

L-Lysineを側鎖にもつ生体適合性polyacrylamide存在下での HepG2細胞応答性

小川 智弘^{†1}, 農宗 辰己^{†3}, 市原 祐介^{†2}, 沖 勇斗^{†3}, 白石 浩平^{†2,†3}

HepG2 cell responsiveness in the presence of biocompatible polyacrylamide having L-Lysine as a side chain

Tomohiro OGAWA^{†1}, Tatsuki NOUSOU^{†3}, Yusuke ICHIHARA^{†2},
Yuto OKI^{†3}, and Kohei SHIRAISHI^{†2,†3}

Abstract

We have been reported that amphoteric poly[*N*^ε-acrylamide-L-lysine][poly(α -LysAA)] having L-Lysine as a side chain showed anti-thrombogenicity and enhanced fibrinolytic activity based on a selective binding activity with fibrinolytic proteins[plasminogen (Plg), tissue-type plasminogen activator (t-PA)]. To know biocompatibility for biomedical uses, the human hepatocellular carcinoma (HepG2 cell) responsiveness was evaluated in the presence of poly(α -LysAA). As the results from no effect on cell proliferation, cytotoxicity, and cell viability of HepG2 cells in the poly(α -LysAA)-contained medium or -coated dish, a bio-inert property of poly(α -LysAA) was shown.

KeyWords: Amphoteric Polymer / Poly(acrylamide) / L-lysine / Evaluation of cell proliferation, cytotoxicity, and cell viability / HepG2 cells

1. 緒言

生体適合性とくに抗血栓性に優れた医用材料として利用される親水性ポリマー材料で、分子内双性イオン構造のリン脂質極性基、ホスホリルコリン (PC) もつポリマー材料は高度なタンパク質の吸着抑制、細胞接着、さらに抗血栓性を示し、医用材料として実用化されている¹⁾。

PC 部位は、タンパク質等生体分子との静電的相互作用を減少させ、周囲に運動性の高い自由水が豊富に含まれる厚い水和シェルを形成して強い生体不活性を示す²⁾。さらに、分子内双性イオン構造をもつ poly(carboxybetainemethacrylate) および poly(sulfobetainemethacrylate) にも高度なタンパク質等の生体物質の非特異吸着を抑制

し、類似の分子内双性イオン構造のポリマー材料にも、高い生体適合性が報告されている³⁾。

一方、著者らは、PC 基を側鎖にもつ poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine); PMPC の化学構造をモチーフとして、分子内塩構造の生体無毒な両性イオン構造の L-アミノ酸を側鎖とする poly(*O*-methacryloyl-L-serine)[poly(SerMA)]⁴⁾あるいは poly(*N*^ε-methacryloyloxy-L-lysine)[poly(α -LysMA)]、poly(*N*^ε-methacryloyloxy-L-lysine)[poly(ϵ -LysMA)]に PMPC と同レベルの高い血漿タンパク質の非吸着性を明らかにし⁵⁾、医用材料への応用を検討してきた。さらに、poly(SerMA)には adenosine diphosphate (ADP) による血小板活性化抑制⁶⁾、poly(α -LysMA)、

^{†1} 近畿大学工学部教育推進センター

^{†2} 近畿大学工学部化学生命工学科

^{†3} 近畿大学大学院システム工学研究科

Center for the Advancement of Higher
Education, Faculty of Engineering, Kindai University

Department of Biotechnology and Chemistry,
Faculty of Engineering, Kindai University

