[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 64, No. 2, pp. 145~150, 1990]

オリゴ糖鎖置換ポリスチレンへの肝細胞の接着

赤池敏宏, 真栄田 篤, 戸辺成四郎, 野本洋一,

小林一清*, 住友 宏*

(東京農工大学工学部, *名古屋大学農学部)

平成元年6月23日受理

Adhesion of Liver Cells to Oligosaccharide-Substituted Polystyrenes

Toshihiro AKAIKE, Atsushi MAEDA, Seishiro TOBE, Hirokazu NOMOTO,

Kazukiyo KOBAYASHI* and Hiroshi SUMITOMO*

*Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
Koganei, Tokyo 184*

**Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01*

Liver cells (hepatocytes) were cultured in Petri dishes whose surfaces were coated with polystyrene derivatives having a pendant oligosaccharide (lactose, melibiose, cellobiose, and maltose) in each repeating unit (the four polymers being abbreviated as PVLA, PVMeA, PVCA, and PVMA, respectively). Hepatocytes adhered effectively to PVLA and PVMeA, moderately to PVCA, and weakly to PVMA. Experiments on adhesion inhibition and temperature effect suggested that the interactions between polymers and hepatocytes decreased in the order of PVLA > PVMeA > PVCA > PVMA. The adhesion behavior is discussed on the basis of the recognition of oligosaccharides by hepatocytes. A large number of oligosaccharide residues protruded from these polymer chains; the recognition signals were multiantennary. We assume that β -galactose residues of PVLA interacted specifically with the asialoglycoprotein receptors on the cell surface of hepatocytes.

(Received June 23, 1989)

緒 言

肝臓は生体内において、代謝機能、排出機能、解毒機能、循環調節機能などの数多くの多様な機能を果たしている。機能発現の中心となるのは肝実質細胞（肝細胞）であるので、肝細胞を生体外で安定に培養し、長期間にわたって機能発現させるためのシステムを確立できれば、ハイブリッド型の人工肝臓や肝シミュレータなどの開発につながることが期待される⁽¹⁾。そのためには、細胞培養のための足場となる基質材料の果たす役割が大きく、細胞がまず基質材料上に接着する必要がある。接着に際して、細胞表面と基質材料表面との間に、分子認識を伴う生物特異的相互作用が働くことが必要であり、コラーゲンやフィブロネクチンなどのタンパク質が基質表面材料として活用されている^(2,3)。

筆者らは、細胞間の特異的相互作用を発現する信号と

して、オリゴ糖鎖に着目した。生体内のオリゴ糖鎖は、細胞表面にある糖タンパクや糖脂質の構成成分として、細胞膜から外側に突き出して、細胞の増殖、分化、老化、ガン化における細胞間の情報伝達に本質的な役割を演じていることが明らかにされつつある⁽⁴⁾。また、単純なオリゴ糖であっても、それに応じた特徴的な認識信号となることもわかっており、オリゴ糖を高分子に組み込んで分子設計することによって、細胞特異的な培養材料が開発できるものと考えた⁽⁵⁾。そこで、入手しやすいオリゴ糖から出発して、オリゴ糖置換スチレン誘導体を簡便な方法で合成し、そのラジカル単独重合を行って、オリゴ糖を側鎖に持つ重合体を合成した⁽⁶⁻⁸⁾。そのうち本報告で扱う重合体の構造単位を Fig. 1 に掲げてある。

すでに、ラクトースを側鎖に持つポリスチレン (PVLA と表示) を吸着させた培養皿に、ラット肝細胞が特異的によく接着するが、マルトース置換ポリスチレ

Fig. 1. The Structural Units of the Oligosaccharide-Substituted Styrene Homopolymers.

ン (PVMA) には肝細胞が接着しないことを報告した⁽⁹⁻¹⁵⁾。本研究では、セロビオースおよびメリビオースを原料として新たに合成した重合体 (それぞれ PVCA および PVMeA と表示), ならびにラクトースとセロビオースまたはマルトースとの共重合体 [Poly (VLA-co-VCA) および Poly (VLA-co-VMA)] も併用して, 肝細胞の接着挙動を調べた。

ラクトース (Gal β 1-4 Glc), メリビオース (Gal α 1-6 Glc), セロビオース (Glc β 1-4 Glc), およびマルトース (Glc α 1-4 Glc) の 4 種類の二糖はいずれも, 還元性末端がグルコース単位であることが共通点であるが, 非還元性末端の糖の種類 [ガラクトース (Gal) またはグルコース (Glc)] およびグリコシド結合の様式 (β -と α -アノマー型, および 1-4 と 1-6 結合型) が異なっている。

