

カーボンナノチューブ複合材の細胞培養シートとしての特性評価

横尾正樹¹, 伊藤謙¹, 佐藤勝祥¹, 伊藤一志²¹ 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科² 秋田県立大学システム科学技術学部機械工学科

我々はこれまでに、体外受精卵の培養用としてカーボンナノチューブを使用した新規細胞培養基質材（CNT 複合材）を開発している。本研究では CHO 細胞を使用した細胞培養試験を実施し、CNT 複合材の細胞培養シートとしての特性について評価することを目的とした。単層 CNT を使用した細胞培養シート上で CHO 細胞を培養すると、対照区としたコラーゲンコートよりも CHO 細胞の細胞接着性、細胞増殖性が促進されることが明らかとなった。また、培養時の CHO 細胞の形態は球形を示しており、CNT 複合材は一般的な細胞培養とは異なる細胞接着特性を有することが示唆された。さらに、DNA マイクロアレイ解析では、コラーゲンコートと比較して、CNT 複合材で培養した CHO 細胞では 478 個の遺伝子に発現レベルで有意な変化が認められ、それらの遺伝子群は細胞接着や細胞外マトリックス受容体との相互作用に関連することが明らかとなった。これらの結果から、CNT 複合材細胞培養シートは細胞増殖を促進する効果があり、その効果には特殊な細胞接着特性が関連している可能性が示唆された。

キーワード：カーボンナノチューブ、細胞培養デバイス、CHO 細胞、DNA マイクロアレイ

体外受精卵移植技術とは、体外培養環境下で受精・発生させて受精卵を生産し、受精卵に非外科的に移植して産子を得る技術である。最近では、乳牛を仮腹にして高級和牛子牛を低コストで効率よく生産する技術として、大きな期待が寄せられている。

体内で受精させた受精卵を受精卵へ移植する体内受精卵移植技術の受胎率は、ここ 10 年間以上、約 50% を維持している一方、低コスト生産が期待される体外受精卵移植の場合、受胎率は未だ 30~40% 程度に留まっていることもあり、これまで体外受精卵移植は畜産現場においてあまり普及が進んでいない。こうした原因の 1 つが体外で作出される受精卵の品質が低いことにあると考えられており、高品質な体外受精卵を効率的に生産する技術の確立が急務となっている。

これまでに我々は、細胞培養用の基材を開発することから研究を開始し、非生物由来材料であるカー

ボンナノチューブ（CNT）とシリコーン樹脂（poly-dimethylsiloxane, PDMS）から成る新規複合素材（CNT 複合材）を開発した（伊藤と横尾, 2012）。この CNT 複合材を用いた細胞培養シートをフィーダー細胞（ウシ卵丘細胞）の培養に使用し、体外受精卵との共培養に供した結果、従来法と比較して、受精卵の発育が促進されることが明らかにした（横尾ら, 2015）。つまり、この研究成果は、CNT 複合材を哺乳動物の体外受精卵の培養技術に応用することで、品質の高い体外受精卵を効率的に作出できることを示唆している。しかし、CNT 複合材を培養シートに使用することで、なぜそのような効果が得られるのか、その詳しいメカニズムは未だ明らかにできていない。そこで本研究では、CNT 複合材が細胞に及ぼす影響を明らかにするために、CNT 複合材培養シートを用いた細胞培養試験を実施し、さらに、CNT 複合材の特性を DNA マイクロアレイ解析で評

価することを目的とした。

材料・方法

細胞培養デバイス

細胞培養デバイスは PDMS (SILPOT 184 W/C, 東レダウコーニング) と CNT (名城カーボン) を使用して作製した (横尾ら, 2015)。6 ウェル培養ディッシュ (リプロプレート, 機能性ペプチド研究所) の各ウェルに PDMS を塗布し, 50°C, 6 時間の条件で硬化させた。その後, エタノール溶液中に分散している CNT (単層 CNT ; 25 ng/mm², 50 ng/mm², 多層 CNT ; 25 ng/mm²) を PDMS 表面に塗布することで CNT 複合材培養シートを作製した。風乾後, 培養に供した。対照区として, 無処理区 (PDMS のみ, CNT 塗布なし) および I 型コラーゲン処理区を設けた。

