論文特集「分子認識とその応用」

(日本化学会誌, 1987, (3), p.575~579)

© 1987 The Chemical Society of Japan

ラクトース置換スチレン単独重合体の肝細胞による
認識と肝細胞培養への応用

(1986年8月11日受理)

小林一清*・住友 宏・小林 明**・赤池敏宏***

オリゴ糖を側鎖にもつポリスチレン型単独重合体を吸着させた培養皿の上で、ラット肝細胞の接着実験を行ない、重合体中の糖鎖が生物認識信号としての機能を発現することを明らかにした。肝細胞は、ラクトース置換スチレン単独重合体(PVLA)を吸着した皿の上に特異的によく接着し、血清を含んだWilliams E 培養液中で92%に達する高い初期接着率を示した。接着には Mg^{2+} を必要としないが、 Ca^{2+} は不可欠であった。肝細胞のPVLA 皿への接着は、肝細胞をあらかじめ培養液中のPVLA で処理すると阻害されるが、遊離のガラクトースならびにラクトース、ラクトース置換スチレンモノマー、およびマルトース置換スチレン単独重合体では阻害されなかった。PVLA と肝細胞との間にはたらくガラクトースを介した特異的認識が、PVLA の多官能性と高いガラクトース糖鎖密度のために強化されているものと考えた。また、本研究で用いた重合体は、細胞による分子認識を応用した新しい型の生医学材料となることを示した。

1 緒 言

糖タンパク質や糖脂質のような複合糖質に結合しているオリゴ糖鎖は、細胞表面から外側に配向して多様な分子形態をとり、細胞の分化・成長・器官形成・がん化・老化や細胞間相互作用などに関する生物情報認識信号として重要な役割を担っている¹⁾。生体中に微量しか存在しない複雑なオリゴ糖鎖について、構造決定やその生物学的意義に関する研究が精力的に進められる一方、単純な単糖や二糖、および一部を化学変換した糖鎖であっても、それに応じた特徴的な認識信号機能が発現されることも明らかにされてきた²⁾。

本研究は、このように多様な生物情報をもつオリゴ糖を高分子に組み込むことにより、分子認識を応用した新しい型の生医学材料や分離機能材料を開発することを目的としている。まず、入手しやすいオリゴ糖のスチレン誘導体を調製し、そのラジカル重合によって、図1に示した構造単位をもつ高分子量の単独重合体を合成した³⁾⁴⁾。ポリマーの主鎖を構成する α -ビニルベンジル基がラクトース、グルコース、マルトース、およびマルトリオースのアミド誘導体と結合した構造単位からなるので、これらの重合

体をそれぞれ PVLA, PVGA, PVMA, および PVMTA と表示する。 α -D-グルコピラノシル基を糖鎖末端にもつ PVMA と PVMTA は、コンカナバリンAと結合して沈殿を生じることから、これらの合成高分子においても分子認識が働くことを確認した⁴⁾。

つぎに、生物認識信号としての機能をさらに活用するために、ラット肝細胞との相互作用を調べた⁵⁾⁶⁾。哺乳動物の肝細胞は、糖鎖の微妙な変化を認識している。循環血液中の糖タンパク質の糖鎖末端からシアル酸が除去され、ガラクトースが新しい糖鎖末端(アシアロ糖タンパク質)になると、血液中に安定に留まることができず、肝細胞に取り込まれ排除されることが、Ashwell ら⁷⁾⁸⁾によって見いだされた。これをきっかけに肝細胞の糖鎖認識に関する研究が飛躍的に発展した。肝細胞の表面からガラクトース糖鎖と特異的に結合するレクチンタンパク質が単離され、肝細胞やレクチンと糖鎖との親和性の強さについても詳細な研究が行なわれている^{9)~10)}。

- 5) 小林一清, 住友 宏, 小林 明, 石田正夫, 西沢真治, 赤池敏宏, 高分子論文集, 42, 719(1985).
- 6) A. Kobayashi, T. Akaike, K. Kobayashi, H. Sumitomo, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 7, 645(1986).
- 7) G. Ashwell, A. G. Morrell, *Adv. Enzymol.*, 41, 99(1974).
- 8) G. Ashwell, A. G. Morrell, *Trends Biochem. Sci.*, 2, 76(1977).
- 9) G. Ashwell, J. Harford, *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 531(1982).
- 10) 川崎敏祐, 山科郁男, “細胞認識と動物レクチン”, 大沢利昭編, 講談社(1982) p.81.
- 11) J. U. Baenziger, D. Fiete, *Cell*, 22, 611(1980).

