

## 接着依存性動物細胞の付着に及ぼす血清タンパクの影響

Effect of Serum Proteins on Attachment of Anchorage Dependent Cells

鈴木基之\*・酒井康行\*

Motoyuki SUZUKI and Yasuyuki SAKAI

## 1. 諸 言

動物細胞を大量培養し、インターフェロン・ワクチン・モノクローナル抗体等を安価に生産する技術が、急速に進歩してきており、その重要性は今後さらに増大すると考えられる。

動物細胞には、浮遊性のものと接着依存性細胞のものがあるが、ワクチン等の生産においては、接着依存性細胞は浮遊性細胞に比べ、良質なものを生産することが報告されている<sup>1)</sup>。しかしながら接着依存性細胞は、固体表面に付着伸展した後に増殖を開始すること、および表面に密になると一般に増殖を停止するため、一度剥離させ低密度で播種し直す操作が必要となることの2点から、浮遊性細胞に比べ大量培養におけるスケールアップは難しい。そのため、固体表面への付着伸展現象を、定量的・速度論的に解析することは、接着依存性細胞の大量培養における基礎技術の確立にとり、重要であると考えられる。

接着依存性細胞の付着伸展における形態変化を図1に示す。細胞の付着には、2つの機構が存在すると考えられている。第1の機構は、培養液に添加する血清の中に含まれている付着伸展糖タンパクが関与する特異的なもの、第2の機構は、固体表面または吸着された血清タンパクと細胞間に働くファンデルワールス力やクーロン力による非特異的なものである。また、細胞は付着伸展糖タンパクなしでは付着した後、能動的に伸展することができない。

第1の特異的な機構については、固体表面に吸着され

た血清中の付着伸展糖タンパク中の特定のアミノ酸配列が、細胞表面のリセプターにより認識され、付着が起ることが明らかになっている。たとえば、線維芽細胞においては、付着伸展糖タンパクであるフィブロネクチンの1分子に1つ存在するArg-Gly-Aspの配列<sup>2)</sup>が、細胞表面のインテグリンと呼ばれる糖タンパク複合体により認識され、付着が起る。その後、能動的な伸展運動が開始される。多くの樹立細胞株は少量のフィブロネクチンしか合成できないため、無血清培養においては、培養液にフィブロネクチンを添加する必要がある。BHK21 c13細胞が播種後60minにおいて伸展するためには、最低15ng/cm<sup>2</sup>のフィブロネクチンが必要であることが明らかにされている<sup>3)</sup>。

第2の非特異的な機構については、さまざまな固体表面における細胞の付着性の検討から、親水性と電荷密度が重要なパラメータであることが明らかにされている。細胞の表面は生理pHで負に帯電しているが、正または負に帯電した固体表面に付着することができる。負に帯電した表面との間には、Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup>等の2価陽イオンが架橋し、斥力を和らげると考えられている<sup>4)</sup>。

細胞培養においては通常、アミノ酸と無機塩類からなる合成培養液に、動物血清を添加して用いる必要があり、固体表面には血清タンパクが吸着している。すなわち、付着伸展糖タンパクに被覆された特異的付着表面と、固体表面のbareな部分や一般の血清タンパクに被覆された非特異的付着表面とが混在していると考えられる。

本研究は、細胞の付着伸展過程のうちの付着過程について、特異的機構と非特異的機構の両者の寄与を総合的に評価することを試みた。すなわち、線維芽細胞に対する付着伸展糖タンパクであるフィブロネクチンと、主要血清成分であり細胞非付着性のタンパクであるアルブミンとにより、細胞培養用ポリスチレンディッシュを被覆し、BHK21c13の付着率への影響を定量的に検討した。

