●特集 日本膜学会膜学研究奨励賞（2003年）受賞論文

様々な高分子膜上に培養した動物細胞の生理機能 —培養基板の物理的特性と細胞生理機能との相関—

原 万里子

成蹊大学工学部応用化学科 〒180-8633 東京都武蔵野市吉祥寺北町3-3-1

Physical Properties and Morphologies of Animal Cells Cultured on Various Polymeric Membranes

Mariko Hara

Department of Applied Chemistry, Seikei University,
3-3-1 Kichijoji Kitamachi, Musashino, Tokyo 180-8633, Japan

Cell growth and the production of substance were investigated in animal cells cultured on extracellular matrix (ECM) protein membranes and various polymeric membranes prepared by Langmuir-Blodgett (LB) and casting methods. The relationship between the cell growth or spreading and physical properties (i.e., contact angle and surface roughness) of the polymeric membranes where the cells were cultivated was investigated. Exponential relationship was observed in the plots of the cell density versus root mean square of roughness of the membranes, which was estimated by atomic force microscopy. The cell growth and spreading ratio of animal cells were found to be higher on the LB membranes which adsorbed the serum proteins containing higher content of α -helix than those on the casting membranes. The contact angle of LB membranes was found to be different from that of cast membranes prepared from the same polymer used in the LB membranes. The maximum cell density and spreading ratio were observed on the membranes having a contact angle of around 55 degrees. It is suggested that the adsorbed serum proteins having high α -helix contents on the membranes control and stabilize the proliferation and spreading of animal cells cultivated on the membranes. The highest concentration of CEA was found in the cell culture media of CW-2 cells on collagen (COL)-immobilized PVA-EA membranes. This is explained by the flexible mobility of COL on the COL-immobilized PVA-EA membranes causing a specific cell response for the production of CEA. An inverse relationship was observed between either the cell density, or the CEA concentration in the cell culture media, and the amount of fibronectin (FN) adsorbed on the COL-immobilized membranes. These findings indicate that cells tend to attach to the surface by secreting ECM proteins such as FN when they are grown on substrates that provide weak cell attachment.

Key words : extracellular matrix (ECM) / Langmuir-Blodgett (LB) method / casting method / contact angle / surface roughness / circular dichroism (CD) / cell culture

1. 緒 言

生体内の血液細胞を除くすべての正常細胞にお

いて、その増殖過程は、まず細胞が接着し扁平を行い、次にDNA合成を開始して増殖を行なう接着依存性であることが知られている¹⁾。また、細

Fig.1 Growth curves of L929 cells incubated on representative membranes at 37°C using 1.0×10^4 cell/cm² initially with RPMI 1640 containing 10% FBS.

胞の接着状態は、繊維芽細胞が分泌する細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) 分子の仲介によって安定化している。このようにして、多細胞動物において細胞は協同して機能集団としての組織を、組織は組み合わせあって器官を、さらに様々な器官の集合体として個体が存在する。しかしながら、科学・工業技術が飛躍的に進歩した今日においても器官や組織どころか細胞でさえ工業的に生産することは不可能である。そこで体内で正常に機能しなくなった器官や組織の代替となる人工の器官や組織が使われている。現在では、様々な医用材料が研究開発され²⁻⁴⁾、多くの研究者はこれら高分子膜基板上に培養した細胞の細胞密度並びに形態について報告している⁵⁻⁹⁾。さらに、高分子膜基板の化学構造や材料表面の親水・疎水性が高分子膜基板上で培養した細胞の接着挙動ならびに成長への影響について数多くの報告がなされてきた⁵⁾。この材料表面の親水・疎水性に基づく細胞成長の相違は、血清中に含まれるタンパク質の材料表面に対する吸着性の違いに起因すると考えられている。これら血漿タンパク質の中でも細胞接着に大きく貢献しているフィブロネクチンの吸着については多くの研究が行われてきた¹⁰⁾。また、細胞は細胞表面の接着タンパク質の受容体であるインテグリンがECM分子中のArg-