生体内では, β -ガラクトース末端を持つアシアロ糖タンパクが, 血液中から肝臓に取り込まれて, 分解されることが知られている⁽¹⁶⁾。肝細胞の細胞膜表面には, アシアロ糖タンパク質の β -D-ガラクトース末端を特異的に認識し, 細胞内に取り込むためのレセプターが存在することが明らかになっている。肝細胞によるアシアロ糖タンパク質の取り込み⁽¹⁷⁻²⁰⁾と比較しつつ, オリゴ糖置換ポリスチレンの糖鎖構造のわずかな違いが, 肝細胞の接着応答に及ぼす効果について考察を加えた。

実験方法

1. 重合体の合成^(6,8) オリゴ糖の還元性末端を次亜ヨウ素酸で酸化したあと, 中和してオリゴ糖ラクトンとし, メタノール中で α -ビニルベンジルアミンと加熱還流して, オリゴ糖置換スチレン誘導体を合成した。これらのモノマーの 60°C でのラジカル単独重合および共重合を, アゾビスイソブチロニトリルを開始剤としてジメチルスルホキシド中, またはベルオキシ二硫酸カリウムを開始剤として水中で行った。白色の生成物を水に溶解してメタノールに再沈澱させたのち, その水溶液をセルロースチューブに入れて 2 日以上透析した。濃縮・凍結乾燥を行って, 重合体を単離した。

2. 重合体の吸着による培養皿の表面改質⁽⁹⁻¹⁵⁾ 所定濃度 (0.1 mg/ml) の重合体水溶液 (1 ml) をポリスチレン製ペトリ皿 (Falcon 1008, 35 mm ϕ) に注入し, 10 分間静置して, 重合体を吸着させた。上澄液を除き, 培養液で 3 回すすいだのち, 風乾した。

3. ラット肝細胞の接着実験⁽⁹⁻¹⁵⁾ Seglen のコラゲナーゼ灌流法に準じて, 150~250 g のラットから肝細胞を単離し, Williams E 培地または Hanks 液を用いて希釈して, 3×10^6 cells/ml の肝細胞懸濁液を調製した。必要に応じて血清を 10% になるように加えた。細胞懸濁液 1.5 ml を培養皿に添加し, 5% 炭酸ガス培養器内に 37°C で静置して培養を行った。所定時間後, 接着し

Fig. 2. Adhesion of Hepatocytes to Polymer-Coated Dishes in Serum-Supplemented Williams' Medium E. ○, PVLA; ●, PVMeA; □, PVCA; ■, PVMA.

Fig. 3. Adhesion of Hepatocytes to Polymer-Coated Dishes in Serum-Free Williams' Medium E. ○, PVLA; ●, PVMeA; □, PVCA; ■, PVMA.

なかった細胞をすべて回収し、コールターカウンターを用いて細胞数を計数して、接着率を算出した。

重合体による接着阻害実験は、0.1 mg/ml の濃度になるように重合体を培養液に溶解し、これで肝細胞を1時間前処理したのち、重合体コート皿に移して、培養を1時間行って、接着率を求めた。

4°C での培養実験はクロマトグラフィチャンパーの中で行ったが、培地の pH の上昇を抑えるために、20 mM の HEPES 緩衝液を培地に加えた。

結 果

1. 重合体コート皿への肝細胞の初期接着

重合体を吸着させた培養皿に対する肝細胞の初期接着性を Fig. 2 および 3 に示す。血清添加系 (Fig. 2) においては、 β -D-ガラクトース糖鎖末端を持つ PVLA 皿へは高接着性であるが、 α -D-グルコース糖鎖末端を持つ PVMA 皿へはほとんど接着しないことは、既報⁽⁹⁻¹¹⁾のとおりである。さらに、 α -D-ガラクトース糖鎖末端を持つ PVMeA でも、PVLA に匹敵する高い接着性を発現することが明らかとなった。また、 β -D-グルコース糖鎖末端を持つ PVCA に対しても、ある程度の接着性を

□, CONTROL; ■, PVLA; ▨, PVMeA; ▩, PVCA; ▪, PVMA.

Fig. 4. Inhibition Effect of Polymer Solution on Hepatocyte-Adhesion to Polymer-Coated Dishes. Hepatocytes were treated with polymers in serum-free Williams' medium E for 1 hr, and then incubated in polymer-coated dishes for 1 hr.