本研究の検討内容を模式化したものが図2である。

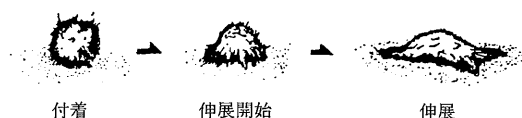


図1 接着依存性細胞の付着伸展における形態変化

\*東京大学生産技術研究所 第4部

## 研 究 速 報

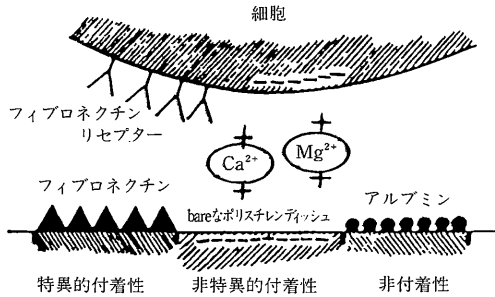


図2 本研究における検討の模式図

フィブロネクチンとアルブミンを組織培養用ポリスチレンディッシュに吸着させると、ディッシュ表面は、フィブロネクチン被覆表面 (特異的付着性、表面被覆率 $\theta_F$ )、bareなポリスチレンディッシュ表面 (非特異的付着性、同 $\theta_P$ )、アルブミン被覆表面 (細胞非付着性、同 $\theta_A$ ) の三者が混在した状態にあると考えることができる。フィブロネクチンとアルブミンの吸着量は、単成分の吸着平衡定数・飽和吸着量から、2成分Langmuir吸着平衡を仮定し推算した。

## 2. 実験方法

### 2.1 通常の継代培養

細胞は、Macphersonが樹立し<sup>5)</sup>、付着伸展の研究に多用されるハムスター由来線維芽細胞株、BHK21c13を用いた。これは、JCRBから入手した。この細胞株は、少量のフィブロネクチンしか合成できないため、初期の付着伸展においては、外因性のフィブロネクチンの影響を評価することができる<sup>6)</sup>。BHK21c13は、外からのフィブロネクチンの供給がないと、数時間は伸展することが不可能である。

通常の培養は、培養液としてEagle's MEM (Minimam Essential) 培地 (イーグルMEM培地「ニッスイ」①) + 10% FCS (Fatal Calf Serum) (Filtron 製) + 25mM HEPESを用いた。培養基としては、70cm<sup>2</sup>・140cm<sup>2</sup>の培養ビンとシリコセン、または60mm・100mm組織培養用ポリスチレンディッシュ (CORNING 製) を用い、5% CO<sub>2</sub>-95% air下、開放培養を行った。継代は、PBS(-) (Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup>非含有) と0.25%トリプシン・0.02% EDTAを用いる常法に従った。

### 2.2 ディッシュのprecorting

ディッシュは、6穴マルチウェル (CORNING 製, 34.5 mm, 9.4cm<sup>2</sup>) を用いた。フィブロネクチン (Sigma 製, ウシ血清由来) やアルブミン (Sigma 製, ウシ血清由来, コーン第V分画) を含むPBS (+) (phosphate-buffered saline, Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup>含有) を、各ウェル1.0ml入れ、

37°Cで1hr静置した。フィブロネクチン・アルブミンの単成分の吸着は、30minで平衡に達することが報告されている<sup>3), 6)</sup>。各ウェルは、播種直前に37°CのPBS (+) 3mlで3回洗浄した。

また、フィブロネクチン表面被覆率と付着率の関係を測定するため、アルブミンによるブロッキング法<sup>7)</sup>を用いた。すなわち、フィブロネクチンを吸着させたウェルの溶液を取り除き、80°Cで3min熱変性させた10mg/mlのアルブミンPBS (+) 溶液1.0mlを入れ、37°Cで60min静置し、bareなポリスチレン部をcoatingする。この操作により、ポリスチレンへの非特異的な細胞付着は、ほぼ完全に防ぐことができる。

### 2.3 細胞採取・播種

既往の研究例を比較検討すると、細胞採取法により、初期の付着率は大きく異なることが明らかとなる。ここでは、MEM+FCSでトリプシン・EDTAを停止した場合における血清中のフィブロネクチンの影響を防ぐため、Ruoslahtiらの方法<sup>8)</sup>により、細胞懸濁液を得た。

増殖停止を起こした細胞を、測定の前日に1:2で継代 (播種密度5.0×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) し、対数増殖期に誘導する。この細胞をPBS (-) で2回洗浄後、0.25%トリプシン・0.02% EDTAで剥離させ、37°Cの0.5mg/mlトリプシンインヒビター (Sigma 製, soybeen由来) PBS (-) 溶液で停止する。氷浴で10min放置したのち遠心し、PBS (+) に懸濁後、再度遠心する。PBS (+) に懸濁し、細胞数を測定した後、3.0~5.0×10<sup>5</sup>/mlになるようPBS (+) で希釈し、1ウェルに1.0ml播種した。細胞の播種密度は、3.2~5.3×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>となる。

