

## 生物工学を支える材料の基礎研究と その細胞培養への応用

川瀬 雅也



### Development of High Performance Biomaterials and Their Application to Animal Cell Culture

MASAYA KAWASE (*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871*) *Seibutsu-kogaku* **84**: 55-60, 2006.

To develop a high-function animal cell culture substratum, a dendrimer-modified substratum was examined in hepatocyte culture. By immobilizing fructose-modified dendrimers on a polystyrene culture plate (fructose-dendrimer), it proved possible to maintain the number of initially adhered hepatocytes and the urea synthesis activity. It was also found that hepatocytes formed spheroids when cultured on fructose-dendrimer. However, the adhesion was not sufficiently strong and the spheroids detached easily into the culture medium. Galactose, which is a ligand for the asialoglycoprotein receptor on the hepatocyte cytoplasmic membrane, was chosen as another ligand for modification in order to maintain adhesion of spheroids for long periods. Simultaneous modification of dendrimers with fructose and galactose had a marked effect on spheroid adhesion. Suppression of apoptosis and necrosis was observed in hepatocyte spheroids cultured on a dendrimer modified with fructose and galactose (F/G dendrimer). Moreover, the hepatocyte spheroids cultured on the F/G dendrimer had higher activity in liver-specific functions, such as urea synthesis and albumin gene expression, than those cultured on single ligand-modified dendrimers. Immobilization on mixed-ligand-modified dendrimers was thus able to generate a suitable surface for hepatocyte spheroid formation. These dendrimers could serve as a powerful tool for generating custom-made scaffolds for cells other than hepatocytes if suitable ligands were selected for each cell type. This surface-modification technology promises to contribute to the development of tissue engineering.

[**Key words**: dendrimer, culture substratum, surface modification, ligand]

#### はじめに

生物工学における材料とは、いったいどのような位置にあるのかを考えてみると、最初に注目されたきっかけは固定化酵素（あるいは、固定化微生物）の研究においてではないかと思われる<sup>1,2)</sup>。当時は、酵素あるいは微生物を固定化し、効率よく反応を進めるための材料を探索する研究が行われていた。その後、分子生物学的手法の発展に伴い、生物工学の分野での材料研究は影が薄くなってきたわけであるが、近年の組織工学・再生工学の

隆盛に伴い、生物工学でも材料（生体材料）が見直されつつある。筆者は、生物工学を支える基礎的な技術分野が、図1に示すように分子生物学・生化学と生物化学工学に加え生体材料であると考え、研究を行ってきた。

本論文では、筆者が行ってきた生体材料の開発を目指した細胞培養基材（特に動物細胞培養用基材）の研究を紹介したい。

#### 細胞機能の制御

大半の動物細胞は、何かに接着していないと生きてい

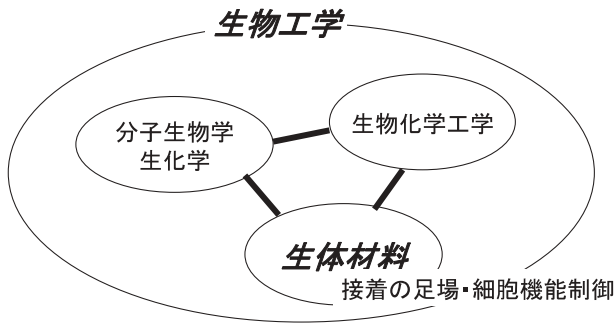


図1. 生物工学を支える基礎分野

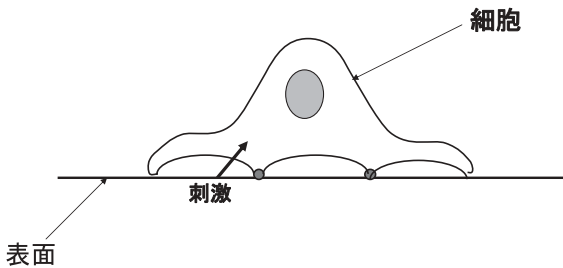


図2. 動物細胞の接着様式

けないという性質を持っており、培養時の培養基材の役割が非常に大きな細胞である。図2に示すように、動物細胞は培養基材に、細胞の底面の一部を接着させており、この接着点と培養基材の親和性が重要となってくる。言い換えれば、表面のごく薄い層の物性さえ細胞との親和性の高いものにしてやればよいということになり、筆者はこの考え方をもとに肝細胞を例に取り、表面物性の制御方法の検討を行った。

