

氏名 岡島 周平

1. 緒言

近年、バイオリアクターやバイオ人工臓器といった、細胞と人工材料を組み合わせ、高度な生体機能を模倣しようとする、細胞集積型材料が注目されている。バイオテクノロジーの発達によって、材料側から細胞を制御しようという試みがなされている。しかし、現在までの材料は、予め、細胞がある機能を発現するように、予め材料表面に特定のポリマーを修飾し、一定の機能を誘導するようにシステムを組んでおくものが殆どであった。また、刺激応答性材料を用い、特定の期間だけ外部刺激によって機能が発現される材料も開発されてきた。とは言え、このような材料は、未だ生体機能を再現しているとは言い難いものばかりである。

本研究では、細胞があるシグナルを発したとき、その情報を材料が認識し、材料が細胞機能を制御する、細胞と材料が協調的に働く新しいシステムを開発することを目的とした。生体内では、常にホメオスタシス（恒常性）が保たれており、何か異常が起きたとき細胞はシグナルを放出することによって、次のリアクションが起こり、系内を元の状態に修復しようとする。本博士論文は、細胞死に注目し、細胞と材料が協調的に働く新規なシステムを構築した。細胞集積型材料は、生体内と異なり新陳代謝が不可能なため、細胞死を起こすと、外に漏れ出した細胞質や酵素が周辺に傷害を及ぼし、組織レベルの炎症が起きて長期使用が困難となる。そこで、本研究では膜上に細胞を培養し、細胞死が起きた場合、細胞死というシグナルを膜界面が認識することによって、材料が協調的に死細胞に作用し、選択的に炎症部を排除する新陳代謝可能なシステムを考えた。排除された空間は、細胞が増殖することによって自己修復する、自己修復型細胞集積材料システムである。

本研究では、Fig.1 に示すように、特定イオンに応答する細胞シグナル認識ポリマーを固定した材料表面に細胞の培養を行う。この細胞シグナル認識ポリマーは、N-isopropylacrylamide (NIPAM) およびクラウンエーテルをペンダントとして持つ Benzo-18-Crown-6-acrylamide (BCAm) モノマーの共重合鎖である。NIPAM は、32°C に相転移温度(LCST)を持ち、その前後で親・疎水性に変化することが知られている。また、クラウン環にカリウムなどのイオンが捕捉されると親水性が増すので、相転移温度が高温側にシフトする。そのため、相転移温度シフト範囲である、

