キチン・キトサン研究 *Chitin and Chitosan Research* Vol. 25, No. 1, pp. 16-22, 2019

キチン由来ナノファイバーの動物細胞における培養基材としての有用性評価

西潟　怜，中谷祥恵，伊福伸介，古旗賢二

報　文

キチン・キトサン研究 *Chitin and Chitosan Research* Vol. 25, No. 1, pp. 16-22, 2019

キチン由来ナノファイバーの動物細胞における培養基材としての有用性評価

西潟　怜[1]，中谷祥恵[1]，伊福伸介[2]，古旗賢二[1]

[1]城西大学大学院薬学研究科
〒350-0295　埼玉県坂戸市けやき台1-1
[2]鳥取大学大学院工学研究科
〒680-8552　鳥取県鳥取市湖山町南4-101

Evaluation of usefulness of chitin-derived nanofiber as a culture scaffold in mammal cells

Rei NISHIGATA[1], Sachie NAKATANI[1], Shinsuke IFUKU[2], Kenji KOBATA[1]

[1]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University*
1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan
[2]*Graduate School of Engineering, Tottori University*
4-101 Koyama-cho Minami, Tottori 680-8552, Japan

2019年3月4日　受理

本研究ではキチンナノファイバー（CNF），表面キトサン化キチンナノファイバー（SDACNF），キトサンナノファイバー（CSNF）の動物細胞培養基材としての有用性を評価した．基材への種々細胞の接着性を評価したところ，骨髄由来間葉系幹細胞と培養軟骨細胞株ATDC5がSDACNFとCSNFの基材面への高い接着性を示した．ATDC5の骨分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性は，SDACNFはCSNFと比較して有意に高値であった．さらに，0.1%酢酸で調製したSDACNF基材では，細胞増殖率および分化能が有意に増加した．以上の結果，SDACNFは培養軟骨細胞の培養基材として有用である可能性が示された．

This study evaluated the utility of chitin-derived nanofibers as a mammal cells culture scaffold. We used chitin nanofibers (CNF), surface-deacetylated chitin nanofibers (SDACNF) and chitosan nanofibers (CSNF). As a result of evaluating the adhesion of five kinds of cells to the scaffolds, bone marrow derived mesenchymal stem cells and pre-chondrogenic cell line, ATDC5 were superior in adhesion to CSNF and SDACNF. Alkaline phosphatas activity, an indicator of differentiation of ATDC5, per cell was higher on SDACNF than on CSNF. Furthermore, SDACNF scaffold prepared with acetic acid showed higher proliferation and differentiation activities of ATDC5 than that prepared without acetic acid. In conclusion, SDACNF could be useful as a culture scaffold for chondrocytes and their stem cells.

Keywords: 表面キトサン化キチンナノファイバー，間葉系幹細胞，軟骨細胞，バイオマテリアル
surface diacetylated chitin nanofibers, mesenchymal stem cells, chondrocytes, biomaterials

1. 緒　言

生体内には組織ごとに様々な細胞が存在し，これらの細胞は発生の過程で適切な細胞外マトリックス（ECM）および増殖因子と相互作用することで，細胞が増殖および分化し，正常な組織を形成する[1-3]．ECMの役割は，組織の空間充填や細胞骨格の形成および細胞接着における足場として機能することである．また，ECMは細胞膜上にあるECM受容体を介して，細胞の増殖，分化，遊走等の機能を調節するシグナルに影響を及ぼすことが知られている[4,5]．さらに，近年，ECMの組成および剛性自体が細胞の分化や機能を調節することも報告されている[6]．

現在，再生医療の進歩に伴い生体外で目的細胞の増殖および分化を調節することが求められている．生体外で目的の細胞を増殖および分化維持するために，現在，様々な培養基材および増殖因子が用いられている．培養基材には生体親和性や安全性などが重要であることから，ヒトの主要なECMの構成成分であるコラーゲン（Col）やフィブロネクチンなどが古くから培養基材として利用されてきた．一方，従来から利用されている培養基材のみでは，目的の組織に分化した細胞を短時間に大量に調製することが困難であるため，さらなる培養基材の開発が必要とされている．このような背景のもと，現在ヒト生体成分以外の天然物や合成化合物を培養プレート表面のコーティング基材や三次元スキャフォールドとして用いる研究も盛んになっている[7]．