まず、どのような表面が肝細胞培養に適しているのか

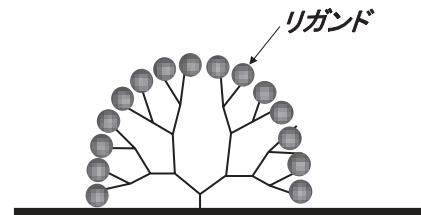


図3. 表面に固定された dendrimer の構造

を知るために、ガラス表面に種々の修飾を施して検討を行ったところ、量子化学的解析から、表面の化学構造の持つ絶対ハードネスと双極子能率の二つのパラメータがある範囲の値を持つ必要があることが判明した<sup>3,4)</sup>。この知見を基礎として、さらに検討を進めた。最終的に、上記条件を満足した構造が高密度に基材表面に提示される必要があるとの結論を得た。

このような検討から、基材表面修飾剤候補として採用したのが、図3に示す多分岐樹木状高分子（dendrimer）である。Dendrimerとは、ある1点より規則正しく分岐した樹木上構造をとる高分子物質であり、現在、薬物キャリアー・触媒・遺伝子導入剤・エネルギー捕集剤・イメージング試薬などさまざまな分野に利用されているナノ球体である<sup>5)</sup>。Dendrimerは、図3の構造より分かるように、分岐を増やすごとに末端基を指数関数的に増大できる特性を持っている。この末端基を生理活性物質で修飾することで、高密度の生理活性物質の固定も可能となる。筆者の研究では、このDendrimer球体を半分に切った形で培養基材上に並べて、培養基材の表面特性制御を行っている。

