

細胞表面へのナノ薄膜形成による積層化組織のビルドアップ

阪大院工¹・21世紀COE² ○松崎典弥^{1,2}・門脇功治¹・明石 満^{1,2}

【緒言】 昨年、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立が報告され [1]、再生医療の飛躍的な加速が期待されている。iPS 細胞から分化誘導して得られた細胞による再生医療技術として細胞移植があげられるが、移植細胞の流出や壊死により組織への生着率が極端に低く、十分な治療効果を得ることは困難である。また、薬剤評価試験への応用も期待されているが、生体組織は複数種類の細胞で構成されており、細胞のみで生体組織と同じ応答結果を得ることは難しい。複数種類の細胞を組み合わせ、生体組織類似の構造と機能を持つ組織体を構築する細胞操作技術が確立できれば、再生医療や薬剤評価において有効である。近年、我々は、細胞の機能に重要な役割を果たしている細胞外マトリックス (ECM) に着目し、細胞表面にフィブロネクチン-ゼラチン薄膜をおよそ 6 nm 形成することで、細胞層間の接着足場を提供し、細胞を 1 層ずつ積層化できる手法を見出した [2]。本手法は、細胞の種類と積層位置を自在に制御できるため、新しい細胞操作技術として期待される (Figure 1)。本研究では、この手法を用いて血管類似の積層組織の構築と筋芽細胞の積層化を評価した。

【実験】 カバーガラスを 0.2 mg/mL の FN/トリス緩衝液 (50 mM, pH=7.4) に 37 °C で 15 分間浸漬することで表面に FN 下地膜を形成した。ヒト臍帯動脈血管平滑筋細胞 (UASMC) を 4×10^4 cell/cm² の細胞数で播種・接着させた後、0.2 mg/mL の FN/トリス緩衝液 (50 mM, pH=7.4) に 37 °C で 1 分間浸漬した。トリス緩衝液に 1 分間浸漬して洗浄した後、0.2 mg/mL の G/トリス緩衝液 (50 mM, pH=7.4) に 37 °C で 1 分間浸漬し、トリス緩衝液に浸漬して洗浄した。この過程を 7 回繰り返すことで、細胞表面へ FN-G 薄膜を 6.2 nm 形成した。その後、二層目の UASMC を同様の細胞数で播種・接着させた。薄膜形成と細胞播種を繰り返し、UASMC の 4 層構造を作製した後にヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を 6×10^4 cell/cm² の細胞数で接着させ、4 層の UASMC と 1 層の HUVEC で構成される 5 層構造を構築した。また、同様の手法でマウス C2C12 筋芽細胞の 5 層構造を形成した。

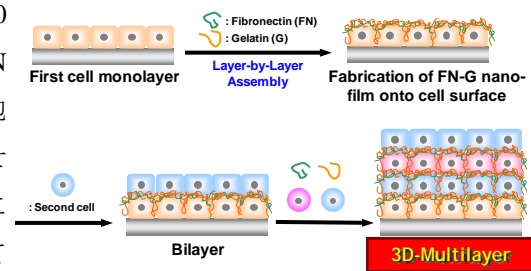


Figure 1. Fabrication of 3D-cellular multilayers by preparing FN-G nanofilms onto the cell surface.

左余白
25 mm右余白
25 mm

Build up a Multilayered Tissue by Fabrication of Nanofilms on Cell Surface

Michiya MATSUSAKI,^{1,2} Koji KADOWAKI,¹ and Mitsuru AKASHI^{1,2}

(¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita 565-0871, JAPAN, ²Center of Excellence (COE) Program for 21st Century in Osaka University)

Tel: +81-6-6879-7356, Fax: +81-6-6879-7359, E-mail: akashi@chem.eng.osaka-u.ac.jp

Key Word: tissue engineering / layer-by-layer / polymeric nanofilm / multilayered tissue

Abstract: The novel cell manipulation method by preparing nanometer-sized polymeric nanofilms on cell surface was developed to fabricate three dimensional-cellular multilayers consisting of desired cells. We found that the 6 nm of fibronectin-gelatin films on the surface of the first layer of cells by layer-by-layer method could provided a suitable cell adhesive surface that is similar to the natural extracellular matrix for the second layer of cells. The five-layered cellular multilayers composed of four-layered human smooth muscle cells and monolayer of human endothelial cells were successfully constructed as an artificial blood vessel. Furthermore, the five-layered mouse C2C12 myoblast as a skeletal muscle model was created. The methodology will be useful as a novel cell manipulation technology for tissue engineering.