細胞培養

本実験では, Chinese hamster ovary (CHO) 細胞 (CHO-K1 株) を使用した。CHO 細胞を 0.2×10^4 cells/well (培養液 200 μ L/well) で播種し, 24 時間後に洗浄を兼ねて培地交換を行い, その後 48 時間培養を継続し, 計 72 時間培養した。培養条件は 37°C, 5% CO₂, 95% 空気の条件下で行った。培養 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後に CHO 細胞の接着性および増殖性を評価した。

DNA マイクロアレイ解析

単層 CNT 複合材 (25 ng/mm²) の培養シート上で 72 時間培養した CHO 細胞から, RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて, 総 RNA を抽出・精製し, DNA マイクロアレイ解析の試料として用いた。コントロールとして, I 型コラーゲン処理区の CHO 細胞から抽出・精製した RNA を用いた。なお, 解析に使用した RNA サンプルの RNA Integrity Number はすべて 10.0 であった。遺伝子発現レベルの変化はアジレント社のカスタムアレイ (56,191 遺伝子) を用いて調査した。なお, ハイブリダイゼーション (2 色法), 洗浄, スキャンおよびシグナル値の補正は (株)Subio に依頼した。発現データは, Subio Platform ((株)Subio)

を使用して, コントロールに比べて 2.0 倍以上の増加, もしくは減少した遺伝子を抽出した。次いで, これらの遺伝子群を The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 の functional annotation tool を用いて, Gene Ontology (GO) 解析およびクラスタリング解析を行った。

統計処理

細胞密度の結果は一元配置の分散分析後, ボンフェローニの多重比較検定を実施した。解析は, GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) を用いて行い, 危険率 5% 未満を有意と判定した。

結果

ナノ複合素材の違いが CHO 細胞の形態, 増殖に及ぼす影響

CNT 複合材細胞培養シートに単層 CNT を使用した場合, 培養 24 時間後における細胞接着に顕著な差が観察され, さらにその後の細胞増殖も良好であることが明らかとなった。特に, 25 ng/mm² の条件で作製した場合, 一般的に使用されるコラーゲンでコートした培養条件よりも, 細胞接着性が優れていることが明らかとなった。また, 多層 CNT を使用した場合では, 単層 CNT を使用した場合と比較して, 細胞の接着性が低く, CNT の種類によって細胞接着特性が異なることも明らかとなった (図 1)。また, 培養 72 時間後の CHO 細胞の形態を観察すると, 一般的なコラーゲンコート上で培養した CHO 細胞は, ディッシュ上に伸展して細胞増殖しているのに対して, CNT 複合材細胞培養シート上で培養した CHO 細胞の多くは, 球形を維持した状態で細胞増殖していることが明らかとなった (図 2)。

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

25 ng/mm² 単層 CNT シート上で培養した CHO 細胞では, コントロールと比較して発現レベルが 2.0 倍以上変動していた遺伝子は合計で 478 個認められた。それらの遺伝子群が持つアノテーションを基にクラスタリング解析を行ったところ, 細胞接触や細胞外マトリックスの受容体が関連するパスウェイ

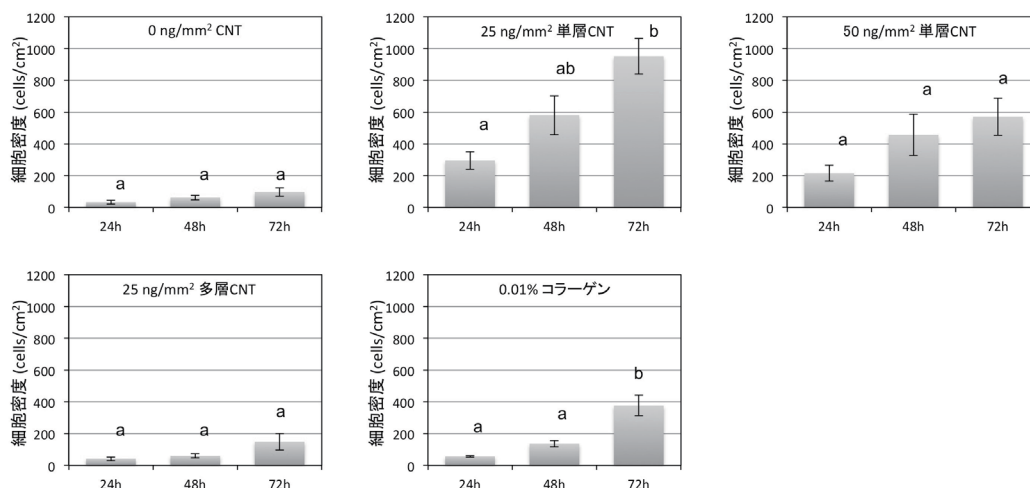


図1 複合材の違いによる細胞密度の変化
異符号間に有意差 (P<0.05)