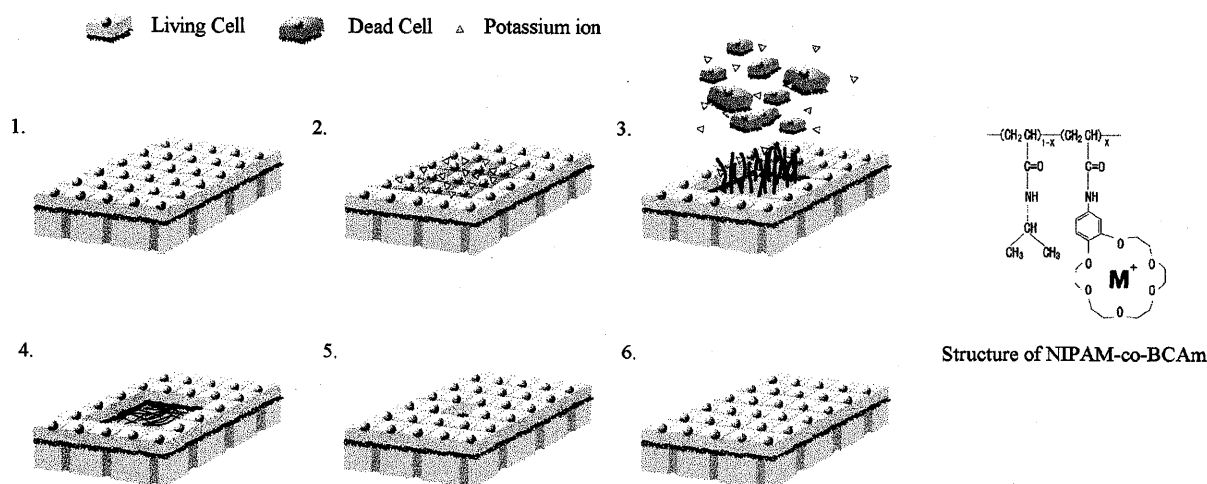


Fig.1 自己修復型細胞培養材料システムの提案

生体が活動する 37°C 付近で用いると、クラウン環に特定のイオンが捕捉されたときのみ NIPAM が親水性になり、膨潤が起きる。一方、細胞が死滅すると、恒常性が維持できなくなるために、細胞内容物の流出が起きる。通常、細胞内部でのカリウムイオン濃度は 140mM であるが、細胞外では 5mM である。しかし、細胞死が起きると細胞膜が破壊され、カリウムイオンの流出が起きる。さらに、細胞は、培養温度 37°C から NIPAM の LCST 以下に温度変化を与えたとき、NIPAM 固定表面から脱着することが知られている。これは、温度を LCST 以下に下げると、表面が親水性になり細胞の接着しにくい表面に変化し、細胞接着の足場を奪うことで脱着すると説明されている。そこで、細胞死が起きると、膜界面が死細胞から流出されるカリウムイオンを認識し、NIPAM が親水性となり膨潤することで死細胞の脱着が起きると考えられる。これにより、選択的に死細胞が脱着すると考えた。さらに、死細胞脱着後はカリウムイオンが拡散し NIPAM 鎖が元の収縮した状態に戻るため、周辺の生細胞が増殖することで元の状態に再生することが可能であると考えた。

自己修復型細胞培養材料システムの開発のため、まず、細胞認識材料上に細胞を培養し、温度変化なしでカリウムイオンシグナルを人工的に添加することで生細胞が脱着可能か確認を行った。その後、実際に紫外線によって細胞死を誘導し、死細胞が脱着するか確認を行った。さらに、死細胞脱着後、周辺際生細胞の増殖によって、元の状態に自己修復するか確認を行った。

2. 実験

細胞シグナル認識材料の作製

膜基材は多孔性ポリエチレン膜及びフィルムを用いた。基材への NIPAM の重合には、モノマー溶液 5wt%、プラズマグラフト重合を用い、プラズマを 30W、1 分間照射し重合を行った。基材への NIPAM-co-BCAm の重合には、モノマー溶液 5% (NIPAM:BCAm =85:15) で、同様の条件でプラズマを照射した。照射後 1 分間空気にさらした後に重合を行った。

細胞培養

作製した膜またはフィルムと未処理の膜またはフィルムを、12 穴プレートに貼り付けて EOG(エチレンオキシドガス) 滅菌を行った。実験に使用する細胞としては、A549 を選んだ。播種後、37°C、5%CO₂ インキュベータ中で培養を行った。

生細胞脱着実験

各膜に培養した細胞に 100mM カリウムイオンまたはナトリウムイオンを含有する培地を添加した。その後、AP assay にて脱着率を求めた。

死細胞脱着実験

超高圧水銀ランプにて、細胞への紫外線照射を行った。脱着率を求めるために各膜全体に紫外線を照射し、1 日後に脱着細胞数を測定した。生死細胞の数をトリパンブルー染色を用いて、血球計算盤にて測定した。

細胞再生実験

各フィルム上に培養した細胞に 3 分間、スポット的に紫外線を照射し、部分的に細胞死を誘導した。その後、1 日おきに培地交換を続けた。各フィルム上に培養した細胞の様子を、位相差顕微鏡

を用い、ホットプレート使用し培養液を 37°C に保ちながら観察・写真撮影を行った。また、回収した培地から炎症性サイトカインの量を測定した。

3. 結果

生細胞脱着実験

Fig.2 に示すように、カリウムイオンを添加したところ、PE-g-NIPAM-co-BCAm 膜のみから 8 割近い細胞の脱着が確認された。NIPAM のみ、また未処理膜からは細胞は殆ど脱着しなかった。カリウムイオンを添加すると、この膜のクラウン環がカリウムイオンを捕捉し、親水性が増すため、LCST が高温側にシフトし、細胞が接着しにくい表面に変化し、細胞脱着が起きたと考えられる。また、ナトリウムイオンを添加した結果、どの膜からも細胞は脱着しなかった。ナトリウムイオンは、本実験で用いたクラウン環にはサイズがフィットしないため、細胞脱着が起きなかったと考えられる。

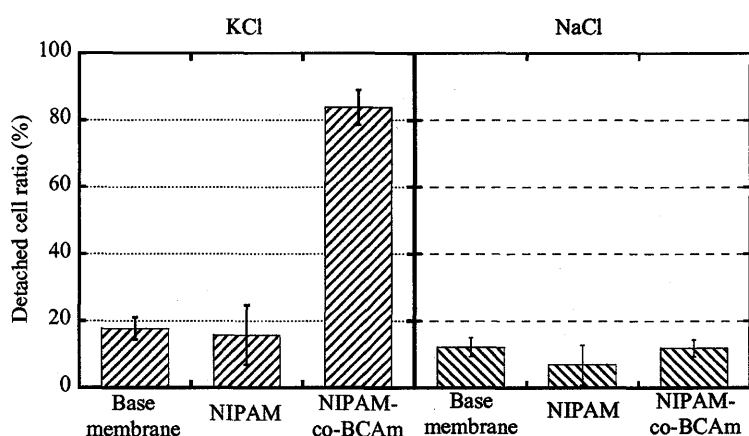


Fig.2 様々なシグナルによる生細胞脱着実験

死細胞脱着実験

紫外線を各膜全体に照射して細胞死を誘導し、脱着死細胞率を測定した。その結果、Fig.3 に示すように PE-g-NIPAM-co-BCAm 膜から選択的に、死細胞が脱着した。細胞死を起こすことにより、細胞が貯えられていたカリウムイオンが放出され、PE-g-NIPAM-co-BCAm 膜が膨潤し、死細胞が選択的に脱着したものと考えられる。NIPAM 膜は細胞死のシグナルであるカリウムイオンを認識できないため、死細胞は選択的に脱着できない。