名古屋大学農学部, 464 名古屋千種区不老町

** 東京農工大学工学部, 184 東京都小金井市中町

1) N. Sharon, *Trends Biochem. Sci.*, 9, 198(1984).2) C. P. Stowell, Y. C. Lee, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37, 225(1980).3) K. Kobayashi, H. Sumitomo, Y. Ina, *Polym. J.*, 15, 667(1983).4) K. Kobayashi, H. Sumitomo, Y. Ina, *ibid.*, 17, 567(1985).

Fig.1 The structural units and the abbreviations of the homopolymers of oligosaccharide-substituted styrenes

図1の重合体を培養皿に吸着させて、Eagle MEM 培養液中でラット肝細胞の培養実験を行なったところ、糖鎖構造の違いによって細胞応答に顕著な差が認められた^{5,9)}。ガラクトース糖鎖末端をもつ PVLA を吸着させたときに、血清の有無にかかわらず、肝細胞の初期接着率がいちじるしく高くなり、培養皿表面の PVLA 密度に関するしきい値 (Threshold) 現象が観測された⁹⁾。また、肝細胞が5日後でも高い生存性を示すことも報告した⁹⁾。

本論文では、血清を添加した Williams E 培養液を用いると、PVLA 皿への肝細胞の初期接着率がさらに高まることを明らかにし、初期接着におよぼす二価金属イオンおよび糖誘導体の添加効果について検討する。さらに、その結果に基づいて、肝細胞の接着における肝細胞と PVLA との間の強い分子認識機構の発現について考察を行なう。PVLA 分子からは無数のガラクトース糖鎖末端が突きでており、糖鎖密度も高い。肝細胞は PVLA の高密度のガラクトース糖鎖を認識しているものと考ええる。なお、Lee ら^{17,18)}の報告している、D-ガラクトース残基を結合したアク

リルアミド共重合体ゲルへの肝細胞接着との比較も行なう。

2 実験

2.1 培養皿への重合体の吸着

オリゴ糖置換スチレン誘導体のラジカル単独重合によって重合体を調製し^{3,4)}、蒸留水に溶解して所定濃度 (通常 0.1 mg/ml) の水溶液とした。その 1 ml を疎水性の高いポリスチレン製ペトリ皿 (Falcon 1008; 35 mmφ) に注入し、室温で 10 分間静置したあと上澄み液をデカンテーションによって除き、ペトリ皿表面を 1 ml の Dulbecco リン酸塩緩衝液で 3 回すすいで、重合体を吸着・塗布した培養皿を作成した。

2.2 改良マイクロスフェアカラム法¹⁹⁾による PVLA のポリスチレンへの吸着量の測定

直径が 150 μm で比重が 1.05 g/cm³ のポリスチレンマイクロスフェア (日本ケミカル(株)社製) を、内径が 3 mm で長さが 10 cm のテフロン製のミニカラムに充填した。充填量を求めて、全表面積を算出した。ミニカラムの両端をマイクロフローセルに組み込んで、紫外可視分光光度計に接続した。0.030 mg の PVLA を含む水溶液 0.30 ml を注入し、10 分間静置した。蒸留水を流して、溶出する PVLA の濃度を 264 nm の吸光度から算出した。空のカラムとマイクロスフェア充填カラムの PVLA 溶出量の差から、ポリスチレンマイクロスフェアへの PVLA の吸着量を測定した。単位面積あたりに換算すると、59 ± 4 ng/cm² である。