Graduate School of Systems Engineering, Kindai University

poly(α -LysAA)は、アルブミン、 γ -グロブリン、フィブリノゲン等の血漿タンパク質の吸着を抑制するが、Lysine binding site (LBS) をもつ線溶タンパク質プラスミノゲン (Plg)、組織プラスミノゲンアクチベタ (t-PA) とは特異的に結合し、線溶活性を亢進する機能を示す⁷⁾。LBS への結合性は L-lysine の α -アミノ基をアセチル化さらには分子サイズを同等として疎水性を向上させた *trans*-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid, 4-(aminomethyl)-bicyclo[2,2,2]octane-1-carboxylic acid 等に L-lysine よりも強い LBS 結合性が報告され⁸⁾、 α -アミノ基とペプチド結合させた polyacrylamide の疎水部等によって、Plg, t-PA と強く相互作用し、線溶活性が亢進されたと考えられる。このように両性イオン構造のアミノ酸ユニットを側鎖にもつポリマー材料には、上記双性イオン構造のポリマー材料とは異なる固有の血液応答性も認めている。プラスミノゲンアクチベタ固定化材料に抗血栓性が認められており⁹⁾、分子内両性イオン構造による血漿タンパク質の非特異吸着の抑制と線溶タンパク質との特異的な相互作用を示す poly(α -LysMA), poly(α -LysAA)には、生体分子の吸着・変性および活性化しないバイオ不活性機能のみならず Plg, t-PA の線溶関連因子を予め固定化するのでなく、血液との接触によって血漿中から本材料表面への選択吸着により抗血栓性を示すと考えられる。また、両機能によって従来にない長期間の抗血栓性発現、使用前に変性しやすい生体分子の固定化材料保存の必要がなく、さらに通常の滅菌操作できる保存安定性を備えた新しいタイプの医療ポリマー材料として活用可能と考える。

一方、poly(SerMA)には、ヒト血小板非接着性を認めているが、これまで、ヒト細胞によるアミノ酸ユニットをもつ両性イオン構造のポリマー材料の細胞応答に関する評価はされていない。細胞足場剤として使用される poly(D-lysine) (PDL) の光学異性体 poly(L-lysine)の主鎖中のリシン残基を側鎖とする類縁構造である poly(α -LysAA) (Fig.1) について、生体適合性評価の観点から、poly(α -LysAA)が細胞の接着・増殖に及ぼす効果について検討した。ここでは、生体埋入医療材料へのコーティング等を指向し、また、接着・増殖能が高く、肝臓細胞の代替モデルとして幅広く利用されている原発性ヒト肝臓癌 (白人男性, 15 才) から樹立されたヒト肝臓由来細胞株 HepG2 を用いて評価した¹⁰⁾。

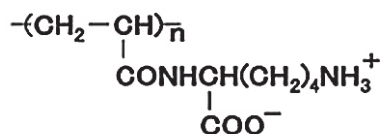


Fig. 1 両性イオン構造 poly(α -LysAA)

2. 実験

2-1. 試薬の調製

2-1.1. 細胞培養用培地 (D-MEM10)

Dlbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, Wako) (高グルコース, L-グルタミン, フェノールレッド含有) 500 ml に Fetal bovine serum (FBS, Biosera) 50 ml と、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 ($\times 100$) (Wako) 5 ml を加えた。容器の口は火炎滅菌し、2~8°Cで保存した。

2-1.2. 無血清培地 (D-MEM0)

50 ml コニカルチューブに分注した D-MEM 50 ml にペニシリン-ストレプトマイシン溶液 ($\times 100$) 500 μ l を加えた。コニカルチューブの口は火炎滅菌し、2~8°Cで保存した。

2-1.3. poly(α -LysAA)の調製と培地添加溶液

既報⁷⁾に従って調製した poly(α -LysAA) (数平均分子量=35,000 g/mol) 10 mg を PBS(-), pH 7.4 (Gibco) 1 ml に溶解させ、-20°Cで保存した。また、コントロールとして、poly-D-lysine hydrobromide (分子量=30,000~70,000 g/mol, Sigma) 10 mg を PBS(-), pH 7.4 (Gibco) 1 ml に溶解させ、-20°Cで保存した。

2-2. 細胞培養

80~90%コンフルエントになった 10 cm シャーレからアスピレーターで培地を取り除き、培地に含まれる血清を除去するために、PBS(-) 5 ml で 2 回洗浄した。シャーレから細胞を剥離させるために、0.25 w/v% Trypsin-1 mmol/l EDTA \cdot 4Na Solution (Trypsin-EDTA, Wako) 1 ml を加え、シャーレ全体になじませてから 37°Cで約 5 分間インキュベートした。顕微鏡で細胞が剥離していることを確認し、細胞培養用培地 10 ml を加えて Trypsin-EDTA の活性を止め、ピペッティングによりシャーレから細胞を剥がしながら単離した。15 ml コニカルチューブに移して 2,000rpm で 3 分間遠心し、アスピレーターで上清を取り除いた。細胞培養用培地 1 ml を加え、ピペッティングにより細胞を単離、懸濁した。細胞の回収量に応じて細胞培養用培地でのメスアップする量を変えメスアップ後、血球計算盤に 10 μ l を滴下して細胞数を計測した。