筆者は、最初に材料表面へのDendrimerの固定法に

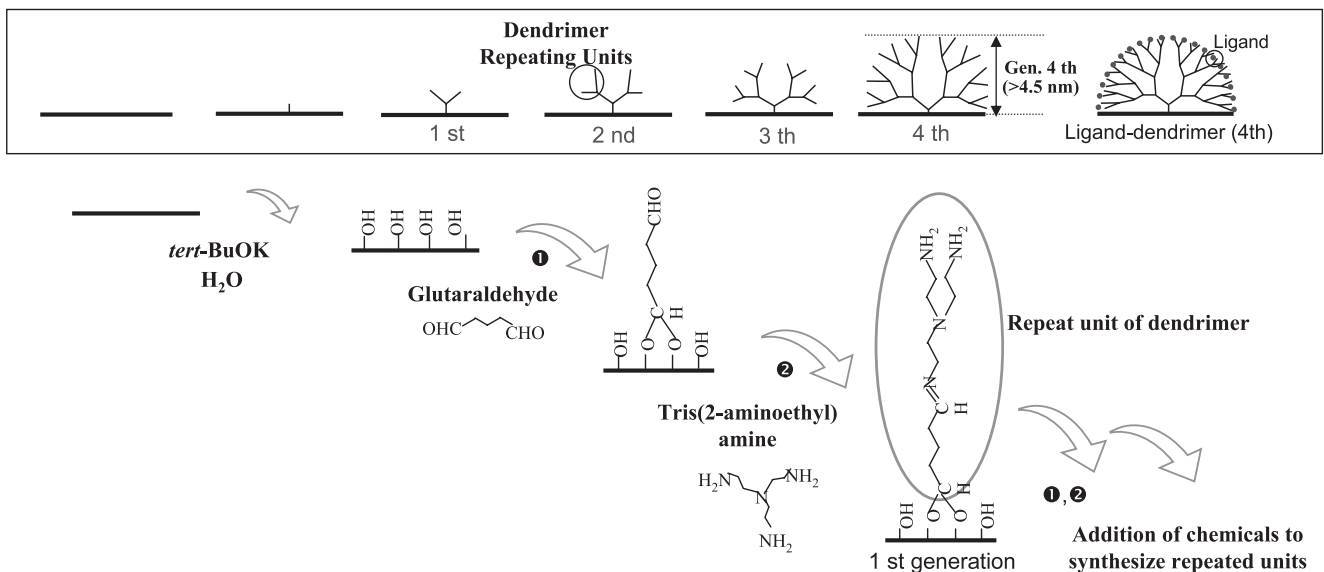


図4. Dendrimerによる表面修飾法

## ● デンドリマー表示面

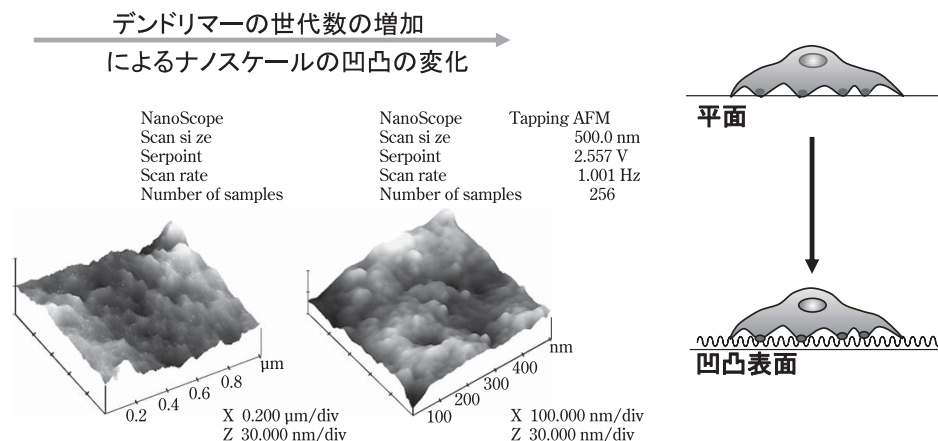


図5. AFMによるデンドリマー修飾表面と細胞接着

関して検討を行った<sup>6,7)</sup>. デンドリマーを固定する材料として、細胞培養に用いられる一般的な素材であるポリスチレンを選択した. ポリスチレンは、その表面に活性点がなく、修飾を行う際には、まず活性点を作る必要があった. そこで、光活性化剤を用いて活性点を作り、そこにデンドリマーを組み上げていく方法をとった<sup>6)</sup>. 筆者の研究における表面修飾法は誰でも簡単に行うことができ、かつ工業化を前提として自動化できる手法であることを目指しており、その意味からも組み上げ法をとる必要があった. しかし、光活性化剤を用いる手法は遮光などの操作が必要な上にコストがかかり、効率が悪いため改良を行う必要が生じ、最終的には図4に示すようなラジカル発生剤を用いる手法に落ち着いた<sup>7)</sup>. この手法は遮光などの操作は一切不要で、所定の濃度の試薬を所定の時間添加し、その後洗浄する過程の繰り返しでデンドリマーを固定できる手法であり、十分に工業化できる手法である.

先のガラスを用いた検討から、フルクトースがリガンドの候補としてあがっており、まずフルクトースを末端に固定したデンドリマー（フルクトースデンドリマー）により修飾された表面について評価を行った.

デンドリマーで修飾した表面がどのような形態かをAFM（原子間力顕微鏡）で観察してみると、図5（左）のように凹凸がある表面形態となり、図5（右）のように、平らな面よりも細胞底面との接触機会が増加することが期待されるものであった.

デンドリマーでは、分岐点の層を世代と表現し、1世代増加するごとに末端基が倍になる. そこで、世代数の肝細胞培養に対する影響をまず調べた. 肝細胞は、培養時間依存的にアポトーシスにより生着細胞数を減少させていく. フルクトースデンドリマー修飾表面では、世代

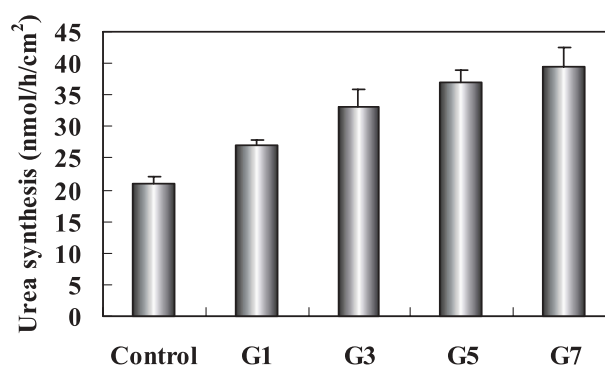


図6. 世代数の尿素合成能に及ぼす影響. 肝細胞の培養時間は24時間.

