

血管内皮細胞のアクチン骨格に与えるカーボンナノチューブ複合材料の影響

伊藤一志¹, 横尾正樹²¹ 秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科² 秋田県立大学生物資源科学学部アグリビジネス学科

これまでに著者らはカーボンナノチューブ (CNT) /ポリジメチルシロキサン (PDMS) 複合材料 (CNT 複合材料) を用いた細胞培養基質を提案した。しかしながら, CNT 複合材料が細胞形状および機能に及ぼす影響は十分に明らかになっていない。本研究では, CNT の濃度が異なる CNT 複合材料を作製した後, 血管内皮細胞を 24 時間培養した。その後, 細胞形状およびアクチンフィラメントの分布を蛍光顕微鏡により観察し, CNT 複合材料がアクチンフィラメントの分布に及ぼす影響を検討した。その結果, 複合材料表面における CNT の濃度が高くなるに伴い, 培養した血管内皮細胞はアクチンストレスファイバを発達する傾向であった。また, ガラス基質および PDMS に比べて, CNT 複合材料に培養した血管内皮細胞は葉状仮足の形成が観察された。さらに, CNT 複合材料への細胞接着に及ぼすインテグリンファミリーを検討した結果, CNT 複合材料への細胞接着には, ガラス基質とは異なり, フィブロネクチンレセプターであるインテグリンが大きく関与していない可能性が示唆された。

キーワード: カーボンナノチューブ, ポリジメチルシロキサン, 細胞培養基質, 血管内皮細胞, アクチンフィラメント, インテグリン

生体内の細胞は周囲の環境を認知して, その形状および機能を調整しており, それらの現象は培養細胞においても観察されている。例えば, 血管内皮細胞に血流を模したせん断力を負荷した場合, 流れ方向に伸張することが報告されている (Peter, et al., (1986))。また, 接着細胞は足場となる基質の相違によっても, 形状および機能を変化するため, 材料表面の微細形状および硬さを調整することにより, 細胞機能および細胞塊の形成を制御する取り組みも報告されている (Dongyuan, et al., (2014), Youyun, et al., (2011))。

著者らはカーボンナノチューブ (CNT) /ポリジメチルシロキサン (PDMS) 複合材料 (CNT 複合材料) を用いた細胞培養基質をこれまでに提案した。CNT/PDMS 複合材料は母材である PDMS の表面に CNT が塗布された複合材料であり, 複合材料表面には CNT の網目構造が形成されている。なお, PDMS

は光透過性に優れ, 成形の容易さなどの理由から, マイクロデバイスの材料として用いられている (Min, et al., (2006))。CNT/PDMS 複合材料を共存培養系におけるマウス初期胚の培養基質に適用した結果, CNT 複合材料を用いた発生培養ではマウス初期胚の品質が向上することをこれまでに報告した (伊藤と横尾, (2012))。さらに, ウシ初期胚においても同様に適用した結果, CNT 複合材料基質の適用が有効であることが分かった (横尾, 伊藤, 小林 (2015))。しかしながら, 細胞形状および機能に及ぼす CNT 複合材料の影響およびその機構は十分に明らかになっていない。

細胞骨格であるアクチンフィラメントはアクチンモノマーが重合した繊維状構造体である。さらにアクチンフィラメントはアクチン結合タンパク質と結合して高次構造を形成することが知られており, アクチンストレスファイバならびに葉状仮足, 糸状仮

足などを形成する。それらのアクチンフィラメントの組織化は、細胞の形状および移動などに深く関与している (Pollard & Borisy (2003))。さらに、アクチンストレスファイバには張力が生じており、その張力が細胞機能に寄与していることが報告されている (Peyton & Putnam (2005))。そのため、アクチンフィラメントの評価は細胞生理を調べるうえで重要であるとされている。

また、接着タンパク質であるインテグリンファミリーは細胞と基質を仲介する重要な役割を担っているだけでなく、細胞内シグナル経路の活性にも関与しているため、培養基質によって異なる細胞形状および機能はインテグリンファミリーの影響による可能性がある。なお、インテグリンインテグリンファミリーは多種のインテグリンから構成されている。以上から、本研究では CNT の濃度が異なる CNT 複合材料基質を作製した後、血管内皮細胞を培養して、細胞形状およびアクチンフィラメントの分布を観察することにより、CNT 複合材料基質がアクチンフィラメントの分布に及ぼす影響を検討する。さらに血管内皮細胞のフィブロネクチンレセプターであるインテグリンの結合を阻害して、CNT 複合材料基質における血管内皮細胞の細胞接着性を検討する。