キチンは*N*-アセチルグルコサミンのポリマーでセルロースに次いで自然界に豊富に存在している天然多糖類として，節足動物の外骨格または真菌および酵母の細胞

壁などに存在している．キチンはカニやエビ殻などを酸処理し，殻中の炭酸カルシウムを溶解後，アルカリ性溶液処理でタンパク質を溶解し抽出される．カニに含まれているα型のキチンは斜方晶構造を有しており，安定的な構造を有するため極めて難溶性である．キトサンはD-グルコサミンのポリマーであり，キチンをアルカリ性条件下で脱アセチル化し生成される．キチンおよびキトサン粉末やシート状フィルムは，生体適合性が高く，止血剤，創傷包帯，ドラックデリバリーシステム，人工皮膚など生物医学的用途にすでに利用されている[8-10]．しかし，キチンおよびキトサンは水系溶媒に対して不溶で分散性が低いため応用範囲が限定されていた．

ナノファイバー（NF）とは，直径が1～100 nm，長さが直径の100倍以上の繊維状物質と定義されている．キチンナノファイバー（CNF）およびキトサンナノファイバー（CSNF）は，キチンおよびキトサンを10～20 nmの微細な繊維状構造にし，水系溶媒への分散性を向上させたものである．また，脱アセチル化処理で，一部をキトサン化した表面キトサン化キチンナノファイバー（SDACNF）や酢酸を添加し調製することで水分散性をさらに向上させたものなど様々なNFが簡便に調製できるようになった[11-13]．したがって，今まで応用範囲が限定的であったキチンおよびキトサンの特性を，再生医療分野や化粧品および食品分野にも応用できることが期待されている[9]．これまでにCSNFやCSNFを配合したColの培養基材は肝臓細胞，骨芽細胞，筋肉細胞，神経細胞などの培養基材として有用であることが報告されている[9]．一方，部分的に脱アセチル化された基材であるSDACNFが培養細胞の増殖および分化に与える影響はほとんど検討されていない．そこで本研究ではCNFおよびCSNFに加えてSDACNFの動物培養細胞への適合性を検討し，キチン由来NFの有用性を評価することを目的とした．

2. 実験方法

2.1. 材料

CNF，CSNF，SDACNFはカニ殻由来のキチン粉末（キチンTC-L，甲陽ケミカル，大阪）に水を添加して1%（w/v）としたものを原料として以前の報告と同様に調製した[14]．各NFの脱アセチル化度は，CNFは5%以下，SDACNFは約20%，CSNFは約78%であった．CNFの分子量は粘度法で算出し56,900のものを用いた．Colは豚由来のCell matrix Type I-C（新田ゼラチン，大阪）を用いた．比較は一般的に使用されているプラズマ表面加工により親水性・密着性を向上させたプレートを使用した（WATSON，東京）．

2.2. コーティング方法

SDACNFと超純水または0.5 w/v%酢酸で0.05～1%に調製した．CNF，CSNF，Colは超純水で0.1%に調製した．また，CNF，SDACNF，CSNFの調製液は96 well plate（FALCON，神奈川）に100 µL添加後，インキュベーター内で50°C約5時間静置もしくは室温で乾燥させた．