2-3. Poly(α -LysAA)存在下での細胞培養

2-3.1. Poly(α -LysAA)存在下での細胞毒性試験

上記 (2-2) の方法で細胞を回収し、細胞濃度を 1.0×10^5 cells/ml に調製した。96well プレート (IWAKI) に 1 well あたり 100 μ l ずつ播いて 37°C, 5%CO₂ 下で一晩培養した。その後、poly(α -LysAA)溶液を含む培地 (Table 1-1) に交換し、37°C, 5%CO₂ で 24 時間培養した。24 時間後、各 well に CCK-8 溶液 (同仁化学研究所) 10 μ l を加え、37°C, 5%CO₂ でインキュベートした。3 時間後に、450nm の吸光度を測定した。細胞を植えておらず poly(α -LysAA) 溶液を含む培地で培地交換を行ったものをブランクとして、その値をコントロール群と試薬投与群から引き、コントロール群を 100%として試薬投与群のコントロール群に対する割合を細胞生存率として評価した。統計学的有意差は F 検定、および T 検定により解析した。

Table 1-1 細胞毒性試験時の試薬調製

poly(α -LysAA) 溶液 [mg/ml]	0	0.1	0.25	0.5	1.0
D-MEM10 [D-MEM0] [μ l]	630	630	630	630	630
PBS(-) [μ l]	70	63	52.5	35	0
10 mg/ml poly(α -LysAA) [μ l]	0	7	17.5	35	70

2-3.2. Poly(α -LysAA)コーティングによる細胞増殖試験

10 mg/ml poly(α -LysAA)溶液を PBS(-)で既定の濃度にそれぞれ希釈して、0.45 μ m フィルター (Millex) に通して滅菌を行った (Table 1-2). 96well プレートに滅菌した poly(α -LysAA)溶液 50 μ l ずつ各 well に添加した. この時, プレート底面に満遍なく行き渡るようにした. 添加から 5 分後, PBS(-)で 2 回洗浄して, 2 時間~3 時間 UV 乾燥させた. HepG2 を上記 (2-2) の方法で細胞を回収し, 細胞濃度 1.0×10^5 cells/ml で 100 μ l ずつ各 well に播種し, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下で 24 時間培養した. 24 時間後, 各 well に CCK-8 溶液 10 μ l を加え, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下でインキュベートした. 3 時間後に, 450 nm の吸光度を測定した.

Table 1-2 細胞増殖試験時の試薬調製

poly(α -LysAA)溶液 [mg/ml]	0.1	0.25	0.5	1.0
PBS(-) [μ l]	693	682.5	665	630
10 mg/ml poly(α -LysAA) [μ l]	7	17.5	35	70

2-4. Poly(α -LysAA)コーティングによる三次元培養

10 mg/ml poly(α -LysAA)溶液を PBS(-)で既定の濃度にそれぞれ希釈して, 0.45 μ m フィルター (Millex) に通して滅菌を行った. 24 well プレートに 0.1, および 1.0 mg/ml の poly(α -LysAA)溶液と 0.1 mg/ml PDL 溶液をそれぞれ 300 μ l ずつ各 well に添加し, 1 時間およびオーバーナイト (ON) でコーティングした. その後, PBS(-)で 2 回洗浄を行い 1 時間乾燥させた. HepG2 を上記 (2-2) の方法で細胞を回収し, 無血清培地で細胞濃度 1.0×10^5 cells/ml の濃度で 500 μ l ずつ各 well に播種し, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下で培養した. 6 時間後, 10%FBS を含む培地に交換した. その後も, 10%FBS を含む培地を使用し細胞播種から 24 時間, 72 時間後, 以降 2 日毎に培地交換を行った. 培地交換時に, 顕微鏡で細胞の観察および撮影を行った.

