細胞シートの相互作用からバイオマテリアル 表面設計を考える

谷 口 彰 良

物質・材料研究機構, 生体材料研究センター, 細胞基盤技術グループ ☎ 305-0044 茨城県つくば市並木 1-1

(2003 年 10 月 7 日受理)

Development of Models of Tissue Structure in vitro, Using Cell Sheet Technology for Feedback to Surface Modification of Biomaterials

Akiyoshi TANIGUCHI

Bionic Material Technology Group, Biomaterial Center, National Institute for Material Science (NIMS)
1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044

(Received October 7, 2003)

The aim of this study is to explain the interactions between two cell groups. The tissue consists of different types of cell groups. Interactions between cell groups are important for organ or tissue functionality. Using cell sheet technology, we have proposed models of tissue structure in vitro. These models are very useful for studying interactions between cell groups at gene expression level. We studied the interactions between rat hepatocytes and human endothelial cells (HEC). Functions of rat hepatocytes monolayer culture disappeared within ten days. On the other hand, rat hepatocytes and HEC bilayered cell sheet culture system maintained over forty-one days of differentiated cell shapes and functions. These results indicated the importance of interactions between hepatocyte and HEC cell groups. The layered co-culturing of hepatocytes and HEC sheets allows the former's continuous expression of differentiated functions, thereby offering a major advancement in surface modification of biomaterials.

1. は じ め に

バイオマテリアルは生体に埋め込んだり, 生体と接する材料のことである。バイオマテリアルは生体と接した時, 細胞接着, 細胞増殖, 細胞分化, 生体防御反応などさまざまな問題が出現してくる。したがって, バイオマテリアルと生体との相互作用をバイオマテリアル界面で制御し, 細胞の接着, 増殖, 分化, さらに生体防御反応の回避などをコントロールすることが重要である。このような生体との相互作用に問題があると, 炎症や免疫による生体材料の拒絶, 感染などの問題に発展する場合がある。このような問題を最適化するために, バイオマテリアル表面設計が重要になってくる。バイオマテリアルの表面設計に際し, 生体を模倣することは重要な手段で

あることは間違いないであろう。そこで, 我々のからだを構成する組織・臓器は細胞集団が他の細胞集団とどのように相互作用しているかを検討することは生体親和性材料の表面の設計に重要な知見を与えられられる。すなわち, 細胞集団同士の相互作用をバイオマテリアル表面で再現するということである (Fig. 1)。しかし, 意外に異なった細胞集団同士の相互作用の研究例は少ない。ましてや遺伝子レベルでこれらの相互作用を検討した例はない。それは, 従来の研究が単一細胞を単層で培養した系で実験していることが原因であると考えられる。しかし, 生体はこのような実験系とは異なり, 異なった細胞が多層構造で存在している。我々は東京女子医大の岡野光夫教授らが開発した細胞シート工学を用い, 異なった細胞集団を2層化する培養システムをもちい, 細胞同士の相互作用を遺伝子レベルで解析するシステムの構築を試みた。

E-mail: TANIGUCHI.Akiyoshi@nims.go.jp

Fig. 1 Interactions between cell groups are important for organ or tissue functionality. Using cell sheet technology, we had made models of tissue structure in vitro (bilayered co-culture). These models are very useful for studying interactions between cell groups at gene expression level.

Fig. 2 The schematic diagram of liver lobule model using cell sheet technology. Human endothelial cells (HEC) were seeded and cultured at 37°C on temperature-responsive PIPAAm-grafted culture dish. Upon confluency, they were incubated at 20°C for 30 min. The harvested HEC sheet was placed onto the apical surface of monolayered Fao cells (rat hepatocyte cell line). Although it was believed that both the endothelial cells and hepatocytes would have a reciprocal functional influence on each other, few literatures had managed to clarify their mechanisms. The objective of this study was to determine gene expression of bi-layered co-culture hepatocytes and endothelial cells by quantitative real-time PCR.