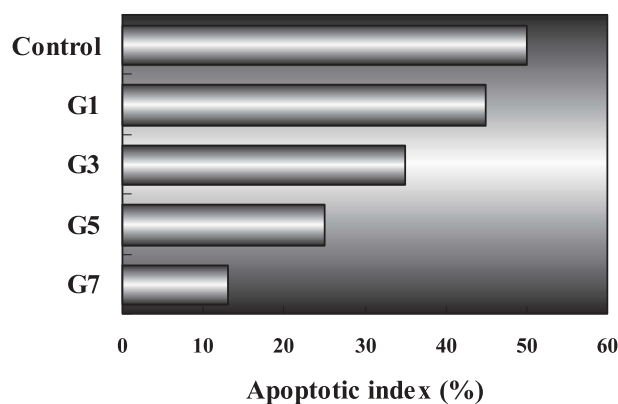


図7. 世代数のアポトーシスに及ぼす影響. 肝細胞の培養時間は24時間.

数依存的に生着細胞数が維持されることが分かった. また細胞機能について見ると、図6に示すように世代数依存的に、肝細胞の重要機能の一つである尿素合成能を高く維持できることが分かった. 尿素合成能の維持は、細胞機能が向上したということではなく、上述のように生着細胞数が維持されたためと考えるべきである. では、

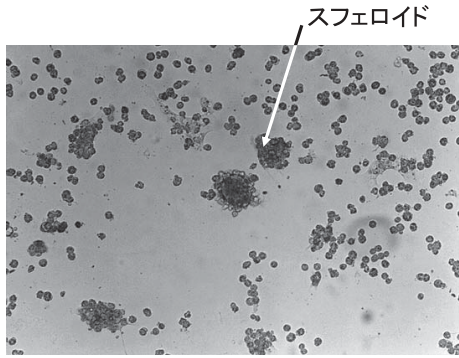


図8. フルクトースデンドリマー上での肝細胞の形態. 肝細胞の培養時間は24時間.

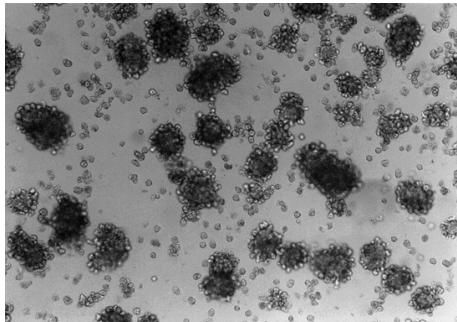


図9. F/Gデンドリマー上での肝細胞の形態. 肝細胞の培養時間は24時間.

生着細胞数維持の原因は何かと検討を進めたところ、図7に示すように、生着細胞数減少の最大の原因の一つであるアポトーシスが世代数依存的に抑制されたためであることが分かった. このアポトーシス抑制のメカニズムについては、まだ分かっていないので、今後検討を進めていきたい.

フルクトースデンドリマー修飾表面上で、肝ガン細胞を培養した場合、肝ガン細胞の増殖の抑制と肝機能の向

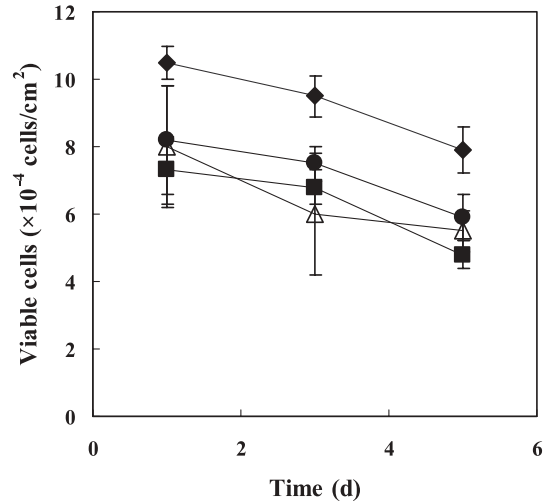


図10. デンドリマーのリガンドの生着細胞数に及ぼす影響. ■, コントロール: 未修飾表面での培養; △, フルクトースデンドリマー修飾表面; ●, ガラクトースデンドリマー修飾表面; ◆, F/Gデンドリマー修飾表面.