2.3. 細胞培養方法

細胞株はヒト肝癌由来細胞株（HepG2: 理科学研究所，茨城），ヒト皮膚線維芽細胞（HDF: バイオセラ，ニュアイエ，フランス），ラット好塩基球性白血病細胞（RBL-2H3: JCRB細胞バンク，大阪），マウス前駆軟骨細胞株（ATDC5，理科学研究所，茨城）を用いた．マウス骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC）は雄性7週齢のddyマウス（東京実験動物株式会社，東京）の大腿骨および脛骨の骨髄液から分離した．骨髄液を10%FBS，100 U/mL Penicillin（明治製菓ファルマ株式会社，東京）含有Minimum Essential Medium Alpha Medium（ライフテクノロジーズジャパン，東京）培地で懸濁後，100 µm径のセルストレーナー（FALCON）を用いてろ過し，100 mmディッシュ（FALCON）に播種し，37°C，5%CO_2条件下で培養し，接着細胞をBMSCとした．動物実験は城西大学実験指針の「実験動物の飼育及び保管に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号）に基づいて倫理委員会の承認を得た上で行った（承認番号　第H29070号）．

HepG2は10%FBS含有Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose培地（ライフテクノロジーズジャパン），HDFは10%FBS含有Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose培地（ライフテクノロジーズジャパン），RBL-2H3は，10%FBS含有Eagle's minimal essential medium培地（ライフテクノロジーズジャパン），ATDC5は5%FBS含有Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12培地（ライフテクノロジーズジャパン）を用いて，各々37°C，5%CO_2条件下で培養した．

CNF，SDACNF，CSNFをそれぞれコートした24 well plateに，BMSCを2×10^5 cells/well，HepG2を3×10^4 cells/well，HDFを4×10^4 cells/well，RBL-2H3を2.5×10^5 cells/well，ATDC5を5×10^4 cells/wellで播種し，培養を行った．2～10日間培養後，各細胞の接着性を位相差光学顕微鏡下で観察した．

2.4. 細胞増殖率測定法

SDACNFをコーティングした96 well plateにBMSCを4×10^4 cells/wellで播種し5日間培養した．また，CNF，SDACNF，CSNF，Colをコーティングした96 well plateにATDC5を5000 cells/wellで播種し5日間培養した．培養後，終濃度10%となるようにWST-1（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社，バーゼル，スイス）を添加した培地に全量交換し，5時間37°C，5%CO_2条件下で静置した．5時間後，マイクロプレートリーダー（Spectra Max M2e，日本モレキュラーデバイス株式会社，東京）で440 nmの吸光度を測定した．

2.5. アルカリフォスファターゼ（ALP）活性測定法

CNF，SDACNF，CSNFをコーティングした96 well plateにATDC5を5000 cells/wellで播種し5日間培養した．培地を除去し，細胞を100 µLの10%TritonX含有トリス

塩酸緩衝液（pH9.8）中で，5分間静置し溶解した．4°C 9,730×gで3分間遠心し上清50 μLに50 μLの20 mMパラニトロフェニルリン酸（和光純薬工業，大阪）を添加し37°Cのインキュベーター内で3分間静置した．静置後マイクロプレートリーダーで410 nmの吸光度を測定し，細胞中のALP量の指標とした．

2.6. 統計処理

StatMate III（ATMS，東京）を用いて統計処理を行った．検定はDunnett's Test，Tukey's TestまたはStudent t Testで行った．有意水準は，$p < 0.05$とした．データは平均値±標準誤差として表した．

3. 実験結果

3.1. SDACNFの適合細胞の探索

キチン由来NFの水への分散液はCNFとCSNFは白く濁っており，SDACNFは透明であった．これらの分散液を培養プレート表面上で乾燥させた結果，CNFとCSNFはコーティング面が白く，SDACNFは透明であった（図1A）．5種の動物培養細胞におけるキチン由来NFへの接着性を検討した．HepG2およびHDFは全てのキチン由来NF基材で播種した細胞の約1～2割程度しか接着せず，多くの細胞が凝集し浮遊した（図1B）．RBL-2H3細胞は全ての基材に5割程度接着したものの，培養日数が経過しても細胞の仮足が伸展しなかった．ATDC5とBMSCはCNF基材には5割程度のであったが，SDACNFとCSNFには，8-9割が接着しその後の正常な生着が観測された．また，SDACNF基材の高い透明性により，細胞の形態観察が容易であった．