2.3 肝細胞懸濁液の調製と細胞培養

Williams E 培養液は、Flow Laboratories, Inc. 製の粉末を用いて調製した。必要に応じて、Gibco 社製のウシ胎児血清を、培養液中に 10% になるように加えた。Hanks 培養液は、所定の処方にしたがって調製し、必要に応じて、二価陽イオンとラクトースを添加した。

5 週齢のメスの SD 系ラットの肝臓から Seglen²⁰⁾ の方法に準じて肝細胞を分離し、培養液を加えて、細胞濃度 3 × 10⁵ cells/ml とした。重合体を塗布した培養皿に 1.5 ml の肝細胞懸濁液を加え、5% 二酸化炭素培養装置内で静置し、37°C で培養を行なった。所定時間後、軽くふりまぜながら上澄み液を試験管に採り、さらに 1 ml のリン酸塩緩衝液でペトリ皿をすすいで、接着しなかった細胞をすべて回収した。血球計算板で細胞数を計数して、接着率を算出した。さらに詳細な方法についてはすでに報告した⁵⁾。

3 結果

3.1 PVLA 皿への Williams E 培養液中での肝細胞の特異的接着

ポリスチレン製培養皿の上にオリゴ糖置換スチレンの単独重合体を吸着させて、Williams E 培養液中で肝細胞の培養を行ない、12 時間までの初期接着率を求めた。図2にウシ胎児血清添加系

- 12) K. Kawaguchi, M. Kuhlenschmidt, S. Roseman, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2230(1981).
- 13) D. T. Connolly, R. R. Townsend, K. Kawaguchi, W. R. Bell, Y. C. Lee, *ibid.*, **257**, 939(1982).
- 14) Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, *ibid.*, **258**, 199(1984).
- 15) R. T. Lee, P. Lin, Y. C. Lee, *Biochemistry*, **23**, 4255(1984).
- 16) M. R. Hardy, R. R. Townsend, S. M. Parkhurst, Y. C. Lee, *ibid.*, **24**, 22(1985).

- 17) P. H. Weigel, R. L. Schnaar, Y. C. Lee, S. Roseman, *J. Biol. Chem.*, **253**, 330(1978).
- 18) P. H. Weigel, R. S. Schnaar, M. S. Kuhlenschmidt, E. Schmell, R. T. Lee, Y. C. Lee, S. Roseman, *ibid.*, **254**, 10830(1979).
- 19) 小川公博, 笠井俊二, 赤池敏宏, 生体材料, **11**, 17(1983).
- 20) P. O. Seglen, *Methods Cell Biol.*, **13**, 29(1976).

Fig. 2 Adhesion of hepatocytes to polymer-coated polystyrene dishes in serum-supplemented (A) and serum-free (B) Williams' Medium E

○, PVLA; ●, PVGA; □, PVMA; △, PVMTA; ●, noncoating

(A)と無添加系(B)の結果を示した。重合体で処理していないポリスチレン皿(noncoatingと表示した)では非特異的相互作用だけがはたらき、接着機構が異なるので、重合体皿と直接に比較するには注意を要すると思われるが、対照実験として図2に示した。

PVLA 皿への接着性は、血清を添加することによって向上し、1時間後には73%が、12時間後には92%が接着した。既報²¹⁾のように、血清添加系のEagle MEM培養液を用いたときの1時間後の接着率が55%程度であるのと比較すると、大幅に上昇している。Williams E培養液は、Eagle MEMに若干のアミノ酸・ビタミン・塩類などを添加して改良されたものであり、コラーゲン塗布皿への肝細胞培養に最適の培養液であることが知られている²¹⁾。PVLA 皿は、コラーゲン皿に匹敵する高い肝細胞初期接着性を示した。