上が見いだされた<sup>8)</sup>. また、リガンドをフルクトースから細胞接着性のあるトリペプチド (Gly-His-Lys) に代えたところ、このリガンドも肝ガン細胞の肝機能を向上させることが分かった<sup>9)</sup>. 他のリガンドも試してみたが、このような効果は見られなかった. デンドリマーの特徴として、リガンドの変更が非常に容易であり、このような研究が簡単に行えたわけである.

### 細胞形態の制御<sup>7)</sup>

フルクトースデンドリマー修飾表面においては、おもしろい現象が観察されている. 図8に示すように、特別な操作を何もしなくても肝細胞が集まり、スフェロイドと呼ばれる細胞凝集塊を形成したのである. スフェロイドは、より肝臓に近い形態といわれており、細胞の肝機

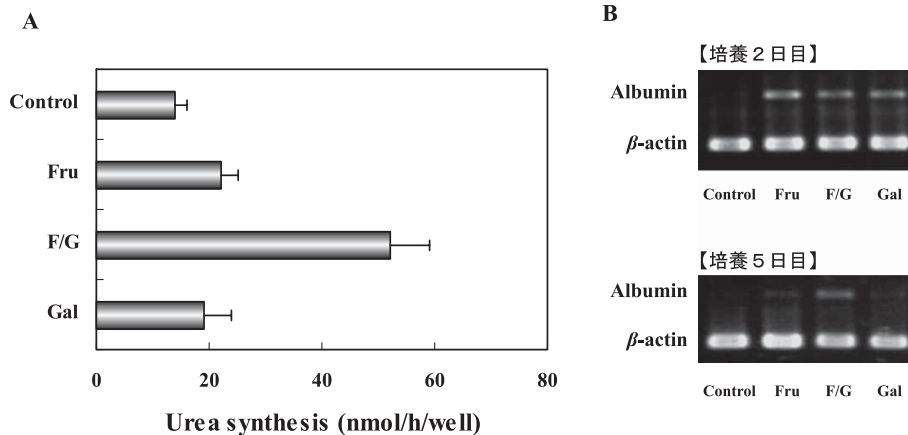


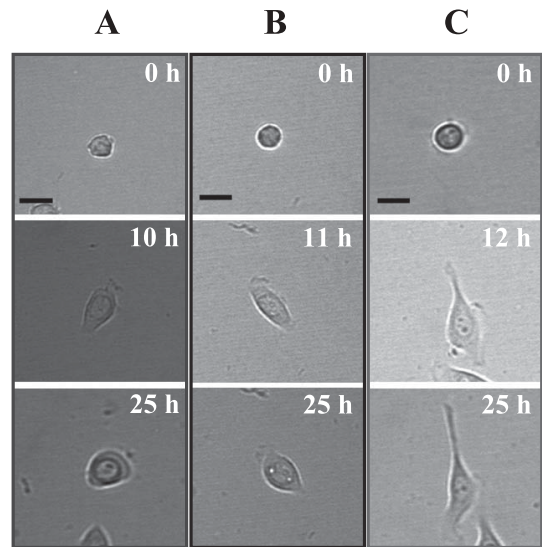
図11. デンドリマーのリガンドの細胞機能に及ぼす影響. (A) 尿素合成能, (B) アルブミン合成能. Control, コントロール: 未修飾表面での培養; Fru, フルクトースデンドリマー修飾表面; Gal, ガラクトースデンドリマー修飾表面; F/G, F/Gデンドリマー修飾表面.

能が高いため人工肝臓などへの利用面から注目されている細胞形態である。このスフェロイドを作るために、いろいろな工夫がなされている。フルクトースデンドリマーを使うことで、非常に簡単にスフェロイド形成がなされることから、デンドリマー表面のもう一つの機能が判明した。ただ、フルクトースデンドリマー表面へのスフェロイドの接着性が非常に弱いことも事実であり、振動などで簡単に剥離してしまうという弱点もあった。この弱点を補うため、肝細胞上のアジアロ糖タンパク質レセプターのリガンドであるガラクトースもデンドリマーのリガンドとして用いることにした。デンドリマーの末端には、数種のリガンドを容易に任意の比で固定できるという利点があり、今回もこの特性を利用したわけである。フルクトースとガラクトースの比を1:1として用いる（フルクトース-ガラクトース共固定デンドリマー；F/Gデンドリマー）と、図9に示すように、多数のスフェロイドが安定に接着する表面を作り出すことができた。