3.2. SDACNF基材で培養したBMSCの細胞増殖評価

次に，初代細胞であるMSCの細胞増殖に与えるSDACNF培養基材量の影響を検討した．プラズマ処理を施した一般的な細胞培養ディッシュ（コントロール，C）と比較して，0.05%，0.1%，1%のSDACNFコートは細胞増殖をそれぞれ1.14倍，1.21倍，1.16倍と有意に増加させた（図2）．

3.3. SDACNFが軟骨細胞株ATDC5の増殖およびALP活性に与える影響

SDACNFへの接着性が高かったATDC5の増殖および分化に関して，一般的に基材として用いるColと比較し

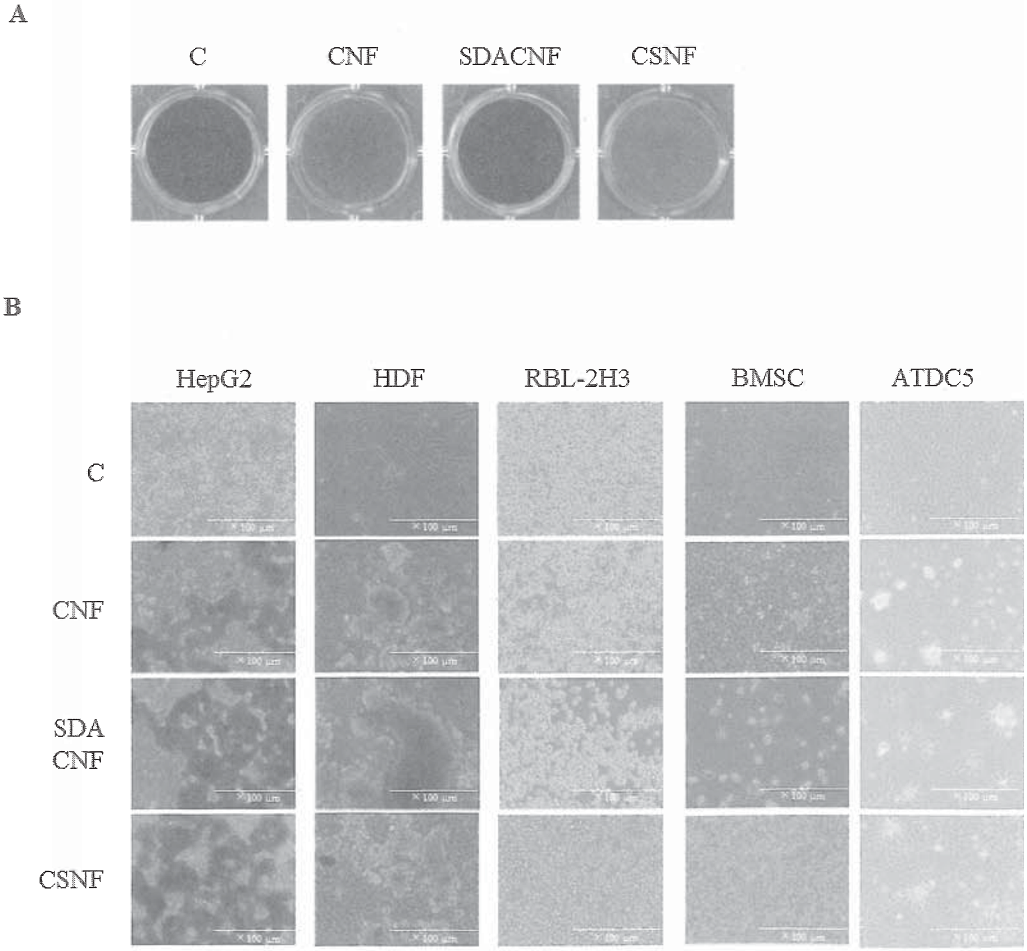

図1　キチン由来NFに適合する細胞の探索.
(A) キチン由来NF基材の写真. (B) 基材へ播種した細胞の写真.
使用した細胞は以下の通りである．HepG2，HDF，RBL-2H3，BMSC，ATDC5．