一方、PVLA 皿以外の重合体皿では、血清無添加系では相当の接着性を示すにもかかわらず、血清を添加することによりたかだか3%程度しか肝細胞が接着しなくなる。血清中には多種多様なタンパク質・ホルモン・ビタミンなどの生理活性物質が含まれており、その中には細胞接着・増殖・機能発現に不可欠な成分があるとともに、それを抑制する成分も含まれている²²⁾。とくに、血清の主成分であるアルブミンは細胞接着を弱めることが知られている²³⁾。肝細胞とPVLAとの間の分子認識に基づく強い特異的相互作用による接着は、それらの抑制因子による影響を受けないが、ほかの重合体との弱い相互作用による肝細胞の接着は、抑制されやすいことも考えられる。また、血清中のほかの成分と重合体の糖鎖との間に特有の相互作用がはたらく可能性もあり、血清添加系と無添加系に見られる接着挙動の大きな違いの原因は、今後解明されなければならない課題である。

高価な血清を使用しないで、血清中の必要不可欠な成分だけを添加する無血清培養の試みも盛んになっている²⁴⁾。無血清条件で

Fig. 3 Effect of divalent cations on hepatocyte adhesion in PVLA-coated dishes

○; Ca^{2+} and Mg^{2+} , □; Ca^{2+} , △; Mg^{2+} , ▽; Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free, ●; Ca^{2+} and Mg^{2+} in noncoated dishes
Serum-free Hanks' solution

も比較的高い接着能を示すPVLAは、この観点からも有用である。

3.2 二価陽イオンおよび糖誘導体の添加効果

PVLA 皿への肝細胞の接着挙動におよぼす二価陽イオンの効果を図3に示した。Hanks緩衝液は、 Ca^{2+} と Mg^{2+} (CaCl_2 , 0.14 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.20 g/l)を含む数種類の塩を混合して調製されるが、これらの塩を添加したときとしないときの4種類を培養液として用いて、細胞接着率を測定した。 Ca^{2+} は接着に必要であるが、 Mg^{2+} は必ずしも要求されないことが、図3から読み取ることができる。フィブロネクチンやコラーゲンを介した肝細胞接着が Ca^{2+} と Mg^{2+} の両方を必要とする²⁵⁾のに対して、肝細胞表面にあるガラクトース特異的のレクチンは Ca^{2+} のみに依存することが知られている⁷⁻¹⁰⁾。

つぎに、PVLA 皿への肝細胞接着に対する糖誘導体の添加効果を調べて表1にまとめた。糖誘導体を溶解したWilliams E培養

21) K. Tanaka, M. Sato, Y. Tomita, A. Ichihara, *J. Biochem.*, **84**, 937(1978).

22) R. Enat, D. M. Jefferson, N. Ruiz-Opazo, Z. Gatmaitan, L. A. Leinwand, L. M. Reid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1411(1984).

23) 長岡昭二, 丹沢 宏, "バイオマテリアルサイエンス第1集", 鶴田慎二, 桜井靖久編, 南江堂(1982) p.111.

24) 村上浩紀, 化学と生物, **24**, 34(1986).

25) 小林 明, 赤池敏宏, 小林一清, 住友 宏, 第15回医用高分子シンポジウム講演要旨集, p.51(1986).

Table 1 Inhibition effect of carbohydrate derivatives on hepatocyte adhesion to PVLA-coated dishes^{a)}

Carbohydrate	Concn., (mmol·dm ⁻³)	Cells adhered (%)
None	—	78
Galactose	10	71
Lactose	10	74
VLA ^{b)}	0.2	74
PVMA	0.2	70
PVLA	0.2	18

a) 3×10^5 cells/ml; serum-free Williams' medium E; rat hepatocytes were treated with carbohydrate derivatives for 60 min and then incubated for 60 min.

b) Lactose-substituted styrene monomer, *N*-(*p*-vinylbenzyl)-[*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-D-gluconamide.