次に、生着細胞数について調べてみると、図10に示すように、F/Gデンドリマー表面は他の表面に比べて多くの細胞が生着していることが分かった。また、肝機能についてみても図11(A)のように、高い尿素合成能がF/Gデンドリマー表面上で保持されていた。F/Gデンドリマー表面において、スフェロイドが安定に保持されているため上記の結果が得られたと考えられる。また、スフェロイドになると細胞の機能が長期に維持されるとされており、この点についても検討を加えた。図11(B)にあるように、5日間の培養において、他の表面上の肝細胞が、その機能の一つである血漿タンパク質（今回はアルブミンについて調べている）合成能を失うのに対して、F/Gデンドリマー表面では、RT-PCRによる分析の結果、5日間の培養でも、この機能が失われなかった。このことは、培養肝細胞の利用面からも有益なことであり、デンドリマー表面の有用性が発揮された結果となった。

### 細胞の形態制御<sup>10)</sup>

細胞機能は細胞の形態によっても左右されることが知られており、細胞の形態を制御できれば細胞の取り扱いに非常に有利になる。先にも述べたが、デンドリマー修飾表面の特徴として、表面に凹凸を容易に作ることができる。デンドリマーにより、表面に凹凸をつけることで、その上で培養されている上皮細胞の形態がフラットな培養基材表面での培養形態と異なることが観察された。そこで、より積極的にこの現象を利用するために、グルコースをリガンドとしたグルコースデンドリマーを用いて上皮細胞の形態に対するデンドリマーの効果を検討した。



バー: 30 nm

図12. リガンドの細胞形態に及ぼす影響. (A) リガンドなし, (B) L-グルコース, (C) D-グルコース.

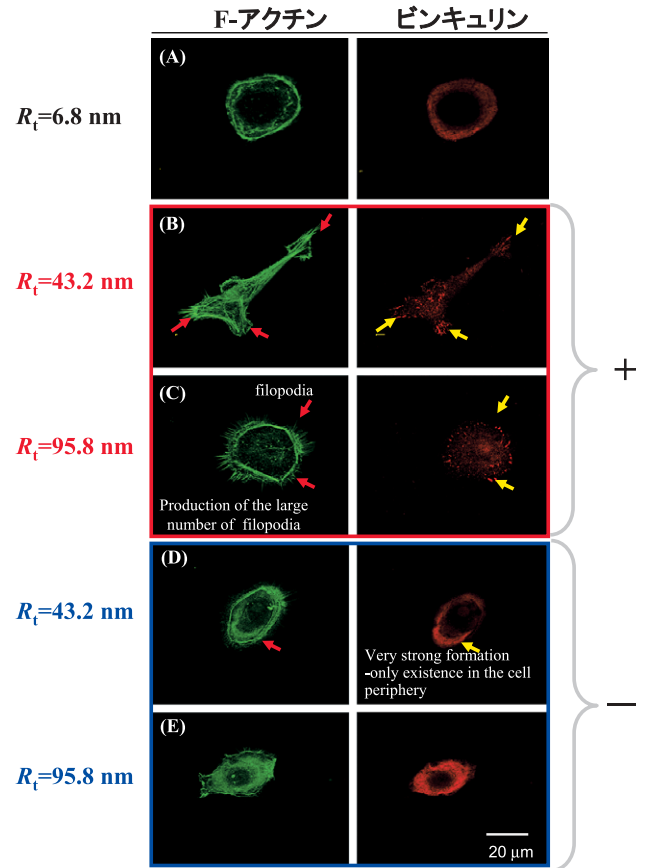


図13. リガンドの細胞骨格形成に及ぼす影響.  $R_t$ は凹凸の深さ, +, リガンドの結合したデンドリマーで修飾した表面; -, リガンドの結合していないデンドリマーで修飾した表面.