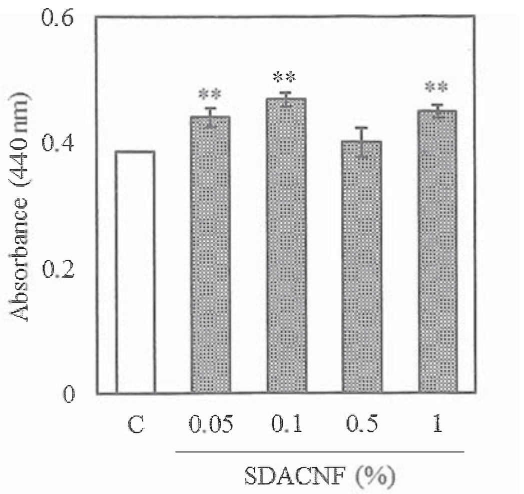

図2　SDACNF基材で培養したBMSCの増殖活性.

Means ± SEM Dunnett's Test ** p <0.01 v.s. Control（C）（n=4）

た．その結果，Cと比較してColおよびSDACNF基材はATDC5の増殖とALP活性を有意に減少させた（図3A, B）．しかし，Colと比較してSDACNF基材はATDC5の増殖を有意に増加させた．また，ColとSDACNFのALP活性に有意な差はなかった．

キチン由来NF基材がATDC5の増殖およびALP活性に与える影響を調べた．その結果，SDACNFはCNFと比較してATDC5の細胞数を有意に増加させ，CSNFと同程度の細胞増殖率だった（図4A）．また，細胞当たりのALP活性を評価した結果，SDACNFとCNFはCと比較して，細胞当たりのALP活性が有意に高値を示した（図4C）．

3.4. SDACNFへの酢酸添加がATDC5の増殖および分化に与える影響

SDACNFの0.5%酢酸溶液から調製したSDACNF基材のプレートはSDACNFの水溶液でコートしたプレートと比較して透明度が向上した（図5A）．ATDC5の細胞増殖に与える影響を検討した結果，基材調製時に水のみを使用したSDACNFはCと比較して細胞増殖が有意に低下したが，基材調製時に酢酸を使用した0.5%および1%SDACNFはATDC5の増殖をCと比較して有意に増加させた（図5B）．ALP活性に与える影響を検討した結果，純水および酢酸調製のSDACNFはともにCと比較してALP活性を有意に抑制した（図5C）．一方，細胞当たりのALP活性を比較した結果，酢酸調製したSDACNFは純水調製したSDACNFと比較してATDC5のALP活性を抑制した（図5D）．

4. 考　察

キチンおよびキトサンは生物由来の成分として医療応用が期待されている．しかし，キチンおよびキトサンは難溶性であるため，縫合糸や止血剤，薬の輸送単体として利用されてきたが，応用範囲が限定されていた．キチンやキトサンはNF化することにより水系に分散することから，応用範囲が拡大した．本研究ではキチン由来NFでの動物培養細胞の基材としての有用性を評価した．

キチン由来NF基材に適合する細胞を探索した結果，BMSCとATDC5がSDACNFとCSNF基材への接着性が高いことを見出した．CSNFとSDACNFにはアミノ基が存在しておりその表面電荷が細胞接着に関与した可能性がある．SDACNFを基材としたATDC5の増殖およびALP活性は培養基材として最も利用されているColと同等以上であった．培養基材に関する研究では，基材の弾性や繊維幅繊維間隙などが接着に影響を与えることが報告されている[15,16]．SDACNFとCSNFには電荷の反発による弾性や間隙の効果がある可能性がある．CSNFよりもSDACNFが軟骨細胞の接着性向上および細胞増殖促進作用を示した詳しい理由は不明である．本研究ではCSNFとSDACNFの分子量は測定していないため，今後分子量の差が軟骨細胞の接着性向上および細胞増殖作用に関与している可能性を検討する必要がある．