Gly-Asp (RGD) 配列をはじめ、DGEAやYIGSR等のアミノ酸配列を認識して接着、扁平することが報告されている。この中でもRGDペプチド配列が最も多く研究されており、ECM^{10, 11)} 並びにその構成成分を含む高分子膜基板上における細胞の接着・増殖についても多くの報告がなされている^{12, 13)}。

本稿では、さまざまな高分子膜基板上に動物培養細胞を培養して、増殖と形態から細胞の足場となる基板の細胞への影響を検討し、さらには、どのような細胞培養用膜基板が細胞増殖に適しているのか、細胞の成長並びに生理活性物質の生産性と高分子膜の特性との関係を検討した結果を紹介する。

2. 高分子基板上に培養した動物細胞の増殖と形態観察

細胞外マトリックスであるコラーゲン (type 1) (Col), フィブロネクチン (FN), ラミニン (LN), ビトロネクチン (VN), 抗血栓性材料であるセグメント化ポリウレタン (Tecoflex) (Tec), 生分解性高分子である3-ヒドロキシ酪酸/3-ヒドロキシ吉草酸の共重合体 (HB/HV), ポリ- α アミノ酸であるポリ- γ -メチル-L-グルタマート (PMLG) を用いて、それぞれ

Table 1 Physical properties of membranes

Membranes	RMSR ^{a)} / nm	Contact angle ^{b)} / degree
Pst	1.27 ± 0.23	51.9 ± 2.7
Glass	0.77 ± 0.01	63.4 ± 6.8
Tec-LB	0.87 ± 0.05	60.8 ± 5.7
Tec-cast	5.23 ± 1.31	41.2 ± 3.4
HB/HV-LB	1.68 ± 0.10	51.7 ± 2.2.
HB/HV-cast	13.6 ± 3.8	71.1 ± 3.1
Col-LB	0.95 ± 0.06	56.3 ± 4.0
Col- cast	0.46 ± 0.12	44.9 ± 2.0

a) The values indicate averages ($n=16$) ± S.D.b) The values indicate averages ($n=8$) ± S.D.

Langmuir-Blodgett (LB) 法ならびにキャスト法により細胞培養用高分子膜基板を調製した. CD スペクトルにおける高分子LB膜の配向性 (CD スペクトルにおける回転角依存性) を検討したところ, LB膜が配向していることが明らかとなった¹⁴⁾. すなわち高分子LB膜を緩衝液に浸漬後, 90° に回転させCDスペクトルを測定した場合, 0° でのスペクトルと比較して強度が1/3~2/3に減少することが観察され, LB膜の作製時の圧縮方向に対し, 高分子がCDスペクトル測定時の地表面に平行な角度に配向していることが明らかとなった¹⁴⁾. これらさまざまな高分子膜基板上にマウス結合組織由来の繊維芽細胞であるL929細胞, ラット副腎髄質由来褐色細胞腫株であるPC12細胞, 生理活性物質であるガン胎児性抗原 (CEA) を生産するヒト大腸ガン由来 (CW-2) 細胞, IFN- β 産生細胞であるヒト新生児皮膚由来正常繊維芽 (NB1-RGB) 細胞を培養して, 細胞の経時変化を観察した^{10~13, 15~18)}. さまざまな高分子膜基板上に培養した動物細胞に対する細胞密度の経時変化の一例をFig. 1に示す¹⁸⁾. 植え込み後2~6時間で細胞は接着し, 植え込み後6~72時間では, 細胞密度を対数プロット表示すると直線的に増殖していることが明らかとなった. さまざまな高分子より調製したLB膜基板とキャスト膜基板上に培養した動物細胞を比較すると, いずれの高分子

膜基板上においても細胞密度並びに扁平率は, LB膜基板の方がキャスト膜基板より高くなっていた. 以上より, いずれの高分子より調製した膜基板上の動物細胞は, キャスト法よりも, LB法により調製した高分子膜基板上での細胞接着数は多く, さらに高い扁平率が観察された. この原因を探求するために, LB膜基板とキャスト膜基板の物理特性 (原子間力顕微鏡より計測した表面粗さと水に対する接触角) を計測して, 膜基板の物理特性と動物細胞の細胞密度並びに扁平率との相関性, さらには生理活性物質の生産性との相関性を検討した.