約 1/3

【結果・考察】 Figure 2 に、マウス L929 線維芽細胞による積層数と共焦点レーザー顕微鏡観察による厚さの関係を示した。1層の L929 細胞の厚さはおよそ $6.3 \mu\text{m}$ であり、3層積層化後の厚さは $16.4 \mu\text{m}$ 、4層は $25.3 \mu\text{m}$ となり、理論的な厚さとよく一致することが確認された。つまり、本手法は、細胞を 1層ずつ積み上げることが可能な細胞操作技術であることが示された。

血管壁は、1層の血管内皮細胞（内膜）と数層の血管平滑筋細胞（中膜）、1層の線維芽細胞（外膜）で構成される。本研究では、4層の UASMC と 1層の HUVEC を積層することで、5層の血管類似積層組織の構築を試みた。Figure 3a~c に、4層の UASMC と 1層の HUVEC を積層して 3日間培養後のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、HUVEC の第 8 因子の免疫染色、IV 型コラーゲンの免疫染色写真を示した。HE 染色結果より、4層の UASMC と 1層の HUVEC が安定に存在し、5層構造を形成していることが明らかとなった。また、第 8 因子の免疫染色結果より、最外層に HUVEC が 1層存在している様子が確認された。さらに、IV 型コラーゲンの免疫染色より、各層の細胞が IV 型コラーゲンを豊富に産出し、基底膜を形成していることが示唆された。基底膜は筋細胞や上皮・内皮細胞周辺に存在し、細胞間の伝達や細胞の移動に対する障壁としても重要な役割を果たしている。本組織を 2週間培養後も安定に存在し、細胞層間の移動も確認されず各層構造を保っていたことから、基底膜が通常の生体組織と同様に機能していることが示唆された。上記積層組織の CD31 抗体による蛍光免疫染色の画像と走査型電子顕微鏡写真を Figure 3d と 3e に示した。組織表面を HUVEC が均一に覆い、密接に結合している様子が確認され、生体の血管壁に見られる HUVEC に類似した形態であることが明らかとなった。また、マウス C2C12 筋芽細胞の 5層構造も安定に形成できることが確認された。本手法は、新しい細胞操作技術として再生医療などへの応用が期待される。

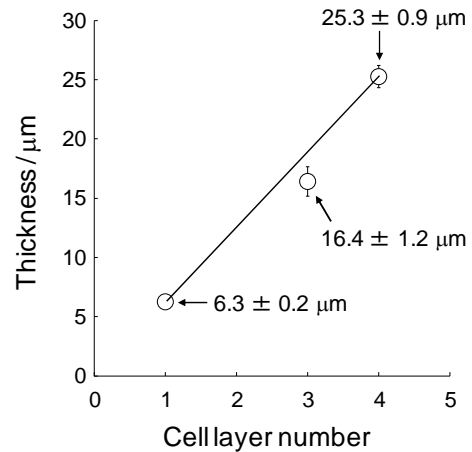
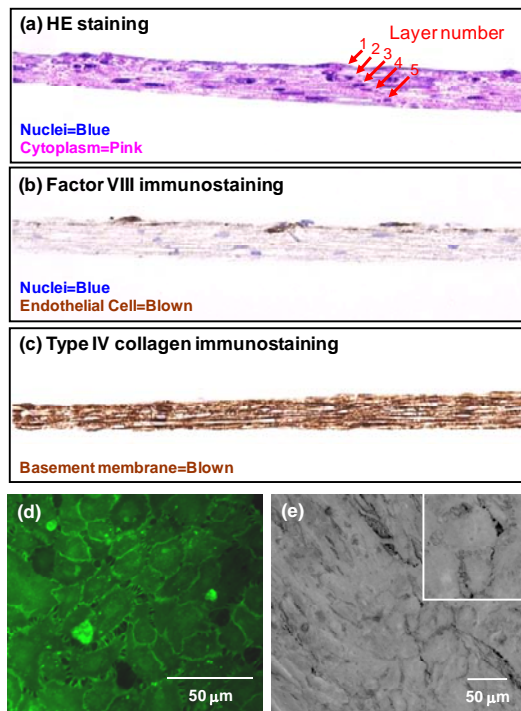


Figure 2. Relationship between mouse L929 fibroblast cell layer number and the mean thickness estimated from 3D-confocal laser scanning microscopy (CLSM).

左余白
25 mm



右余白
25 mm

Figure 3. Histological evaluation of 5-layered cellular multilayers composed of 4-layered UASMC and monolayer of HUVEC like a blood vessel by HE staining (a) and factor VIII (b) and type IV collagen (c) immunostaining. Fluorescence CD31 immunostaining (a) and SEM (b) images of the 5-layered cellular multilayers after 1 week and 3 days of incubation, respectively.

【謝辞】 本研究の一部は NEDO 産業技術研究助成事業（06B44017a）により実施された。

[1] Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. *Cell* **2007**, *131*, 861-872.

[2] Matsusaki, M.; Kadowaki, K.; Nakahara, Y.; Akashi, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4689-4692.