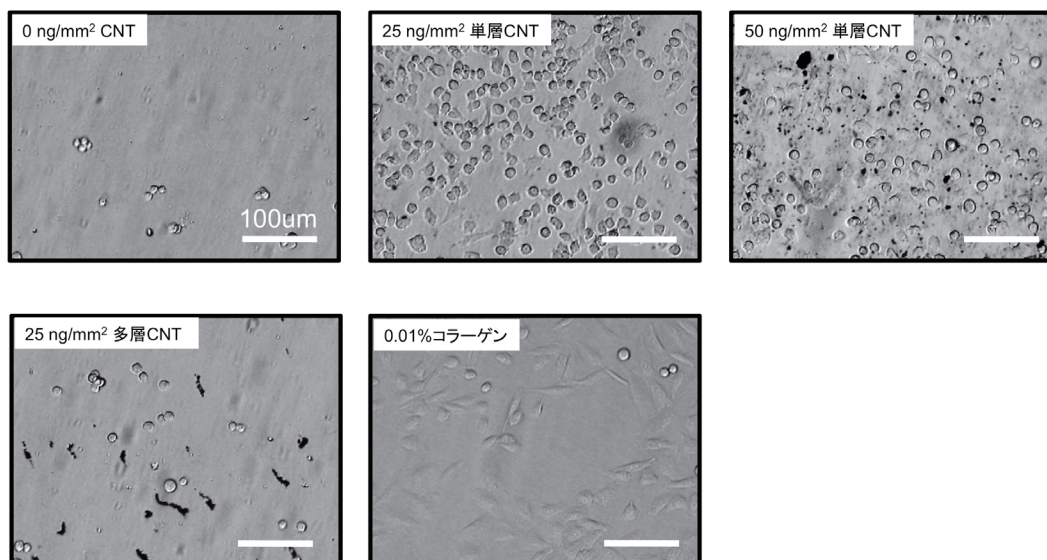


図2 培養72時間後のCHO細胞の様子

(PI3K-Akt signaling pathway, ECM-receptor interaction, Focal adhesion) が上位に来ることが示された。また、変動が認められた遺伝子のうち 2.0 倍以上増加したものが 361 個, 2.0 倍以上減少したものは 117 個であった。これらの遺伝子の機能を分析するために, Biological Process に着目した GO 解析を行ったところ, 2.0 倍以上増加していた遺伝子群では, 転写調節に関与した GO term が上位に含まれ(表 1), 発現レベルが 2.0 倍以上減少した遺伝子群では, 細胞の移動, 運動に関与する GO term が上位に含まれることが示された(表 2)。

考察

本研究では, 我々が開発した CNT 複合材の細胞培養シートとしての特性について CHO 細胞を使って評価した。培養試験の結果から, CNT 複合材細胞培養シートは一般的なコラーゲンコートよりも細胞接着性や細胞増殖性が優れていることが明らかとなった。

また, CNT 複合材細胞培養シート上で培養した CHO 細胞は球形を維持したまま細胞増殖しており, 一般的な培養時の細胞形態とは異なっていた。以前

表1 増加傾向のあった遺伝子群のGO term

GO ID	GO term	PValue
GO:0006351	transcription, DNA-templated	1.9E-02
GO:0097659	nucleic acid-templated transcription	7.5E-02
GO:0032774	RNA biosynthetic process	7.8E-02
GO:0051128	regulation of cellular component organization	8.6E-02
GO:1903506	regulation of nucleic acid-templated transcription	9.3E-02
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	9.3E-02
GO:2001141	regulation of RNA biosynthetic process	9.4E-02
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	9.9E-02

表2 減少傾向のあった遺伝子群のGO term

GO ID	GO term	PValue
GO:0040011	locomotion	3.5E-03
GO:0016477	cell migration	5.5E-03
GO:0051674	localization of cell	8.4E-03
GO:0048870	cell motility	8.4E-03
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	2.8E-02
GO:0042330	taxis	6.7E-02
GO:0006935	chemotaxis	6.7E-02