図12に示すように、グルコーストランスポーターのリガンドであるD-グルコースをリガンドとした場合(C),

細胞は丸まらず進展した状態を維持していたが、リガンドとはならないL-グルコースを用いた場合(B)はデンドリマー修飾のない表面(A)と同じく、細胞は丸まった。また、この状態で細胞骨格について調べてみたところ、図13のように、D-グルコースリガンドの場合において、F-actinが発達し、vinculinの局在化が見られた(B)。ただし、凹凸が大きくなれば、この効果が見られなくなった(B,C)。よって、デンドリマーによる凹凸が、図2に示したような細胞底面の形態にフィットして、ちょうどいい形でグルコーストランスポーターに作用し、細胞を固定したと考えられる。凹凸が大きくなると、グルコーストランスポーターへの作用が不十分となり、固定がうまくできなくなったことが、図13で見られた現象のメカニズムであると考えている。

### まとめ

デンドリマー表面を用いて、細胞の機能や形態を制御できることを示したが、まだメカニズムや広汎な応用の道筋をつけるには至っていない。今後は、これら未解決の問題の解決を図ることを当面の目標としていく考えでいる。

さらに、デンドリマーは今注目されているナノスケールの分子であり、未知の機能がまだ存在していると考えている。この機能を見いだして、本論文で紹介した以上の成果を挙げて、生物学における材料研究の発展、さらには生物学の発展に寄与していきたい。

本研究は、筆者が香川大学・教育学部に在職中に始めた仕事であり、その頃から、筆者と一緒に研究を進めてくれた学生さんの力なくしては、ここに紹介するような成果は得られず、今回の受賞はなかったと思います。まず、学生さんに感謝いたしたいと思います。また、共同研究を行っていただいた田谷正仁先生・紀ノ岡正博先生(阪大・院基礎工)をはじめとする諸先生方にも感謝たく存じます。最後に、筆者の香川大学時代からの共同研究者であり、現在、筆者の属する講座の教授である八木清仁先生に感謝たく存じます。

### 文 献

- 1) Fukui, S., Gellf, G., and Tanaka, A.: *Enzyme Engineering*, **4**, 299-306 (1978).
- 2) 福井三郎, 田中渥夫: *醗酵工学*, **56**, 448-454 (1978).
- 3) 川瀬雅也, 高井忠昌, 栗川伸也, 八木清仁, 溝口 正: *生体材料*, **16**, 128-132 (1998).

- 4) 川瀬雅也, 高井忠昌, 栗川伸也, 八木清仁, 溝口 正: *生体材料*, **16**, 192-195 (1998).
- 5) Tomalia, D. A.: *Aldrichimica Acta*, **37**, 39-57 (2004).
- 6) Yagi, K., Michibayashi, N., Kurikawa, S., Nakashima, Y., Mizoguchi, T., Harada, A., Higashiyama, S., Muranaka, H., and Kawase, M.: *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1290-1294 (1997).
- 7) Higashiyama, S., Noda, M., Kawase, M., and Yagi, K.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 475-482 (2003).
- 8) Kawase, M., Kurikawa, N., Miura, N., Shiomi, T., Ozawa, C., Higashiyama, S., Mizoguchi, T., and Yagi, K.: *Artif. Org.*, **24**, 18-22 (2000).
- 9) Kawase, M., Kurikawa, N., Higashiyama, S., Miura, N., Shiomi, T., Ozawa, C., Mizoguchi, T., and Yagi, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 433-437 (1999).
- 10) Hata, N., Kim, M.-H., Isoda, K., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 233-238 (2004).

### <補 足>

#### 原子間力顕微鏡 (AFM) とは

本稿では、デンドリマー修飾した培養基材表面の凹凸の様子を原子間力顕微鏡 (AFM) によって観察し、その結果を用いて議論しています。しかし、AFMは生物学分野で、まだあまりなじみのない装置であると思われるので、この補足において簡単な説明を行いたいと思います。

まず、AFMはどうやって数nmの凹凸を観察することができるのかを説明します。AFMの心臓部ともいえる測定部分に非常にバネ定数の小さな探針(カンチレバーといいます)が取り付けられています。このレバーには材料表面から、弱いのですが原子間力に由来する引力が作用します。この引力は表面の凹凸に従って強さが変動しますので、レバーをxy方向に走引しながら、引力が一定になるようにレバーのz方向の位置を調整してやります。表面の測定エリアについて、レバーの(x,y,z)の座標を記録することで、本文中に示したような図を得ることができるわけです。

詳しい説明が、AFM販売メーカーの[http://www.toyo.co.jp/spm/PNI/technology/single\\_Article\\_A\\_13.html](http://www.toyo.co.jp/spm/PNI/technology/single_Article_A_13.html)

にあります。興味のある方は、一度ご覧いただければ、と思います。