液を所定濃度になるように肝細胞懸濁液に加えて、時々ふりまぜながら培養器中 37°C で 60 分間前処理を行なったあとに、PVLA 皿に移して接着実験に供した。遊離のガラクトースならびにラクトースや、ラクトース置換スチレンモノマー (VLA)、およびマルトース置換スチレンポリマー (PVMA) を添加しても、実験誤差の範囲内で糖無添加系と差がなく阻害効果が現われない。ところが、PVLA で肝細胞を前処理すると、その肝細胞の PVLA 皿への接着率は大幅に減少し、PVLA は肝細胞接着の有効な阻害剤にもなることがわかった。

ラクトースが阻害効果を示さないことは、図 4 に示した実験からも確認した。図 4 では、PVLA 皿を調製するのに使用した PVLA の希薄水溶液の濃度を対数目盛で横軸にとり、60 分後の肝細胞接着率を縦軸に示した。ラクトースを添加しないで肝細胞を培養すると、○印で示したように、約 10^{-4} mg/ml の PVLA 濃度を境にして接着率の急激な変化が認められ、既報⁵⁾のような明確なしきい値現象が観測されることを本実験でも確認できた。一方、ラクトースを 0.86 mg/ml ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 加えて肝細胞を前処理したあと培養した結果を、●印で示した。極微量 (10^{-5}

mg/ml 以下) の PVLA を用いて PVLA 皿を調製したときには、ラクトースを肝細胞懸濁液に加えると接着率が少し高くなる傾向にある。約 10^{-3} mg/ml のところまでは少しばらついているが、 10^{-2} mg/ml 以上の PVLA 濃度になると、ラクトースを添加しても接着率の低下はまったく認められない。しきい値現象の発現はラクトースを添加することによってあいまいになったが、PVLA 皿への肝細胞接着は、ラクトースによって阻害されないことが明らかとなった。

PVLA の実際の吸着量、とくにしきい値効果を発揮する吸着量を知ることは重要であるが、微量であるために現在のところ測定できていない。もし、 10^{-4} mg/ml の PVLA 水溶液を用いて 35 mmφ のポリスチレン皿に吸着させたときに、PVLA の全量が吸着されるならば、吸着量は 11 ng/cm^2 となる。改良マイクロスフェア法を用いて測定した PVLA のポリスチレンへの吸着量は、実験 2.2 に記したように、 $59 \pm 4 \text{ ng/cm}^2$ である。両者の吸着量は近い値である。このことから、PVLA がほぼ単分子層で吸着されるときに、肝細胞の接着におけるしきい値現象が発現するのではないかと推定している。

4 考 察

PVLA 皿に対する肝細胞の特異的かつ高い接着性は、肝細胞にあるガラクトース特異性レクチンによる認識・結合を介して発現するものと考えてきた^{5b)}。この特異的高接着性は、血清添加系で顕著に発現するが、血清無添加系でも認められる現象である。また PVLA 皿への接着は、PVLA を培養液に加えてあらかじめ肝細胞を前処理しておくとも阻害されるが、ガラクトース糖鎖末端をもつ化合物であってもガラクトース、ラクトースや VLA によっては阻害されないことは重要である。

ガラクトースを非還元性末端にもつ天然および合成のオリゴ糖や、ガラクトース残基を結合した半合成タンパク質、および天然由来のアシアロ糖タンパク質などを用いて、肝細胞に対する親和性の強さや肝細胞への取り込みが調べられた^{11)~16)}。枝分れ糖鎖のアンテナの数が増したり、多数の糖鎖がタンパク質に結合すると、親和性がいちじるしく高まる。つまりこれらの糖鎖認識反応においては、糖鎖密度が高いほど大きい効果をおよぼし強く分子認識されることが特徴として認められている。ラクトースや VLA は一本鎖のアンテナとみることができのに対して、PVLA 分子からはガラクトース糖鎖が多数突きでており、多官能性であるとともに高い糖鎖密度をもつといえる。そのために肝細胞は、培養皿に吸着した PVLA をも、溶液中の PVLA をも、強く認識し結合でき、細胞接着ならびにその阻害に有効にはたらくものと考えた。

