lutolf *et al.*, *Nat. Biotech.*, **23**, 47 (2005)
- 4) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **73A**, 485 (2005)
- 5) M. Matsusaki *et al.*, *Biomacromolecules*, **6**, 3351 (2005)
- 6) J. Yang *et al.*, *Biomaterials*, **26**, 6415 (2005)
- 7) A. Ito *et al.*, *Tissue Eng.*, **10**, 833 (2004)
- 8) C. C. Co *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1598 (2005)
- 9) G. Decher, *Science*, **277**, 1232 (1997)
- 10) Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications, Vol.1 (Eds. : S. Tripathy, J. Kumar, H. S. Nalwa), American Scientific Publications, Los Angeles (2002)
- 11) P. Rajagopalan *et al.*, *Tissue Eng.*, **12**, 1553 (2006)
- 12) D. Fischer *et al.*, *Biomaterials*, **24**, 1121 (2003)
- 13) M. Chanana *et al.*, *Nano Lett.*, **5**, 2605 (2005)
- 14) K. M. Yamada, *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 761 (1983)
- 15) R. O. Hynes, *Fibronectins*, Springer, New York (1990)
- 16) E. Ruoslahti *et al.*, *Science*, **238**, 491 (1987)
- 17) Y. Nakahara *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, in press
- 18) M. Matsusaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007)
- 19) G. Krishna *et al.*, *Chem. Commun.*, 2796 (2005)
- 20) I. Galeska *et al.*, *Biomacromolecules*, **2**, 1249 (2001)
- 21) G. B. Sukhorukov *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 6434 (1998)
- 22) G. B. Sukhorukov *et al.*, *Microencapsulation*, **17**, 177 (2000)