示すことがわかった。

血清の存在しないとき (Fig. 3) には、PVCA と PVMA への接着性が上昇し、PVCA への接着率は、PVLA や PVMeA へのそれとほぼ同じレベルになった。

2. 溶液中の重合体による接着阻害効果

肝細胞接着に対する基質の糖鎖特異性をさらに解析するために、それぞれの重合体を 0.01% 含む Williams E 培養液 (無血清系) であらかじめ肝細胞を前処理しておき、その肝細胞懸濁液を用いて、各種の重合体コート皿への接着実験を行った。結果を Fig. 4 にまとめた。

PVLA 皿への接着は、肝細胞を PVLA で前処理したときには阻害されたが、それ以外の3種類の重合体で前処理しても影響をほとんど受けなかった。PVMeA 皿および PVCA 皿への接着はいずれも、PVLA, PVMeA, および PVCA によって阻害を受けたが、PVMA によっては阻害されなかった。PVMA 皿の場合には、もともと低い接着率であるので、阻害効果は顕著には現れないが、4種類のいずれの重合体によっても、接着が阻害されるようである。

一方、コラーゲン皿への肝細胞の接着は、PVLA をはじめどの重合体によっても阻害されないことは興味深い。このことは、PVLA 皿や PVMeA 皿への肝細胞の接着機構が、コラーゲン皿上での肝細胞膜表面のコラーゲンレセプターの関与する機構とは異なっていることの強力な証拠である。

3. アルブミンの添加効果

血清中には大量のアルブミンが含まれており、細胞と基質材料との相互作用に深く関与していることが知られている。そこで、血清の代わりにアルブミンを添加し

Fig. 5. Effect of Albumin Concentration on Hepatocyte Adhesion to Polymer-Coated Dishes. Incubated in serum-free Williams' medium E for 2 hr. O, PVLA; ■, PVMA.

て、肝細胞接着挙動を調べた (Fig. 5). 培地中に 1 mg/ml のアルブミンが存在すると、PVMA に対する肝細胞の接着性は完全に抑えられたのに対して、PVLA への接着性はほとんど変化しなかった。

10% の血清の添加は、3~5 mg/ml のアルブミンの添加に相当することから、血清添加系における PVMA に対する肝細胞の接着性の低下は、アルブミンによる効果であると推測している⁽¹³⁾。

4. 低温での肝細胞の接着挙動

培養温度を 37°C から 4°C に下げたときの初期接着率を血清無添加系と比較した (Fig. 6). PVLA 皿と PVMeA 皿の場合には、実験誤差の範囲内で差異は認められず、高い接着率を保ったままであったが、PVCA 皿および PVMA 皿への接着率は顕著に低下した。また図には示さなかったが、PVLA 皿であっても、培養温度を 0°C まで下げるともはや細胞接着が起こらなかった。

4°C での PVLA 皿と PVMeA 皿との細胞接着性の違いは、ガラクトースによる接着阻害効果に顕著に現れた。無血清系で 10 mM のガラクトースを用いて肝細胞を前処理しても、37°C における PVLA 皿への接着は阻害されないことは、すでに報告したが⁽¹¹⁾、4°C でも PVLA 皿への接着は阻害されなかった。それに対して、PVMeA 皿への肝細胞接着は 4°C で阻害された。

なお、4°C では、肝細胞のコラーゲン皿への接着は起こらないことを確認した。

5. カルシウムイオンの添加効果

肝細胞接着におけるカルシウムイオン濃度依存性について、血清無添加系で検討を加えた結果を Fig. 7 に掲げた。PVLA 皿への肝細胞の接着性は、0.1 mM のカルシ

Fig. 6. Temperature Dependence of Hepatocyte Adhesion to Polymer-Coated Dishes. Incubated in serum-free Williams' medium E for 1 day. □, 37°C; ■, 4°C.

Fig. 7. Effect of Calcium Ion Concentration on Hepatocyte Adhesion to Polymer-Coated Dishes. Incubated in serum-free Hanks' solution for 2 hr. O, PVLA; ●, PVMeA; □, PVCA; ■, PVMA.