### 2.4 付着率測定

付着率の測定法は、Grinnellらの方法<sup>7)</sup>に準拠した。37°Cで規定時間培養した後、往復shaker (振幅20mm) で150rpm 10sec shakingし、溶液中に浮遊した細胞を非付着細胞と考えた。この操作により、付着細胞は剥離しないが、非付着細胞はすべて浮遊する。非付着細胞数は、この細胞浮遊液の640nmでの吸光度を測定、あらかじめ決定しておいた検量線から細胞濃度を算定し、求めた。播種細胞数と非付着細胞数とから、付着率を求めた。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 付着率の経時変化

付着率の経時変化をみるため、フィブロネクチンまたはアルブミンを90% PBS (+) + 10% FCSと同濃度含む溶液でprecoatingした場合の付着率の経時変化を測定した。結果を図3に示す。血清中に、フィブロネクチンは200μg/ml、アルブミンは40mg/ml含まれている。どの溶液でprecoatingした場合においても、付着率は30~60

研究速報

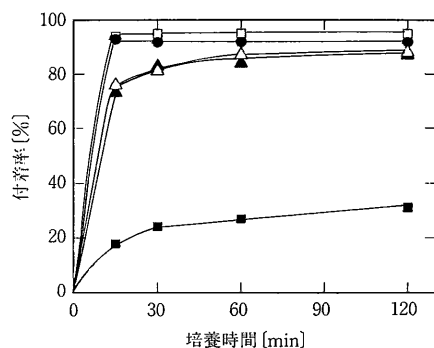


図3 付着率の時間変化

precoating液

- PBS(+)
- フィブロネクチン20μg/ml
- ▲ フィブロネクチン20μg/ml, アルブミン 4 mg/ml
- アルブミン 4 mg/ml
- △ 90%PBS(+)+10%FCS

minで平衡に達する。以下、表面状態と付着率の関係を、60min後の付着率について検討することにした。

アルブミンをフィブロネクチンの200倍の濃度で共存させた場合においても、フィブロネクチン単成分の場合と比較して、平衡状態における付着率の低下は、10%以下である。フィブロネクチンが存在しない場合においては、アルブミンにより、付着率が大幅に低下する。また、フィブロネクチンとアルブミンの2成分に注目することにより、血清添加培地での付着現象を、良好に近似できる。

### 3.2 $\theta_F \cdot \theta_P$ と60min後の付着率

#### 3.2.1 表面被覆率の推算

フィブロネクチンとアルブミンの単成分の吸着は、いずれもLangmuir式に従う。Langmuir定数と飽和吸着量は、フィブロネクチンについては、Hughesらの組織培養用ポリスチレンディッシュに対する測定<sup>3)</sup>から、アルブミンについては、ポリスチレンディッシュに対する測定例がないため、親水性ポリマーであるCuprophaneに対するHansonらの測定<sup>7)</sup>から、それぞれ決定した。それらの値から、2成分Langmuir式を以下のように仮定した。フィブロネクチンについては吸着による濃度変化を考慮したが、アルブミンについては無視した。

$$Q_F = \frac{K_F q_F C_F}{1 + K_F C_F + K_A C_A}$$

$$Q_A = \frac{K_A q_A C_A}{1 + K_F C_F + K_A C_A}$$

ここで  $K_F = 0.0254$ ,  $K_A = 0.00635$

$q_F = 0.698$ ,  $q_A = 0.131$

である。ただし、

$Q$ : 吸着量 [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ],

$K$ : Langmuir定数 [ $\text{ml}/\mu\text{g}$ ]

$C$ : 液濃度 [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ],

$q$ : 飽和吸着量 [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]

(添字<sub>F</sub>はフィブロネクチン、<sub>A</sub>はアルブミンを示す)

表面被覆率は、以下のように算出した。

$$\theta_F = \frac{Q_F}{q_F} \quad \theta_A = \frac{Q_A}{q_A}$$

$$\theta_P = 1 - \theta_F - \theta_A$$

#### 3.2.2 $\theta_F$ と60min後の付着率

$\theta_P$ を一定にし、 $\theta_F$ を変化させた場合の60minの付着率変化を図4に示す。アルブミンブロッキング法により $\theta_P = 0$ とした場合、付着率は $\theta_F$ に対し典型的な用量-作用曲線を示し、50%の付着率を与える吸着量は $4 \text{ ng}/\text{cm}^2$ である。1 hr後の伸展率もフィブロネクチンの吸着量に対し、用量-作用曲線を示し、50%の伸展率を与える吸着量は $20 \text{ ng}/\text{cm}^2$ であることが報告されている<sup>3)</sup>。付着における遷移域は、伸展における遷移域よりやや小さいことがわかる。