3. 原子間力顕微鏡による高分子膜基板の表面観察

高分子膜基板上に培養した動物細胞の成長と, 細胞外マトリックス並びに成長因子の生産に基板の表面粗さが影響することが報告¹⁴⁾ されていることから, 各高分子膜基板表面を原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察し, 各膜基板の表面粗さの標準偏差 (Roughness mean standard deviation, RMSR) を算出した. RMSRは, 以下の式で定義した.

$$\text{RMSR} = \sqrt{\sum (Z_i - Z_{\text{ave}})^2 / N}$$

N はデータのポイント数, Z_i は各データポイントの Z の値, Z_{ave} は全 Z 値の平均である. すべての高分子膜基板において, 細胞接着膜基板表面が, 高分子の配向したLB膜基板¹⁴⁾ では滑らかであり, これに対してキャスト膜基板では粗いことが観察された (Table 1). 各膜基板に対して測定されたRMSR値と動物細胞の細胞密度との関係を検討した^{17, 18)}. RMSRとL929細胞植え込み96時間後における細胞密度との関係をFig. 2aに示す. RMSRが小さい値ほどL929細胞の細胞密度が高くなるこ

Fig. 2 Relationship between RMSR (a) or contact angle (b) and cell density of L929 cells after inoculation at 96 hrs.

とが観察され、RMSRと細胞密度との間には一次の逆比例する相関性が存在すると考察した。

4. 高分子基板に対する水の接触角

高分子膜基板の水に対する接触角を静的接触角測定法により計測した (Table 1). Tec-cast膜基板の水に対する接触角は41°, Tec-LB膜基板の水に対する接触角は61°と測定され、Tec-cast膜基板よりもTec-LB膜基板のほうが疎水性であると考察した。また、HB/HV-cast膜基板の水に対する接触角は71°, HB/HV-LB膜基板の水に対する接触角は52°と測定され、キャスト膜基板よりもLB膜基板のほうが親水性であり、同じ高分子材料を用いても、異なる製膜法により高分子膜基板の水に対する接触角は異なることが観察された^{17, 18)}。

高分子膜基板表面の極性とL929細胞植え込み96時間後における細胞密度との相関性について検討した (Fig. 2b). 細胞密度を対数プロットすると細胞密度と接触角の間には上に凸の関係が得られ、約55°の接触角のとき、細胞密度は最大値を示した。また、55°付近の接触角を持つ高分子基板においてL929細胞の細胞接着密度は高かったことより、基板の接触角と細胞の接着状態との

間には相関性があると考察した。しかしながら、単純に材料表面の親水性、疎水性さらには界面エネルギーといった表面物理パラメーターのみでは、細胞における高分子材料の適合性は論じられないと考えられる。著者らの調製した高分子膜基板においてもLB法により調製した高分子膜基板上の方が動物細胞の細胞接着数は多く、扁平率は高かったことより、高分子膜基板の水に対する接触角ばかりでなく、基板の表面粗さならびに配向性も細胞接着状態に影響を及ぼしていると考えした。

5. 血清タンパク質の円偏光二色性スペクトル

細胞-基板間の相互作用を厳密に研究するためには、無血清培地中で細胞培養を高分子基板上で行う方が適切と考えられる。しかしながら、細胞培養基板を最終的に*in vivo*で使用することを考慮すると血清培地中で細胞培養を行う方が得策であると考えられる。細胞が高分子膜基板に接着する場合、細胞は血清タンパク質ならびに細胞が分泌する細胞接着因子ならびにECMを介して高分子膜基板と接着していることが知られている。したがって、高分子膜基板を培地中に浸漬させると培

Fig. 3 Relationship between α -helix content (a) and β -sheet content (b) of serum proteins adsorbed on the cast and LB membranes and cell density of L929 cells on the membranes incubated for 96 h at 37 °C using 1.0×10^4 cell/cm² initially with RPMI 1640 containing 10% FBS.