ウムイオンが共存すれば、高接着率に達するのに対して、PVMeA 皿では約 0.3 mM のカルシウムが必要であった。PVCA 皿では、接着率が飽和に達するには、約 1.0 mM のカルシウムを必要とした。PVMA 皿では、カルシウムイオン濃度がかかなり高くなるまで肝細胞接着は進行しなかった。

アシアロ糖タンパク質レセプターは、カルシウムイオンによりコンホメーション変化を起こし活性化される。また、カルシウムイオン濃度の上昇とともに、細胞表面におけるレセプターの数が増加することも知られている⁽¹⁸⁾。オリゴ糖置換重合体に対する肝細胞接着のカルシウムイオン依存性がどの機構によるものかについては、さらに検討が必要である。

6. 共重合体コート皿への肝細胞の接着挙動

以上の実験に使用したのはいずれも、オリゴ糖置換スチレン誘導体モノマーのラジカル単独重合により合成したホモポリマー (単独重合体) であり、単純で明確な構造をもっている。本研究での高分子合成法の特徴は、2 種類のモノマーの共重合によって、糖鎖の組成がコントロールされたコポリマー (共重合体) が容易に調製でき

Fig. 8. Adhesion of Hepatocytes to Dishes Coated with Poly (VLA-co-VCA). Incubated in serum-supplemented Williams' medium E. Incubation time: Δ , 15 min; $\square$, 30 min; $\circ$, 60 min.

Fig. 9. Adhesion of Hepatocytes to Dishes Coated with Poly (VLA-co-VMA). Incubated in serum-supplemented Williams' Medium E. Incubation time: Δ , 15 min; $\square$, 30 min; $\circ$, 60 min.

ることである。そこで、ラクトースとマルトース型またはラクトースとセロビオース型の構造からなる共重合体 [Poly (VLA-co-VMA) および Poly (VLA-co-VCA)] を合成して、それらを基質材料として用いて血清添加系で肝細胞接着実験を行った。

Poly (VLA-co-VCA) では Fig. 8 のように、20% 以上の VLA 単位が含まれていると、実験誤差の範囲内で PVLA とほぼ同じ肝細胞接着性を発現した。少量の VLA 単位が含まれていると高接着性が発現されるこの特性は、Fig. 9 の Poly (VLA-co-VMA) ではさらに顕著である。すなわち、単独重合体である PVMA への接着がほとんど認められないにもかかわらず、25% の VLA 単位が挿入されると、高接着性になった。

考 察

生体外における肝細胞の接着実験において、 β -(1 $\rightarrow$

4)-ガラクトース鎖を持つ PVLA のみならず、 α -(1 $\rightarrow$ 6)-ガラクトース鎖を持つ PVMeA に対しても、高い接着性が認められた。また、接着率はやや低下するが β -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコース鎖を持つ PVCA にも接着することがわかり、 α -(1 $\rightarrow$ 4)-グルコース鎖の PVMA への接着性はさらに低下することも確認された。接着阻害実験および 4°C での接着実験も考慮すると、肝細胞と重合体との親和性の大きさは、PVLA > PVMeA > PVCA > PVMA の順である。

アシアロ糖タンパク質の肝細胞への取り込みにおいて、アシアロ糖タンパク質レセプターは、カルシウムイオンを必要とすること^(17,18)、4°C でも活性を保持していること⁽¹⁹⁾、さらにはコヒチンにより接着が阻害されること⁽²⁰⁾なども観察されている。これらはいずれも、PVLA 皿への肝細胞の接着挙動と類似しており、PVLA 皿への接着にはアシアロ糖タンパク質レセプターが関与しているという、従来からの推定⁽¹⁵⁾がより確実となった。

本研究の重合体は、親水-疎水型の両親媒性の構造単位からなり、しかも 1 本の高分子鎖に多数の糖鎖が結合している。そのために、水中ではコンパクトな糸まり状のコンホメーションをとり、疎水性の固体表面に吸着しやすいのであろう⁽⁶⁻¹³⁾。なお、どの重合体であれ、培養皿表面に同じ程度で十分に吸着されていると推定している。また、高分子表面には親水性の糖鎖が高密度で集合しやすくなることも推測される。糖鎖密度が高くなるほど、レセプターとの結合能が飛躍的に高まることはよく知られている⁽²¹⁾。実際に、オリゴ糖置換ポリスチレンとレクチンとの結合能は、対応するオリゴ糖のそれと比較して、著しく高いことも報告した⁽⁸⁾。

このような高密度糖鎖効果および高分子効果が、肝細胞の接着においても、有効に働いていると考えている。PVLA から多数突き出ている β -ガラクトース糖鎖が、アシアロ糖タンパク質レセプターと特異的に強く結合するために、高い接着性が発現するのであろう。