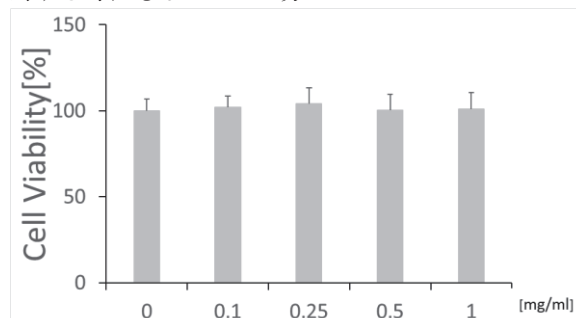
3. 結果と考察

3-1. Poly(α -LysAA)の細胞毒性の検討

3-1.1. Poly(α -LysAA)含有無血清培地での細胞毒性

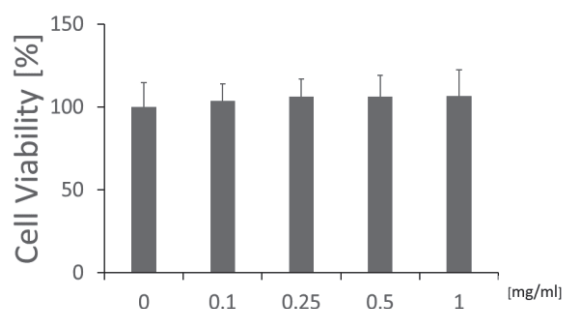
上記の方法 (2-3.1) を用いて, 細胞播種 24 時間後に

0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml の poly(α -LysAA)溶液を含んだ無血清培地で HepG2 の細胞培養を行い, 24 時間後に CCK-8 assay にて細胞生存率を測定した (Fig.2). poly(α -LysAA)含有無血清培地条件下において, 溶液の濃度毎で細胞生存率に有意な差は見られなかった. poly(α -LysAA)添加は細胞増殖には影響がなく, poly(α -LysAA)の細胞に対する毒性もないことが分かった.

Fig. 2 Poly(α -LysAA)含有無血清培地での HepG2 の細胞生存率

3-1.2. Poly(α -LysAA)含有培地 (10%FBS 含む) での細胞毒性

上記の方法 (2-3.1) を用いて, 細胞播種 24 時間後に 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml の poly(α -LysAA)含有培地 (10%FBS 含む) で HepG2 の細胞培養を行い, 24 時間後に CCK-8 assay にて細胞生存率を測定した (Fig.3). Poly(α -LysAA)含有培地 (10%FBS 含む) 条件下において, 溶液濃度毎で細胞生存率に有意な差は見られなかった. Poly(α -LysAA)添加による細胞増殖に影響がないことが分かった. また, poly(α -LysAA)の細胞に対する毒性がないことも分かった.

Fig. 3 Poly(α -LysAA)含有培地 (10%FBS 含む) での HepG2 の細胞生存率

3-2. Poly(α -LysAA)コーティングによる細胞増殖

3-2.1. Poly(α -LysAA)コーティングによる細胞増殖 (無血清培地)

上記の方法 (2-3.2) を用いて, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml の poly(α -LysAA)で培養皿をコーティングした後, 無血清培地で HepG2 の細胞培養を行い, CCK-8 assay にて細胞生存率を測定した (Fig. 4). Poly(α -LysAA)コーティング

下で HepG2 の細胞生存率には有意な差は見受けられず、コーティングなしの HepG2 の細胞生存率と変わりはない。また、PDL コーティング下で HepG2 の細胞生存率は、コントロール群 (Cnr), および poly(α -LysAA) コーティング下の HepG2 の細胞生存率に比べて有意に高かった。結果として、PDL は細胞の足場としての機能を持ち、細胞の増殖 (または細胞の維持) を促進させることができるが、poly(α -LysAA)には同様の機能はなく、HepG2 に poly(α -LysAA)は不活性であると考えられる。

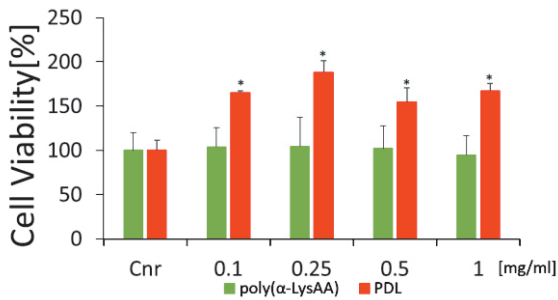


Fig. 4 Poly(α -LysAA)コーティング培養皿(無血清培地)での HepG2 の細胞増殖 (p* < 0.05 vs. Cnr)

3-2.2. Poly(α -LysAA)コーティングによる細胞増殖 (10%FBS 含有培地)