地中に大量に含まれている血清タンパク質が高分子膜基板にまず吸着を行うことが予想される。この時、高分子膜基板の表面物理パラメーター（基板表面粗さ、基板表面の親疎水性）は、高分子膜基板に吸着する血清タンパク質の吸着量と高次構造を制御すると考えられる。この高分子膜基板に吸着された血清タンパク質の質（高次構造）と量（吸着量）は、高分子膜基板に接着する細胞の増殖性と扁平性、さらには細胞が分泌する生理活性物質の生産性に影響を与えていると本研究では仮定した。この仮定を検証するために、さまざまな高分子膜基板に吸着した培地中の血清タンパク質の吸着量ならびに高次構造を円偏光二色性 (CD) スペクトルより測定して、動物細胞の細胞密度ならびに扁平率さらには生理活性物質の生産性と基板に吸着した血清吸着量ならびに二次構造含量との相関性について検討を行った^{17, 18)} (Fig. 3)。基板に吸着した血清タンパク質の構造解析は、200 nm–240 nm間のCDスペクトルの楕円率から解析した。水溶液である血清培地中の血清タンパク質の α -ヘリックス含量は約58%であるのに対し、Tec-LB、HB/HV-LB、Col-LBならび

Fig. 4 Relationship between α -helix content of serum proteins adsorbed on the membranes and CEA production of CW-2 cells after 7 days of incubation.

にCol-cast膜基板に吸着した血清タンパク質中の α -ヘリックス含量は58%以上に増加していた。膜基板に吸着した血清タンパク質中の α -ヘリックス含量が多くなればなる程、また、 β -シート含量が少ない程、細胞密度並びに扁平率は高くな

Fig. 5 Relationship between amount of adsorbed FN and cell density (a) or CEA concentration (b) on representative collagen membranes after incubation of CW-2 cells for 13 days.

ることが観察された。以上の原因として生体内において、細胞骨格は細胞外マトリックス分子の配向に影響し、その細胞外マトリックス分子はそれと接触する細胞の細胞骨格の組織化に影響を与えるため、細胞外マトリックスの持つ α -ヘリックス構造同士の高い相互作用によって細胞の接着状態を安定化させたためと推定される。さらには、細胞からの生理活性物質の生産性との相関性を検討した結果 (Fig. 4), CW-2細胞が生産するCEAの生産量は、膜基板に吸着した血清タンパク質中の α -ヘリックス含量が水溶液状態である血清タンパク質の α -ヘリックス含量である約58%に近い程、高くなることが観察された。

これらの細胞成長の相違は、血清中に含まれるタンパク質の材料表面に対する吸着性の違いに起因すると考えられている。血漿タンパク質の中でも細胞接着に大きく貢献しているフィブロネクチンの吸着について検討を行った¹⁰⁾。高分子膜基板を培地中に浸漬させ、この基板上に吸着されたFNの吸着量をELISA法により測定して、CW-2細胞の増殖性並びにCEA生産性と高分子膜基板に吸着したFN量との相関性を検討した (Fig. 5)。そ

Fig. 6 Cell density of NB1-RGB cells cultured on various cast membranes after 24 hrs of induction.

の結果、COL-キャスト膜上並びにCOL固定化PVA膜の方がCOL-LB膜上よりもFNの吸着量は多かった。CW-2細胞の増殖性並びにCEA生産性と高分子膜基板に吸着したFN量との間には負の相関関係が得られ、FNの吸着量が減少するに従い、CW-2細胞の細胞密度並びにCEAの生産性は高くなることが観察された。以上のことより、膜基板上に吸着したFN量が細胞の増殖性とCEA生産性に影響を与えていると考察した。

Fig. 7 Cell density (a) and IFN- β production (b) of NB1-RGB cells cultured on (AG)₁₅ and (AG)₆ RGD (AG)₇ cast membranes after 24 hrs of induction.