ある程度の接着性が観測された PVMeA および PVCA の場合には、アシアロ糖タンパク質レセプター以外のレセプターが関与している可能性もある。いずれのレセプターの関与であっても、高分子効果が働いて、相互作用が増幅して発現しているのではなかろうか。

PVLA の肝細胞培養材料としての数々の有用性については、すでに報告してきた。今回、非生理的な条件である 4°C という低温でも、肝細胞が PVLA 皿に特異的

に結合することがわかったので、低温で接着させたまま肝細胞を保存できる材料としても役立つであろう。

要 約

(1) ラクトース、メリビオース、セロビオース、およびマルトースを側鎖に持つ4種類のポリスチレン誘導体(それぞれの略称: PVLA, PVMeA, PVCA, およびPVMA)を合成し、これを培養基質としてラット肝細胞の接着挙動を調べた。

(2) 血清添加系および無添加系における初期接着、重合体による肝細胞の前処理の効果(接着阻害効果)、低温(4°C)での接着性、およびカルシウムイオン濃度効果などを調べた。肝細胞の接着の強さは、PVLA>PVMeA>PVCA>PVMAの順序となることがわかった。

(3) PVLA 皿には、4°Cの低温においても肝細胞が強く接着することが注目される。

(4) 血清およびアルブミンの添加効果および共重合体への初期接着性について、肝細胞の特異的接着の観点から考察を加えた。

(5) PVLA への肝細胞の接着挙動は、肝細胞によるアシアロ糖タンパク質の取り込みと類似しているので、細胞表面のアシアロ糖タンパク質レセプターが、接着においても特異的認識に関与しているものと推定した。

(6) 重合体の表面に高い密度で糖鎖が集合しているために、肝細胞の接着において特異的認識が有効に働くものと考えた。

- (1) 赤池敏宏, 戸辺成四郎: 細胞工学, **3**, 219 (1989).
- (2) R. C. Hughes and S. C. Stamatoglou: *J. Cell Sci.*, **8**, 273 (1987).
- (3) 中村敏一: 「初代培養肝細胞実験法」, 学会出版センター, 1987.
- (4) T. Feizi and R. A. Childs: *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 24 (1985).

- (5) 小林一清: 「バイオ・高分子研究の進歩」, 第3巻 バイオ・高分子機能デザインと高分子化学, 高分子学会 バイオ・高分子研究会編, 学会出版センター, 1989, p.141.
- (6) K. Kobayashi, H. Sumitomo and Y. Ina: *Polym. J.*, **17**, 567 (1985).
- (7) K. Kobayashi, H. Sumitomo and T. Itoigawa: *Macromolecules*, **20**, 96 (1987).
- (8) 小林一清, 住友 宏, 平手美式, 赤池敏宏: 高分子論文集, **45**, 919 (1988).
- (9) 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).
- (10) K. Kobayashi, H. Sumitomo, A. Kobayashi and T. Akaike: *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **7**, 645 (1986).
- (11) 小林一清, 住友 宏, 小林 明, 赤池敏宏: 日本化学会誌, **1987**, 575.
- (12) 赤池敏宏, 小林 明, 戸辺成四郎, 真栄田篤: 人工臓器, **17**, 227 (1988).
- (13) K. Kobayashi, H. Sumitomo, A. Kobayashi and T. Akaike: *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A 25**, 655 (1988).
- (14) T. Akaike, A. Kobayashi, K. Kobayashi and H. Sumitomo: *J. Bioactive Compatible Polym.*, **4**, 51 (1989).
- (15) T. Akaike, A. Kobayashi, K. Kobayashi and H. Sumitomo: *J. Biomaterials Sci., Polym. Ed.*, 印刷中.
- (16) G. Ashwell and J. Harford: *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 531 (1982).
- (17) R. Blomhoff and H. Tollenshaug and T. Berg: *J. Biol. Chem.*, **257**, 7456 (1982).
- (18) B. L. Clarke, J. A. Oka and P. H. Weigel: *J. Biol. Chem.*, **262**, 17384 (1987).
- (19) P. Weigel: *J. Cell Biol.*, **87**, 855 (1980).
- (20) S. O. Kolset, H. Tollenshaug and T. Berg: *Exp. Cell Res.*, **122**, 159 (1979).
- (21) M. R. Hardy, R. R. Townsend, S. M. Parkhurst and Y. C. Lee, *Biochemistry*, **24**, 22 (1985).