ATDC5は前駆軟骨細胞から軟骨細胞への分化を再現できる細胞株である．軟骨細胞は分化過程でALP活性が増加することから，ALP活性は軟骨分化の指標になる[17]．本研究でCNF，SDACNFにATDC5の分化促進作用があることが示された．一方，SDACNFの調製時に酢酸を使用すると，ATDC5の細胞増殖を促進させ，分化を抑制した．この結果から，SDACNF基材の調製法を工夫することで，ATDC5の増殖未分化を制御できる可能性が示された．今後はさらに軟骨細胞の幹細胞であるBMSCを用いた応用に興味が持たれる．

酢酸を使用して調製することによりSDACNFがATDC5の増殖を促進させた要因としてはSDACNFの表面状態が関与していると考えられる．SDACNFは水に分散するが，濁った状態である．これに酢酸を添加すると液が透明となった．これは酢酸がSDACNFのアミノ基を中和してアンモニウム塩に変換して水に対する親和性とそれに伴う分散性を向上させたためであると考えられる．このSDACNFの酢酸分散液を培養プレートに塗布して乾燥させるとその表面は均一となり透明のままプレートにコートされた．この乾燥時に酢酸が揮発する過程でSDACNFのアミノ基が培養表面側に配向した可能性がある．この表面に並んだアミノ基のプラス電荷と細胞膜リン脂質のマイナス電荷と静電結合が細胞の接着性を増大したと考えられる．今後，酢酸で調製したCSNFとSDACNFを比較する必要がある．また，細胞接着には基材の電荷だけではなく繊維幅や繊維間隙，配向，弾性などの力学的な特性に加えカルシウムイオンの保持供給など様々な要因が関係している可能性がある[15,16,18]．今後はSDACNFへの軟骨細胞接着性向上および細胞増殖促進作用に与えるメカニズムをインテグリンなどの細胞接着因子やアクチンフィラメントの伸縮性を評価することなどで検討する必要がある．

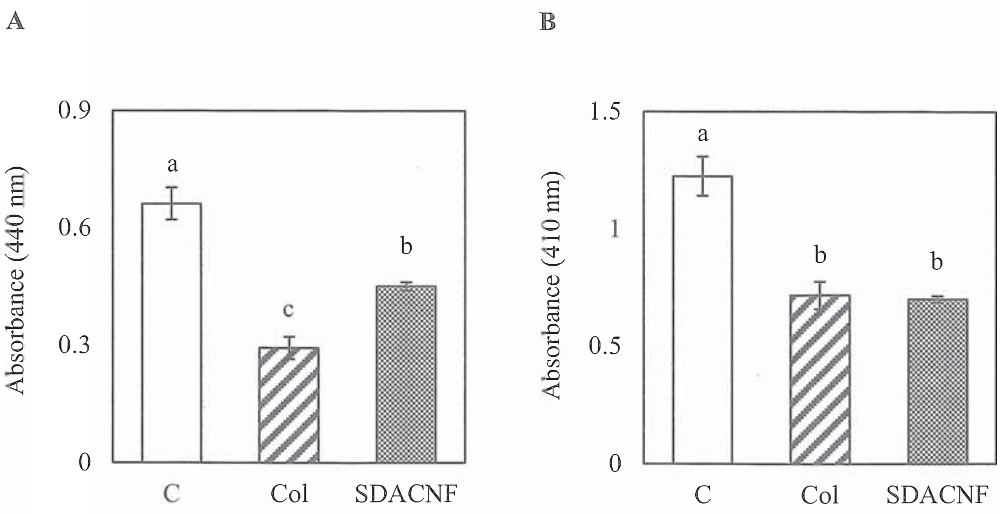

図3　コラーゲン（Col）とSDACNFの基材で培養したATDC5への影響の比較.
（A）増殖活性（WST-1法）.（B）分化能（ALP活性試験）.