Lee らは、各種のガラクトース糖鎖を含むオリゴ糖鎖を合成し、肝細胞やレクチンとの相互作用を調べるとともに^{12)~16)}、ガラクトース糖鎖を結合したアクリルアミド共重合体ゲルを調製し、その上で肝細胞の接着実験を行なって、多大の成果を得ている¹⁷⁾¹⁸⁾。Lee らの結果と本研究との比較から興味深い考察を引きだすことができる。両者で、培養皿表面の形状・性質が異なり、肝細胞接着の実験方法も異なるにもかかわらず、いくつかの共通点が認められる。(1) ガラクトース糖鎖を結合した高分子の上で特異的に接着する。(2) 固定した糖鎖の密度についてしきい値現象が観測された。(3) 接着には Ca^{2+} が不可欠であるが、

Fig. 4 Threshold response of hepatocyte adhesion to PVLA-coated dishes in the absence (○) and presence (●, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) of lactose

Serum-free Hanks' solution; 60 min pretreatment and 60 min cell incubation

Mg²⁺ を必要としない。しかし、ガラクトースおよびラクトースによる接着阻害効果が両者で異なっていることが注目される。Lee らの系¹⁸⁾では、遊離のガラクトースならびにラクトースをはじめとするガラクトース含有糖でも、肝細胞接着がほぼ完全に阻害された。本実験の細胞接着は、彼らと同量 (10 mmol・dm⁻³) のガラクトースやラクトースを添加しても阻害されなかったが、0.2 mmol・dm⁻³ (0.1 mg/ml) の PVLA によって阻害された。実験方法が異なるので比較には注意を要するが、本研究の単独重合体と Lee らの共重合体ではガラクトース糖鎖密度が違いうために、肝細胞との結合の強さが異なるのではないかと考えている。

5 結 語

肝臓は、数百年にわたる各種の物質代謝を行なうとともに、再生

能力をも備えた活発な臓器である。これを構成する肝細胞を、体外で長期間にわたって培養し、細胞機能を発現させることができれば、肝臓の治療や医薬開発などを行なう上で有益なバイオシミュレーターとして、肝臓機能を代行できる人工肝臓として、さらには有用タンパク質を生産できるバイオリアクターとしてなどの応用に発展する可能性を秘めている。しかし、肝細胞を体外に取り出すと、細胞としての機能を急速に失ない、培養することの困難な細胞であるので、肝細胞を培養するための改良・工夫がさかんに行なわれている。肝細胞が接着できる表面がまず必要であり、従来コラーゲンが唯一の適切な材料であった。PVLA は、オリゴ糖鎖を分子認識のマーカースとして応用した新しい型の培養材料といえよう。

Special Articles on Molecular Recognition and Its Application

Recognition of Lactose-Carrying Styrene Homopolymers by a Liver Cell and Its Application to Cell Culture

Kazukiyo KOBAYASHI*, Hiroshi SUMITOMO, Akira KOBAYASHI**
and Toshihiro AKAIKE*.*

*Faculty of Agriculture, Nagoya University; Chikusa-ku,
Nagoya-shi 464 Japan*

*** Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture
and Technology; Koganei-shi 184 Japan*

Liver cells (hepatocytes) have been cultured in Petri dishes whose surface was coated with several polystyrene derivatives having a pendant oligosaccharide (lactose, glucose, maltose, and maltotriose) residue in each repeating unit. It has been found that a lactose-carrying polystyrene (PVLA) is a useful surface material for hepatocyte culture. Highly specific adhesion of hepatocytes (92%) was attained in PVLA-coated dishes in serum-supplemented Williams' medium E. The hepatocyte adhesion required calcium ions but not magnesium ions. The adhesion to PVLA-coated dishes was effectively inhibited when hepatocytes were treated with PVLA molecules in medium prior to culture. However, additives such as galactose, lactose, a lactose-carrying styrene monomer, and a maltose-carrying styrene homopolymer did not serve as inhibitors. It is suggested that pendant galactose residues of a PVLA molecule function as a recognition determinant for hepatocytes. The galactose residues of PVLA are multiantennary and likely to be clustered, which is assumed to contribute to the effective recognition of a hepatocyte for PVLA.