上記の方法(2-3.2)を用いて、0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml の poly(α -LysAA)で培養皿をコーティングした後、10%FBS 含有培地で HepG2 の細胞培養を行い、CCK-8 assay にて細胞生存率を測定した (Fig.5)。無血清培地の結果と同様で、poly(α -LysAA)コーティング下で HepG2 の細胞生存率には有意な差は見受けられず、コーティングなしの HepG2 の細胞生存率と変わりはない。また、PDL コーティング下で HepG2 の細胞生存率は、コントロール群 (Cnr), および poly(α -LysAA)コーティング下の HepG2 の細胞生存率に比べて有意に高かった。結果として、培地の血清の有無に関わらず PDL は細胞の足場としての機能を持ち、細胞の増殖 (または細胞の維持) を促進させることができるが、poly(α -LysAA)には同様の機能はないことが明らかとなった。

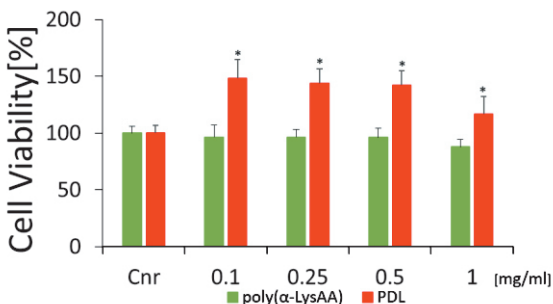


Fig. 5 Poly(α -LysAA)コーティング培養皿 (10%FBS 含有培地) での HepG2 の細胞増殖 (p* < 0.05 vs. Cnr)

3-3. Poly(α -LysAA)コーティングによる三次元培養

培養 9 日目 (Fig. 6) の PDL コーティング下では、HepG2 が細胞同士で重なり合っていることが確認された。これは細胞間の接着によるものと推測され、PDL には細胞との接着のみならず細胞を遊走させる作用を持つことがわかった。一方、poly(α -LysAA)コーティング下では、HepG2 の形態に与える変化は、コーティングをしていない細胞と比較しても確認できなかった。細胞の集合は見られるものの、これはコーティングをしていない細胞にも見られた。培養 11 日目 (Fig. 7) には、1.0 mg/ml poly(α -LysAA) コーティング下の HepG2 は細胞が剥離し、培地中に浮遊してしまっていた。0.1 mg/ml poly(α -LysAA) (1h)の写真の黒い部分が、HepG2 の剥離、および培地上に浮遊している様子である。また、poly(α -LysAA)コーティング下とノンコーティング下に共通するのは、培養 9 日目と違い細胞同士がより密になって集合していた。これは、PDL コーティング下での HepG2 の立体的に重なり合ってきたものとは異なると判断した。Poly(α -LysAA)コーティング下の細胞が剥離していること、加えて、培地交換の際に培地が黄色に変色しており、これは細胞のオーバーグロースによる剥離前の段階であると考えられた。培養を継続した結果、この 2 つの条件下の細胞が剥離したため、前述のことが明らかとなった。一方、PDL コーティング下では HepG2 未処理と比較して、細胞同士が密に接着して凝集塊が見られた。

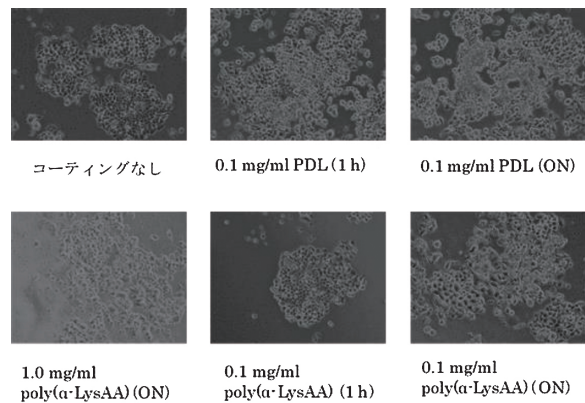


Fig. 6 Poly(α -LysAA)コーティングによる HepG2 の三次元培養 (培養 9 日目)