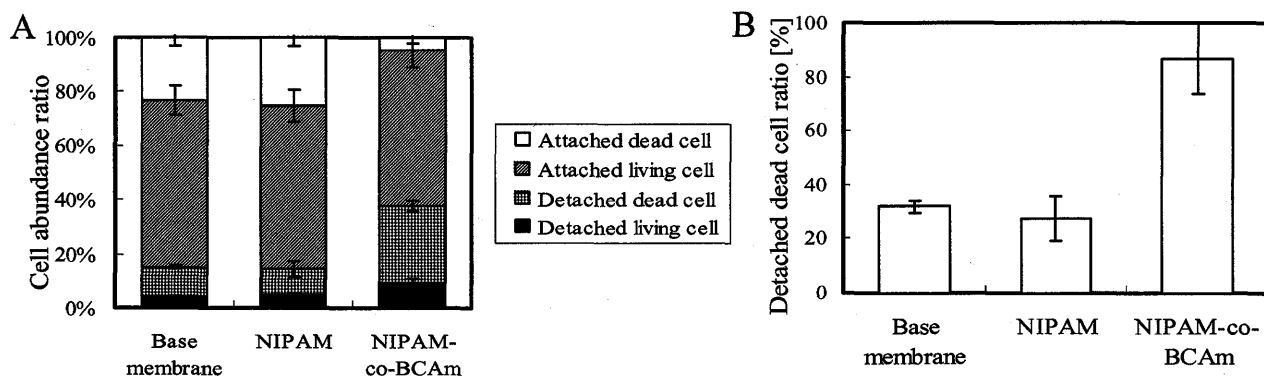


Fig.3 紫外線照射による A:死細胞脱着実験の細胞存在比、B:死細胞脱着率

細胞再生実験

紫外線を部分的に照射し、局所的な細胞死を誘導した。その後の再生現象について考察を行った。PE film, PE-g-NIPAM film, PE-g-NIPAM-co-BCAm film 上に confluent に達するまで培養した細胞に、細胞死を誘導した。位相差顕微鏡下の結果を Fig.4 に示す。30 時間経過すると、PE-g-NIPAM-co-BCAm film 上の細胞は殆ど脱着していた。それに対し、PE-g-NIPAM film 上の細胞は基材上にへばり付き、接着している様子が観察される。3 日間経過すると、PE-g-NIPAM-co-BCAm film 上の細胞は殆ど除去されていたのに対し、NIPAM フィルム上では、まだ接着している細胞が観察された。その後、PE-g-NIPAM-co-BCAm film では再生が始まり、10 日経過するとほぼ完全に修復した。それに対し、PE-g-NIPAM film では完全に再生するまでに、その倍以上の日数を要した。10 日目の低倍率で撮影した写真を見ると、その様子が分かる。