6. 細胞接着ドメイン配列含有ペプチド膜上におけるIFN- β の生産性

細胞接着ドメイン配列を含む絹フィブロイン模倣ペプチド膜基板は、用いた溶媒の種類によって様々な2次構造を示すことが知られていることから、ペプチド膜の2次構造をCDスペクトルを用いて測定した。様々な細胞接着ドメイン配列含有ペプチド膜上にIFN- β 産生細胞であるNB1-RGB細胞（繊維芽細胞）を培養して、これら膜の2次構造の相違がNB1-RGB細胞からのIFN- β 生産性に与える影響を検討した^{12, 13)}。さらに、ペプチド膜基板中のRGD配列と細胞接着に関与するインテグリンレセプターとの特異的結合によるIFN- β 生産性を、抗インテグリン β_1 抗体を培地中に添加することにより検討した¹²⁾。様々なRGD含有絹フィブロイン模倣ペプチド膜、ProNectin F膜並びにProNectin L膜基板上に培養したNB1-RGB細胞に対してIFN- β 誘導操作を行い、NB1-RGB細胞のIFN- β 生産について検討した（Fig. 6）。フルオロ酢酸溶媒で調製したペプチド膜基板上におけるNB1-RGB細胞のIFN- β 生産性は、ペプチド中のRGD配列が末端から中心に配置されるに従い、増大する傾向が観察された。しかしながら、LiClO₄を溶媒に用いた際には、ペプチドの中心

にRGD配列が位置する（AG）6RGD（AG）7ペプチド膜基板において、最も低いIFN- β 生産性を示した¹²⁾。製膜溶媒に依存して、これら細胞培養用高分子膜の2次構造が変化して、基板上に接着する細胞の生理活性物質の生産性に影響を与えていると考え、様々な溶媒により調製したペプチド膜基板の2次構造をCDスペクトルを用いて測定した。その結果、各基板により、ペプチドの2次構造に違いが有ることが観察された¹²⁾。（AG）6RGD（AG）7ペプチド膜基板の2次構造は、Type 1- β -turn構造を有していると推定され、この2次構造が最も細胞のIFN- β 生産性の誘起をもたらすと考察した。さらに、ペプチド膜基板中のRGD配列とインテグリンレセプターとの特異的結合によるIFN- β 生産性を検討するために、抗インテグリン β_1 抗体を培地中に添加した際のNB1-RGB細胞によるIFN- β 生産性について検討した（Fig. 7）¹²⁾。（AG）15ペプチド膜基板並びに（AG）6RGD（AG）7ペプチド膜基板上におけるNB1-RGB細胞の細胞密度は、抗体添加の有無に関わらず同様であった。一方、IFN- β 生産性について検討したところ、培地中に抗インテグリン β_1 抗体を添加したことにより、（AG）6RGD（AG）7ペプチド膜基板上でのIFN- β の生産が抑制されていた。これによりRGD配列が細胞のインテグリン β_1 レセプターを介してIFN- β 生産性に関与していることが示唆された。

7. 結 論

さまざまな高分子膜基板上における培養細胞の細胞接着状態は今日まで多くの研究者が基板の接触角、すなわち水ぬれ性が細胞の接着・成長に影響を及ぼすことを報告⁵⁾してきたが、本実験において様々な高分子膜に対する水の接触角並びにAFMによりRMSRを測定した結果、高分子膜表面の物理的特性と細胞の接着状態との間には相関関

係があることが明らかとなった^{17, 18)}。本実験の結果では、細胞の生理活性物質生産性は培養する基板の化学的・物理的特性の違いにより異なることが明らかとなった。さらに、細胞培養用膜の素材のみでなく、膜表面に存在する基材の高次構造が細胞の生理活性物質生産を誘起することが示唆された。