実験方法

CNT 複合材料の作製と評価

本実験で使用する CNT 複合材料を図 1 に示す。CNT 複合材料は PDMS の表面に沿って CNT の網目構造が形成された複合材料である。複合材料の作製方法は、まず PDMS (シルポット 184, 東レ・ダウコーニング) および硬化剤を 10:1 の重量比で混合後、培養用ウェルプレート (住友ベークライト) の各ウェルに流し込み、静置した。その後、恒温槽で 5 時間加熱して、PDMS を硬化した。PDMS の表面に CNT の網目構造を形成するため、名城カーボン社製の単層 CNT エタノール分散液を PDMS 表面に塗布して乾燥した。本実験では、蒸留水で表面を洗浄した CNT 複合材料を用いた。作製した CNT 複合材料の表面における CNT の濃度はそれぞれ 25 ng/mm^2 および 50 ng/mm^2 である。CNT 複合材料の表面性状は、

非接触三次元表面形状測定機 (New view 600, Zygo) を用いて評価した。

細胞培養および阻害剤の添加

培養用ウェルプレートの各ウェル底面にカバーガラス (24 mm×24 mm) (松浪硝子工業) を置いた後、切り出した CNT 複合材料をカバーガラスに接着した。紫外線滅菌後、リン酸緩衝液で容器を洗浄して、継代数 4 から 7 の正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Lonza) を播種した。培養培地には、2%ウシ胎児血清が含まれる EBM-2 培地 (Lonza) を用いた。その後、温度 37°C 、5% CO_2 -95%Air の環境である CO_2 インキュベータで培養した。また、カバーガラスおよび PDMS を対照の培養基質とした。

インテグリンの阻害実験では、阻害剤として、選定した Anti-Human Fibronectin Monoclonal (Clone FN30-8) (タカラバイオ) を阻害剤毎に 1 および $0.1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で培地に添加し培養した。

アクチンフィラメントの観察および細胞数の計測

アクチンフィラメントの観察では、まず、各ウェルにおける EBM-2 培地を取り除き、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬) を用いて血管内皮細胞を 20 分間固定した。0.1%Triton-X 100 で 3 分間処理後、アクチンフィラメントを染色するため、Alexa flour 488-conjugated phalloidin (Molecular Probes) を試料に添加して 20 分間静置した。さらに SlowFade Gold antifade reagent (Invitrogen) を添加して細胞核を染色した。その後、60 倍の対物レンズを設置した共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) を用いて、各基質に培養した血管内皮細胞の画像を取得した。

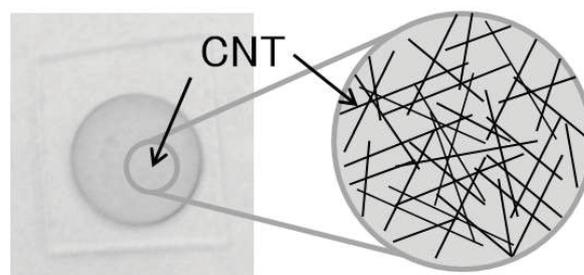


図 1 CNT 複合材料

インテグリン阻害剤を添加した効果は培養後の血管内皮細胞数を評価して判断した。特定のインテグリンを介して細胞が培養基質と接着した場合、本実験のようなインテグリンの結合阻害は、細胞接着の抑制を引き起こすと予想される。細胞数の計測は10倍の対物レンズを設置した共焦点レーザー顕微鏡を用いて、各培養基質3か所の画像を取得した。画像1枚あたりの観察面積は1.72 mm²である。その後、取得した画像から細胞核の平均数を細胞数として評価した。

実験結果および考察

CNT 複合材料の表面に形成される網目構造を検討するため、各基質の算術表面粗さ Ra を計測した。表1に各基質の Ra を示す。Ra は材料表面の凹凸が大きくなるに伴い Ra は大きくなる。ガラス基質および PDMS における Ra は、0.5 nm および 1.3 nm であった。CNT の濃度が 25 ng/mm² および 50 ng/mm² である各複合材料基質の Ra はそれぞれ 31.7 nm および 58.8 nm であった。CNT 複合材料基質の Ra は CNT の濃度が高くなるに伴い増加しており、高い濃度では CNT の密な網目構造が形成されていると考えられる。