2. 細胞シート工学を用いた重層化培養

ヒトをはじめとする動物細胞は一般に試験管内で培養することが可能である。しかし、この細胞は通常の培養で使用するポリスチレンの培養皿上で1層で培養すると、生体内と比較しその機能は著しく低下する。このことは、細胞集団同士の相互作用がいかに細胞の機能に重要なことを示している。そこで、このような相互作用を試験管内で再現し、それを解析できるシステムが必要になる。東京女子医大の岡野光夫教授らは細胞シート工学を用いて試験管内で異なった細胞集団同士を重層化しするシステムを開発し、主に再生医療などに展開している。温度

感受性素材、ポリN-イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)をコートした培養皿で培養した細胞は低温にすると表面が親水性に変化し、細胞はシート状に回収される。このシートは細胞外基質が無傷でのものであるので、他の細胞集団との親和性が良好である。この方法の詳細は他の総説に詳しく述べられているので、そちらを参照していただきたい¹⁻³⁾。肝細胞は単独培養では一週間程度で死滅してしまうのに対し、細胞シートを用いた肝-内皮細胞重層化共培養系では数か月以上機能を保持できることが明らかになっている (Fig. 2)⁴⁾。我々はこの技術を用いて試験管内で肝細胞と内皮細胞の重層化培養系を用いて細胞集団同士の相互作用について、遺伝

子レベルでの検討を試みた。

3. 2種類の細胞群からそれぞれの細胞群で発現している遺伝子を解析する方法

重層化培養システムで遺伝子の発現を解析するのにひとつの大きな問題点がある。それは、複数の細胞集団を培養した場合、どちらの細胞群の遺伝子発現が変化したかを調べるのは不可能であるということである。そこで、本研究では2種類の細胞集団が混在していても、それぞれの細胞集団の遺伝子発現量を定量する方法を開発した。多くの遺伝子は動物種間でよく保存されている。しかし、これらの遺伝子は動物種間で多少相同性が低い部分が存在する。一般に翻訳領域（たんぱく質のアミノ酸配列の情報はコードされている領域）よりも非翻訳領域に相同性が低い領域が存在する。そこで、たとえば、ヒト由来の細胞とラット由来の細胞が混在する培養系の場合、ヒトとラットで相同性の低い部分をプライマーに用いてリアルタイムPCRで定量すれば、発現遺伝子の分別測定が可能と考えられる。そこで、多くの細胞で発現している遺伝子でいわゆる house keeping 遺伝子（どの細胞でも一定量発現している遺伝子）である Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と肝臓特異的なアルブミン遺伝子に関して、この方法で計り分けを試みた。ラットとヒトのRNAを一定量混合し、それぞれの遺伝子発現量を測定した。その結果、ラットの GAPDH 遺伝子発現はヒトの RNA が混在していてもラット RNA の量にしたがって上昇した。また、ヒト

Fig. 3 Analysis of GAPDH and albumin gene expression levels in human and rat mixed RNA. In order to detect only one species specific gene product from this bi-layered co-culture system. The specific gene primers were set to the area where homology was low between rat and human gene sequence. By using these primers and real-time PCR, we developed the method of determining a specific gene to which a target cell expressed.

GAPDH 遺伝子発現はラットの RNA が混在していてもヒト RNA の量にしたがって上昇した (Fig. 3)。さらにラットアルブミン遺伝子に関しても同様の結果を得た。以上の方法を用いることにより、混在する2種類の細胞群からそれぞれの遺伝子発現量を定量する方法を確立できたと考えられる³⁾。

4. 内皮-肝重層化共培養での肝遺伝子の発現

このように、細胞シート工学を用いた重層化共培養系と遺伝子解析のシステムを確立したので、続いて、Fao細胞（ラット肝細胞株）とヒト血管内皮細胞（HEC）を用いた重層化共培養系における肝特異的遺伝子発現量を測定した。