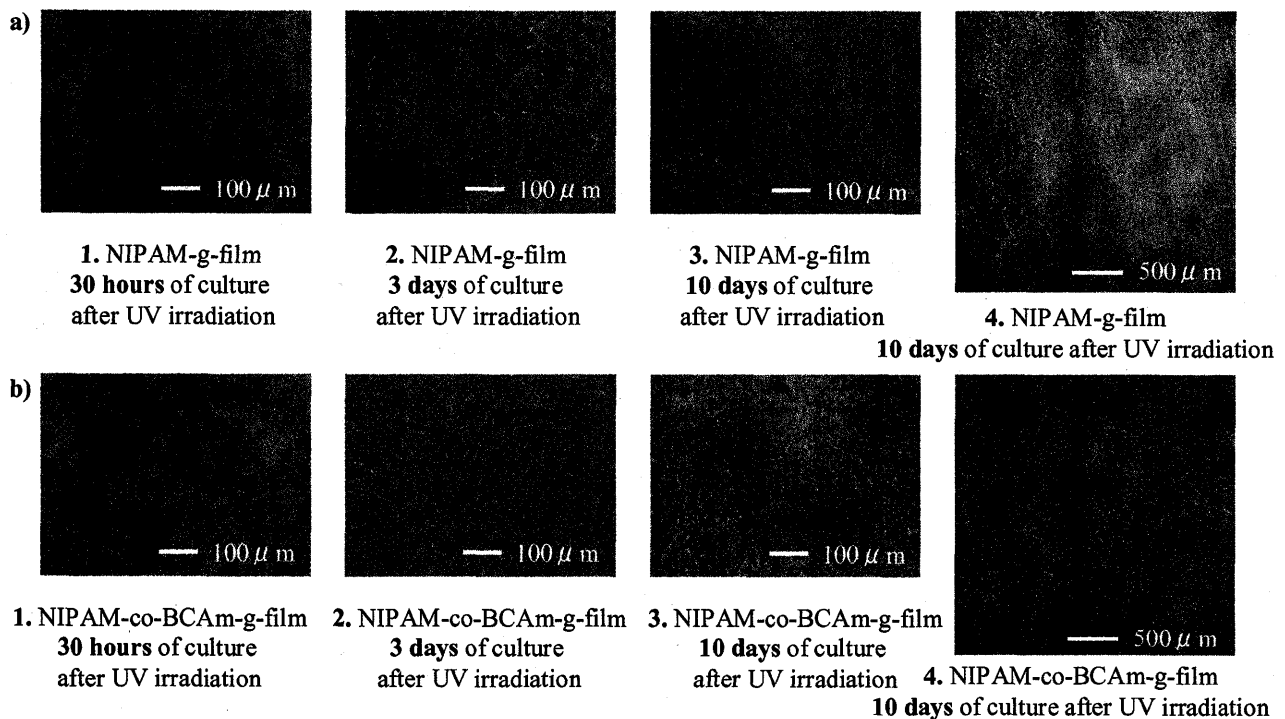


Fig.4 細胞再生の様子

また、再生中の炎症状態を知るために、炎症物質の測定を行った。炎症性サイトカインでも、組織の外傷を与えたときに、炎症の指針として測定されている、IL-6 の放出量について検討を行った。この実験では、炎症の影響を増幅させるため紫外線照射面積と数を増やした。測定結果を Fig.5 に示す。PE-g-NIPAM 膜では高濃度の IL-6 が検出され、炎症が広がったと考えられる。IL-6 は炎症や組織損傷に応答する急性反応の誘導因子であり、細胞の増殖機能を制御するため、NIPAM では細胞の再生が抑制される一因であったと考えられる。それに対し、PE-g-NIPAM-BCAm 膜では、死細胞が素早く除去され、周辺の細胞が炎症を起こすことなく、素早い再生が起きたものと考えられる。

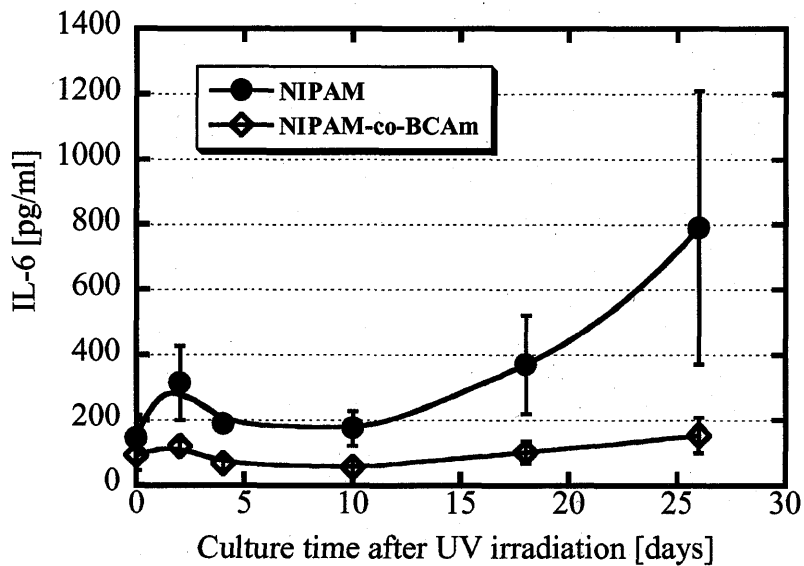


Fig.5 炎症性サイトカイン IL-6 の放出量

4. 結言

本研究では、細胞と材料が協調的に働く新しいシステムを開発することに成功した。死細胞から発せられるシグナルによって、材料が応答し、死細胞を選択的に脱着し、周辺細胞の増殖によって、組織が再生する系を提案した。細胞シグナル認識膜は、カリウムイオンをシグナルとして添加することで、生細胞の接着・脱着を制御できることを明らかにした。さらに、細胞シグナル認識膜を用いることで材料が細胞自身のシグナルに応答して、死細胞を脱着出来ることが分かった。局所的な細胞死を誘導すると、炎症を防ぎ、組織の修復速度は優位に速まることが分かった。これにより細胞シグナル認識膜は新陳代謝可能材料として有用であることが分かった。