に、我々は血管内皮細胞を使用した培養試験において、ガラス基材で培養した時と比較して、CNT 複合材細胞培養シートへの細胞接着は $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介さない特徴を有していることを示唆している (伊藤と横尾, 2016)。つまり、本研究で観察された CHO 細胞の細胞形態は、CNT 複合材の特殊な細胞接着特性によって引き起こされていることが示唆される。さらに、DNA マイクロアレイで解析したところ、CHO 細胞の培養試験の結果を裏付けするように、CNT 複合材は細胞接着性に関して、一般的なコラーゲンコートとは異なる特性を有していることが明らかとなった。これらの結果から、CNT 複合材細胞培養シートは高い細胞増殖性を示し、その効果は CNT 複合材が有する特殊な細胞接着特性と関連している可能性が示唆された。

細胞外環境 (培養シートの形状や隣接する細胞との接触・接着) が細胞機能へ及ぼす影響については Hippo シグナル経路との関係が報告されている (Nishioka et al., 2009; Wada et al., 2011)。彼らは、培養細胞の細胞外環境が細胞の形態や極性を変化させることによって、細胞内の Hippo シグナル経路を抑制し、その結果として細胞増殖などのシグナル伝達を活性化させることがあることを明らかにしている。CNT 複合材培養シート上で培養した CHO 細胞も、コラーゲンコート培養とは異なる細胞形態を示していたことから、CNT 複合材も細胞に対して細胞極性を変化させ、細胞内の Hippo シグナルを抑制させていることが推察される。残念ながら、本研究で実施した DNA マイクロアレイ解析においては、Hippo シグナル経路に関わる遺伝子群の有意な変化を確認することはできなかったが、Hippo シグナル経路による細胞機能調節は、遺伝子レベルではなく、YAP/TAZ などの調節タンパク質のリン酸化や核内移行といったタンパク質レベルでの調節も重要であ

ることが報告されていることから (Codelia and Irvine, 2012)、今後、CNT 複合材細胞培養シートで培養した細胞の Hippo シグナル経路をタンパク質レベルで明らかにする必要があると考えられる。

本研究から、CNT 複合材が有する細胞培養シートとしての特性について、一定の見解を得ることができた。しかし、CNT 複合材が受精卵培養シートとして体外受精卵の品質を改善する作用機序については本研究では明らかにすることはできなかった。今後、CNT 複合材が有する細胞機能への特性と、体外受精卵の発生との関連に絞り込み、CNT 複合材シートの効果をより詳細に明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 28 年度部局提案型研究推進事業 (部局横断型研究) によって行われた。また、実験補助員の工藤恵利子氏には、培養プレートの作製等において多大なるご協力をいただきました。ここに深謝いたします。

文献

- Codelia, V.A., Irvine, K.D. (2012). Hippo Signaling Goes Long Range. *Cell*. 150(4), 669-670.
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E.M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H., Sasaki, H. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell*, 16(3), 398-410.

Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., Sasaki, H.
(2011). Hippo pathway regulation by cell
morphology and stress fibers. *Development*,138(18),
3907-3914.

伊藤一志, 横尾正樹 (2016) 「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」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』,
3, 162-166.

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 (平成 24 年 7 月 26 日)」出願人:
公立大学法人秋田県立大学

横尾正樹, 伊藤一志, 小林正之 (2015) 「ウシ体外
受精卵の共培養系におけるカーボンナノチュー
ブ複合素材の有用性」『秋田県立大学ウェブジ
ャーナル B』, 2, 1-5.

〔平成 30 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

Characterization of a carbon nanotube composite for a cell culture sheet

Masaki Yokoo¹, Ken Ito¹, Katsuyoshi Sato¹, Kazushi Ito²

¹ *Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

² *Department of Mechanical Engineering, Faculty of Systems Science and Technology,
Akita Prefectural University*

Recently, the authors manufactured a new cell culture substrate using carbon nanotube composites for an embryo culture system. In the current study, they evaluated the efficiency of this novel cell culture substrate as a cell culture sheet for CHO cells. When compared with collagen-coated plates (conventional method), the use of this new cell culture sheet improved cell adhesion and proliferation. A DNA microarray analysis revealed a significantly different expression of 478 genes with regard to cells cultured on collagen-coated plates and those cultured on carbon nanotube composites. Gene ontology terms related to ECM-receptor interaction, focal adhesion, and the PI3K-Akt signaling pathway were significantly enriched following their culture on carbon nanotube composites. These results indicate that the use of a cell culture sheet with carbon nanotube composites stimulates the proliferation of CHO cells and that these effects may relate to the unique cell adhesion system provided by carbon nanotube composites.

Keywords: CHO cells, culture device, carbon nanotube, DNA microarray