肝臓の最小単位である肝小葉体は主に内皮細胞と肝実質細胞から成り立っている。このことは内皮細胞と肝細胞の相互作用が肝臓の機能に重要であることを示唆している。実際、肝細胞単独では分化機能を維持した長期培養はきわめて困難であり、通常は10日ほどで機能が低下し生存細胞数も減少する。これに対し、肝細胞に温度刺激に応答して親水/疎水変化するポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) を固定化した表面を用いて回収した血管内皮シートを積層した共培養系では、肝細胞は分化型形態およびアルブミン産生能を長期に維持することが報告されている。この理由として、重層化共培養系では内皮細胞シートに含まれる細胞外マトリックス、液性因子などが生体肝にきわめて近い状態に保持され、肝細胞の機能維持に貢献していることが推察される。そこで、本研究では上記の遺伝子解析の手法を用いて、血管内皮シート/肝細胞重層化モデルにおける内皮細胞の機能を定量的に検討した。HEC との重層化共培養系と単層培養した Fao 細胞の肝特異的遺伝子発現変化について検討した。肝特異的遺伝子は、糖新生、血漿蛋白質関連、尿素合成、アミノ酸代謝、脂質代謝および転写因子の6つの領域からそれぞれ2から3種類の遺伝子を選択し、その発現量を測定した。この結果、単層培養では発現が低かった脂質代謝系の遺伝子発現 Apo A-I が約4.7倍、Apo C-III 遺伝子の発現は約2倍程度重層化培養にすることにより上昇することを明らかにした (Fig. 4)。この遺伝子発現量はほぼ生体肝臓での発現レベルに等しい。このことから、HEC との重層化共培養により、肝細胞の一部の機能性が向上することが示唆された。しかし、いくつかの遺伝子の発現については変化が見られなかった。今回、肝細胞としてラット肝細胞株である Fao 細胞を用いて検討した。この細胞は株化された細胞で、無限増殖能を獲得した細胞である。通常、このような株化された細胞は増殖能力が旺盛で、発現メカニズムを明

Fig. 4 The liver specific genes expression in bi-layered Fao cells and HEC co-culture system. The gene expressions of lipid metabolic-related APO A-I and APO C-III were increased in the bi-layered co-culture system compared with cultured Fao monolayer. These results suggested that the functionality of the hepatocytes was improved in the double layered co-culture system.

らかにするための実験には使いやすい細胞である。しかし、Fao 細胞は正常のラット肝臓から取り出した初代培養細胞と比較して、かなり機能が低下している。したがって、今後、初代肝細胞をもちいて検討すれば、さらに多くの遺伝子の機能が回復しているものと期待される。

5. ま と め

以上のように、内皮-肝重層化共培養での肝遺伝子の発現を調べたところ、単層で培養した場合より、いくつ

かの遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。このことは、内皮細胞が産生する細胞外基質や増殖因子、サイトカインなどが肝細胞の機能発現に重要であることを示唆している。今後これらの因子を明らかにし、これらの分子の発現をバイオマテリアル表面に再現すれば、細胞の機能を維持し、生体との親和性の優れた材料を設計することが可能になると期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、実際の研究を精力的におこなっている黒澤康紀博士、白井暢子博士に感謝します。また、本研究に対し多くの助言および細胞シート工学システムのサポートをいただいた東京女子医科大学の岡野光夫教授に心から感謝いたします。また、出筆の機会を与えてくださりました、物質・材料研究機構、生体材料研究センター長である田中順三先生と宮原裕二ディレクターに感謝いたします。

文 献

- 1) 岡野光夫：Bio ペンチャー 3/4, 28 (2003).
- 2) 岡野光夫, 大和雅之：日経サイエンス 6, 43 (2003).
- 3) 播元政美, 岡野光夫：化学と生物 39, 671 (2001).
- 4) M. Harimoto, M. Yamato, M. Hirose, C. Takahagi, Y. Isoi, A. Kikuchi and T. Okano: J. Biomed. Mater. Res. 62, 464 (2002).
- 5) Y. Kurosawa and A. Taniguchi: manuscript in preparation.