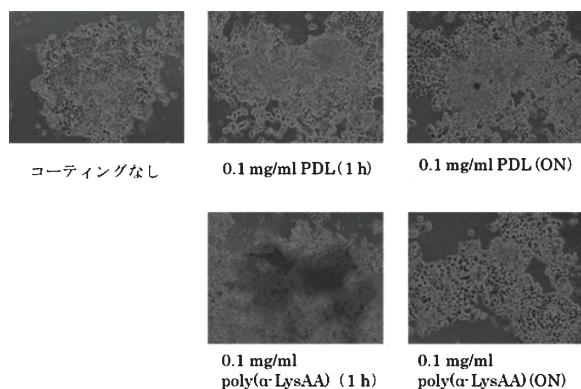


Fig. 7 Poly(α -LysAA)コーティングによる HepG2 の三次元培養 (培養 11 日目)

4. 結言

両性イオン構造 poly(α -LysAA)の医用材料への応用を目的に、HepG2 細胞毒性から生体適合性評価を試みた結果、poly(α -LysAA)添加による HepG2 の細胞生存率に有意差はなく、poly(α -LysAA)の HepG2 細胞に対する毒性はないことが確認できた。次に、PDL コーティング下での HepG2 の増殖は、すべての濃度において有意に促進するのに対し、poly(α -LysAA)コーティングでは、細胞生存率に有意差がない。さらに、PDL コーティング下での HepG2 は細胞同士の接着による立体的な細胞塊が見られ、長期間に細胞を維持することが可能であるが、poly(α -LysAA)コーティングでは、HepG2 はコーティング無し条件下と形態変化の違いがない。さらに、早期に細胞がはく離する細胞非接着性も有する。線溶タンパク質 Plg および t-PA と特異結合するが、他の血漿タンパク質の吸着を抑制する生体適合性を示す poly(α -LysAA)は HepG2 への細胞毒性がなく、増殖への影響も殆どない。従って、他の体細胞に対しても不活性である PMPC と同様な生体適合性を有すると考えられる。今後、poly(α -LysAA)が生体内で反応を示す Plg や t-PA との相互作用による線溶活性作用の効果について血球系細胞による評価から、血液適合性の評価が期待される。

5. 参考文献

- 1)K.Ishihara,“Blood-Compatible Surfaces with phosphorylcholine-based polymers for cardiovascular devices”, *Langmuir*, 35, 1778(2019)
- 2)T.Goda,K.Ishihara, and Y.Miyahara, “Critical update on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC) polymer science”, *J.Appl.Polym.Sci.*, 132, 41766(2015)
- 3)L.Zheng, H.S.Sundaram, Z.Wei, C.Li, and Z. Yuan, “Applications of zwitterionic polymers”, *Reactive and Fuctional Polymers*, 118, 51(2017)
- 4)K.Shiraishi, T.Ohnishi, and K. Sugiyama, “Preparation of poly(methyl methacrylate) microspheres modified with amino acid moieties”,*Macromol. Chem. Phys.*, 199,

2023(1998)

- 5)K.Shiraishi, M. Kohta, and K. Sugiyama, “Preparation of zwitterionic polymethacrylamide modified with L-lysine and its effect on fibrinolytic activity”, *Chem. Lett.*, 33(6), 646(2004)
- 6)K.Shiraishi, T.Ohinishi, K.Sugiyama, K.Okada, and O.Matsuo, “Surface modified poly(methyl methacrylate) microspheres with the *O*-methacryloyl-L-serine moiety”, *Chem. Lett.*, 26(9), 863(1997)
- 7)白石浩平, 脇坂真伍, 里崎順二, 杉山一男, “L-リジン骨格を含むポリ(メタ)アクリルアミドの調製と線溶活性への影響”, 高分子論文集 69(1), 39(2012)
- 8)A.M.Petros, V.Ramesh, and M.Llinás,“¹H-NMR studies of aliphatic ligand binding to human plasminogen Kringle 4”, *Biochemistry*, 28, 1368(1989)
- 9)大城孟, “抗血栓療法の問題点と抗血栓物質固定化の現況”, 生体材料, 8, 23(1990)
- 10)E.X-Perez, S.G-Esteruelas, M.Baranowska, J.Pallares, L.Masana, and L.F.Marsal,“In vitro biocompatibility of surface-modifiedporous alumina particle for HepG2 tumor cells: Toward earlydiagnosis and targeted treatment”, *Appl.Mater.Interfaces*,7,18600(2015)