図2に各基質に24時間培養した血管内皮細胞におけるアクチンフィラメントの蛍光画像を示す。細胞内部の白色繊維がアクチンストレスファイバである。ガラス基質に24時間培養した血管内皮細胞は、発達したアクチンストレスファイバが形成されていることが分かる (a)。一方、柔軟な PDMS 基質に培養した血管内皮細胞は、発達したアクチンストレスファイバが見られなかった (b)。また、ガラス基質に比べて、PDMS 基質では細胞の面積が低下する傾向であった。これまでに細胞は硬い基質に比べて、柔軟な基質では伸張の面積が低下することが報告されている (Peyton & Putnam (2005))。したがって、上述の傾向はこれまでの知見と一致するものである。

各 CNT 複合材料基質に培養した血管内皮細胞は、CNT の密度が高いほどアクチンストレスファイバを発達する傾向であった (c, d)。アクチンストレスファイバの発達には Rho および Rho-kinase の活性化

表1 ガラスならびにPDMS, CNT 複合材料基質の

	表面粗さRa			
	Glass	PDMS	CNT 25 ng/mm ²	CNT 50 ng/mm ²
Ra (nm)	0.5	1.3	31.7	58.8

が関与していることが指摘されており ((Peyton & Putnam (2005))), CNT 複合材料基質に培養した血管内皮細胞は CNT の濃度に伴い Rho を活性化している可能性がある。また、ガラス基質および PDMS に比べて、各 CNT 複合材に培養した血管内皮細胞は、葉状仮足を形成する様子が観察された (c, d; 矢印)。葉状仮足は細胞遊走において組織化されるアクチンフィラメントの高次構造である。そのため、CNT 複合材料基質に培養した血管内皮細胞は細胞遊走性が高くなっていることが考えられる。また、葉状仮足の形成には、Rac の活性化が必要であることが知られている。このことから、各培養基質に比べて、CNT 複合材料基質の血管内皮細胞は Rac を活性化している可能性がある。

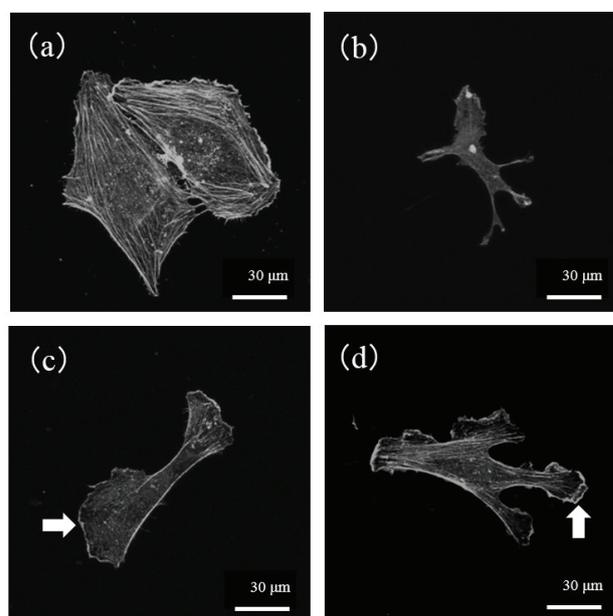


図2 各基質に培養した血管内皮細胞におけるアクチンフィラメントの蛍光染色画像 (a) ガラス, (b) PDMS, (c) CNT 25 ng/mm² (d) CNT 50 ng/mm²

図3にフィブロネクチンレセプターであるインテグリンの結合を阻害して培養した血管内皮細胞の細胞数を示す。ガラス基質に培養した血管内皮細胞は、阻害剤の添加濃度が高くなるに伴い平均細胞数は減少しており、添加濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ では、添加しない場合に比べて有意な差が確認された。一方、PDMS および CNT 複合材料基質で培養した血管内皮細胞では、阻害剤を添加した影響はほとんど見られなかった。このことから、血管内皮細胞における CNT 複合材料への細胞接着には、フィブロネクチンレセプターであるインテグリンの結合は大きく関与しておらず、ガラス基質に培養した場合と比べて異なる接着タンパク質が関与している可能性がある。