現在、いかなる動物細胞培養用高分子膜基板が細胞培養材料として適しているのか、細胞と材料との相互作用を詳細に解明することにより種々の用途に応じた医用材料の研究開発が期待されている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導していただきました成蹊大学工学部応用化学科教授樋口亜紺先生に心から御礼申し上げるとともに、深く感謝致します。さらに、本研究に携わり、ご指導、ご協力いただいた方々に篤く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Folkman J, Moscona A : *Nature*, **273** 345-349 (1978)
- 2) Higuchi A, Takarada H, Uchino J, Tanigaki Y, Hara M : *Sen-i Gakkaishi*, **54** (4) 204-211 (1998)
- 3) Higuchi A, Shirano K, Harashima M, Yoon BO, Hara M, Hattori M, Imamura K : *Biomaterials*, **23** (13) 2659-2666 (2002)
- 4) Higuchi A, Sugiyama K, Yoon BO, Sakurai M, Hara M, Sumita M, Sugahara S, Shirai T : *Biomaterials*, **24** (19) 3235-3245 (2003)
- 5) Tamada Y, Ikada Y : *J. Biomed. Mat. Res.*, **28** 783-789 (1994)
- 6) Braber E. T, Ruijter JEde, Smits H T J, Ginsel L A, Recum A F Von, Jansen J : *A, Biomaterials*, **17** (21) 2037-2044 (1996)
- 7) Cho CS, Goto M, Kobayashi A, Kobayashi K, Akaike T : *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* : **7** (12) 1097-1104 (1996)
- 8) Cho C S, Kobayashi A, Goto M, Park K H, Akaike T : *J. Biomed. Mat. Res.*, **32** 425-432 (1996)
- 9) Shimojo S, Akaike T, Hara M, Higuchi A, Park I. K, Cho C S : *J. Biomat. Sci., Polym. Edn.* **13** (7) 829-842 (2002)
- 10) Hara M, Adachi S, Higuchi A : *J. Biomat. Sci., Polym. Edn.*, **14** (2) 139-155 (2003)
- 11) Higuchi A, Takanashi Y, Ohno T, Asakura T, Cho CS, Akaike T, Hara M : *Cytotechnology*, **39** (3) 131-137 (2002)
- 12) Higuchi A, Takanashi Y, Tsuzuki N, Asakura T, Cho C S, Akaike T, Hara M : *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A** (3) 369-378 (2003)
- 13) Hara M, Takanashi Y, Tuzuki N, Kawakami H, Toma K, Higuchi A : *Cytotechnology*, **42** 13-20 (2003)
- 14) 原万里子, 樋口真弘, 箕浦憲彦, 大内将吉, 曹鐘守, 赤池敏宏, 樋口亜紺, 日化, **5** 483-490 (1996)
- 15) Higuchi A, Yoshida M, Ohno T, Asakura T, Hara M : *Cytotechnology*, **34** 165-173 (2000)
- 16) Higuchi A, Uchiyama S, Demura M, Asakura T, Cho C S, Akaike T, Takarada H, Hara M : *Cytotechnology*, **31** (3) 233-242 (1999)
- 17) 原万里子, 朝倉哲郎, 曹鐘守, 赤池敏宏, 樋口亜紺, 日化, **4** 257-265 (2000)
- 18) Higuchi A, Tamiya S, Tsubomura T, Katoh A, Cho CS, Akaike T, Hara M : *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **11** (2) 149-168 (2000)

(受付2003年10月19日 掲載決定10月27日)

著者略歴

原 万里子 (はら まりこ)

1993年3月 明治大学農学研究科農学専攻博士前期課程修了。

1996年8月 通産省工業技術院物質工学工業技術研究所流動研究員。

1998年3月 成蹊大学博士学取得。

同年11月 同大学工学部工業化学科助手。

2003年 成蹊大学工学部応用化学科助手。