$\theta_P = 0.019$ 以上では $\theta_P$ に関わらず $\log \theta_F$ に対してほぼ同一直線で表され、用量-作用的傾向はみられない。今回の測定範囲では、付着率は、 $\theta_F$ のみの関数である。しかし、 $\theta_F = 0$ ではいずれの $\theta_P$ においても付着率が大きく低下することから、今回の測定範囲よりさらに小さな $\theta_F$ について、用量-作用曲線を示し、曲線の緩やかさは $\theta_P$ に大きく依存することが予想される。

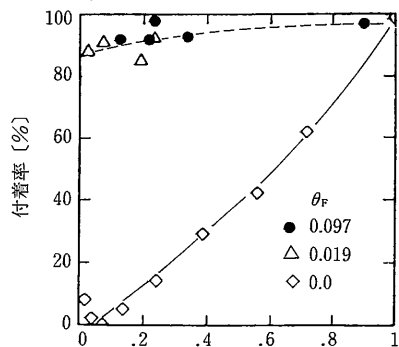
また $\theta_P = 0.015$  (10mg/mlアルブミンを含む溶液でprecoating) では、 $\theta_F$ に対し用量-作用曲線を示すが、 $\theta_P = 0.019$  (8 mg/mlアルブミンを含む溶液でprecoating) 以上の付着率と比較して、著しく低い値を示す。この現象は、Langmuir平衡式では説明できない。

#### 3.2.3 $\theta_P$ と60min後の付着率

$\theta_F$ を一定にし、 $\theta_P$ を変化させた場合の60min後の付着率変化を図5に示す。 $\theta_F = 0$ とした場合、付着率は $\theta_P$ により大きく影響を受け、ほぼ単調な右上がりの曲線で表される。非特異的付着表面の付着率に対する寄与を評価するパラメータとして、表面被覆率が有効であることが示された。さらに、付着性の異なる複数の非特異的付着表面が混在している場合、両者の寄与が、それぞれの表面被覆率で総合的に評価できる可能性がある。

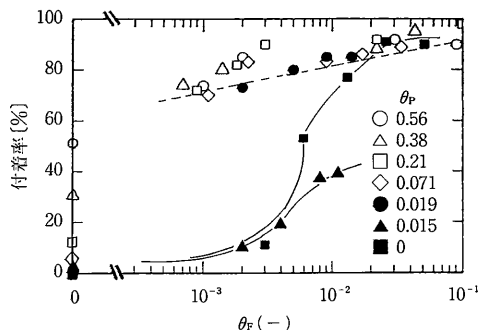
$\theta_F$ が存在する場合は、 $\theta_P$ による変化は10%程度である。 $\theta_F$ が遷移域以上の値では、付着率は $\theta_F$ によりほぼ決定される。

研 究 速 報

図 4 付着率の  $\theta_F$  依存性

## 4. 結 言

接着依存性動物細胞の付着現象に対する血清タンパクの影響を、フィブロネクチン被覆表面 (特異的付着性), bareなポリスチレンディッシュ表面 (非特異的付着性), アルブミン被覆表面 (非付着性) からなる表面を調製し, 総合的に検討した。付着が定常状態になる60min後の付着率に対する特異的付着表面の寄与は, 用量-作用曲線で示された。遷移域以上では, 付着率は特異的付着表面の表面被覆率により規定される。遷移域以下, すなわち特異的付着表面の影響がほぼ無視される場合においては,

図 5 付着率の  $\theta_F$  依存性

非特異的付着表面の表面被覆率が, 付着率に大きく影響を与えることが示された。 (1988年12月16日受理)

## 参 考 文 献

- 1) Reuveny, Adv. Cell Culture, 4, 213 (1985)
- 2) Pierschbacher et al., Nature, 309, 30 (1984)
- 3) Hughes et al., Exp. Cell Res., 121, 307 (1979)
- 4) Gardner et al., Exp. Cell Res., 137, 169 (1982)
- 5) Macpherson, J. Nat. Cancer Inst., 30, 795 (1963)
- 6) Hanson, J. Lab. Clin. Med., 93, 483 (1978)
- 7) Grinnell et al., Cell 17, 117 (1979)
- 8) Rouslahti et al., Med. Enzymol., 82, 803 (1982)