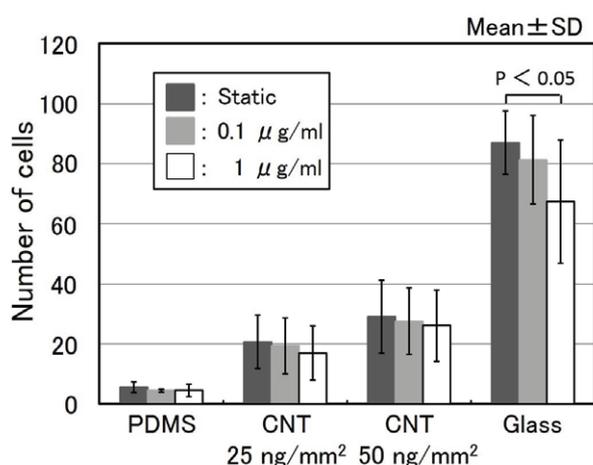


図3 ガラスならびに PDMS, CNT 複合材料基質に培養した血管内皮細胞の数

結 言

本研究では、CNT の濃度が異なる CNT 複合材料基質に血管内皮細胞を培養して、アクチンフィラメントの分布を観察した。その結果、CNT の濃度が高くなるに伴い、血管内皮細胞はアクチンストレスファイバを発達する傾向であった。また、ガラスおよび PDMS 基質に比べて、CNT 複合材料基質に培養した血管内皮細胞では、葉状仮足を形成する様子が観察された。さらに、CNT 複合材料基質への細胞接着に及ぼすインテグリンファミリーを検討した。その結果、血管内皮細胞における複合材料基質への細胞接着には、フィブロネクチンレセプターであるイン

テグリンファミリーは大きく関与していない可能性が示唆された。このことからガラス基質に培養した場合と比べて異なる接着タンパク質が関与している可能性がある。

文 献

- 伊藤一志, 横尾正樹 (2012). 「細胞培養基材, 培養容器, 及び細胞培養基材の製造方法」, 特願 2012-165354, 出願人: 公立大学法人秋田県立大学
- Dongyuan, L., Chunhua, L., Chen, Z., Zhan L., & Mian, L., (2014). Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography, *Biomaterials*, 35(13), 3945-3955.
- Peter, F. D., Andrea, R., Ethel, J. Gordon, C., Forbes, D., Jr., & Michael, A. G. Jr., (1986). Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 2114-2117.
- Peyton, S. R. & Putnam, A. J., (2005). Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J. Cell. Physiol.*, 204(1), 198-209.
- Pollard, T. D. & Borisy, G. G., (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112(4), 453-465.
- Min, C. P., Jae, Y. H., Keon, W. K., Sang-Hyun, P. & Kaho, Y. S., (2006). Pumpless, selective docking of yeast cells inside a microfluidic channel induced by receding meniscus. *Lab. Chip.*, 6(8), 988-994.
- Youyun, L., Jaehyun, J., Ross, J., DeVolder, Chaenyung C., Fei W., Yen W. T., & Hyunjoon K., (2011). A cell-instructive hydrogel to regulate malignancy of 3D tumor spheroids with matrix rigidity, *Biomaterials*, 32(35), 9308-9315.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

Effect of CNT/PDMS substrate on actin organization of HUVECs

Kazushi Ito¹, Masaki Yokoo²

¹ *Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Faculty of System Science and Technology, Akita Prefectural University*

² *Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University*

In this study, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured on substrates composed of carbon nanotube (CNT)/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) composites. The CNT/PDMS composites have a random network of CNTs on a PDMS surface. For HUVECs, actin stress fibers on the substrate increased with increasing CNT concentration after the cells were cultured for 48 h. In addition, HUVECs on CNT/PDMS substrates tended to form lamellipodia, which play an important role in cell migration, compared with HUVECs cultured on glass or PDMS substrates. Moreover, to determine the interaction between the integrin family and CNT/PDMS composites, we used fibronectin receptor inhibitor to culture the cells. The reagent treatment inhibited the adhesion of HUVECs on glass substrates but exerted less effect on CNT/PDMS substrates. The results indicated that the HUVEC adhesion mechanisms on glass and CNT/PDMS substrates differ.

Keywords: carbon nanotube, Poly(dimethylsiloxane) , culture substrate, endothelial cell, actin filament, integrin