Means ± SEM Tukey's Test p <0.01（n=4）

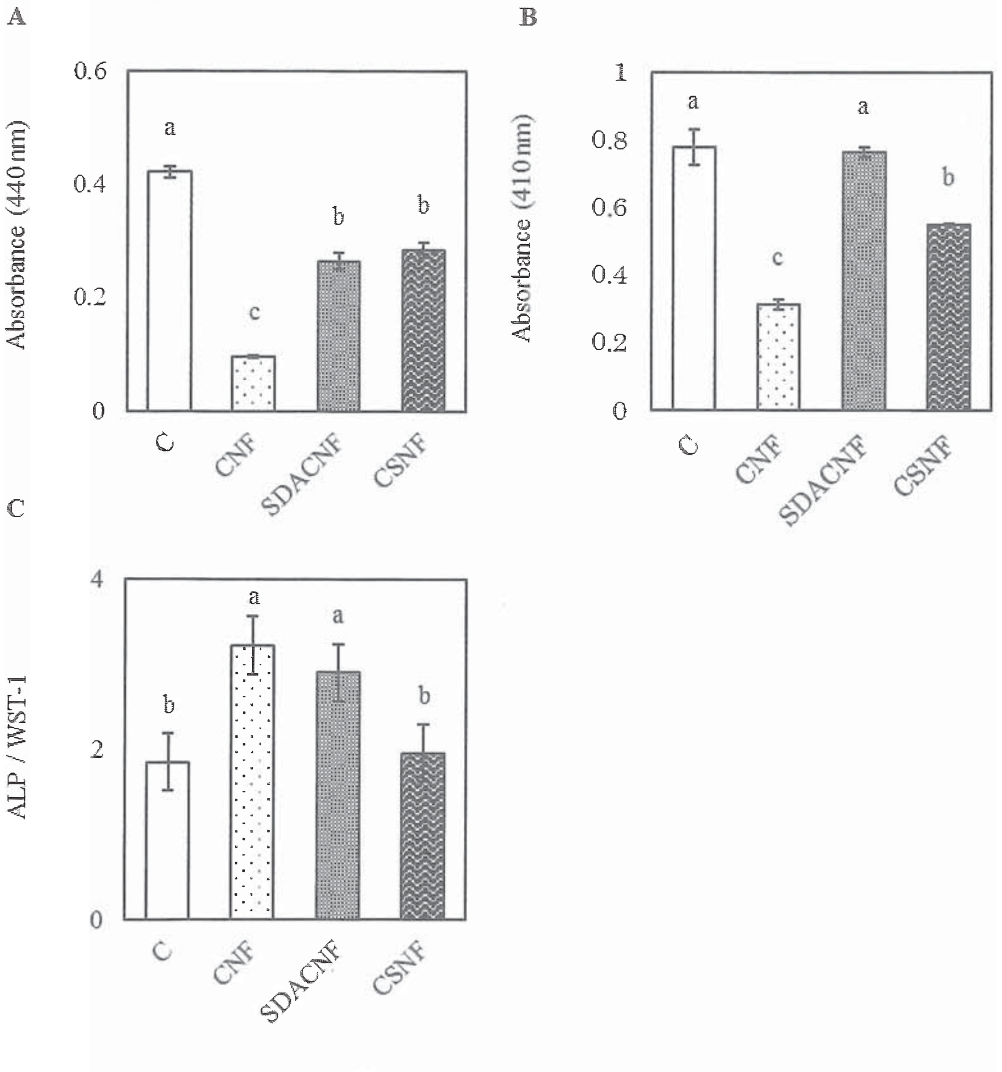

図4　キチン由来NF基材が軟骨前駆細胞ATDC5に与える影響.
（A）増殖活性（WST-1法）.（B）分化能（ALP活性試験）.（C）細胞当たりの分化能.

Means ± SEM Tukey's Test *p* <0.01（n=4）

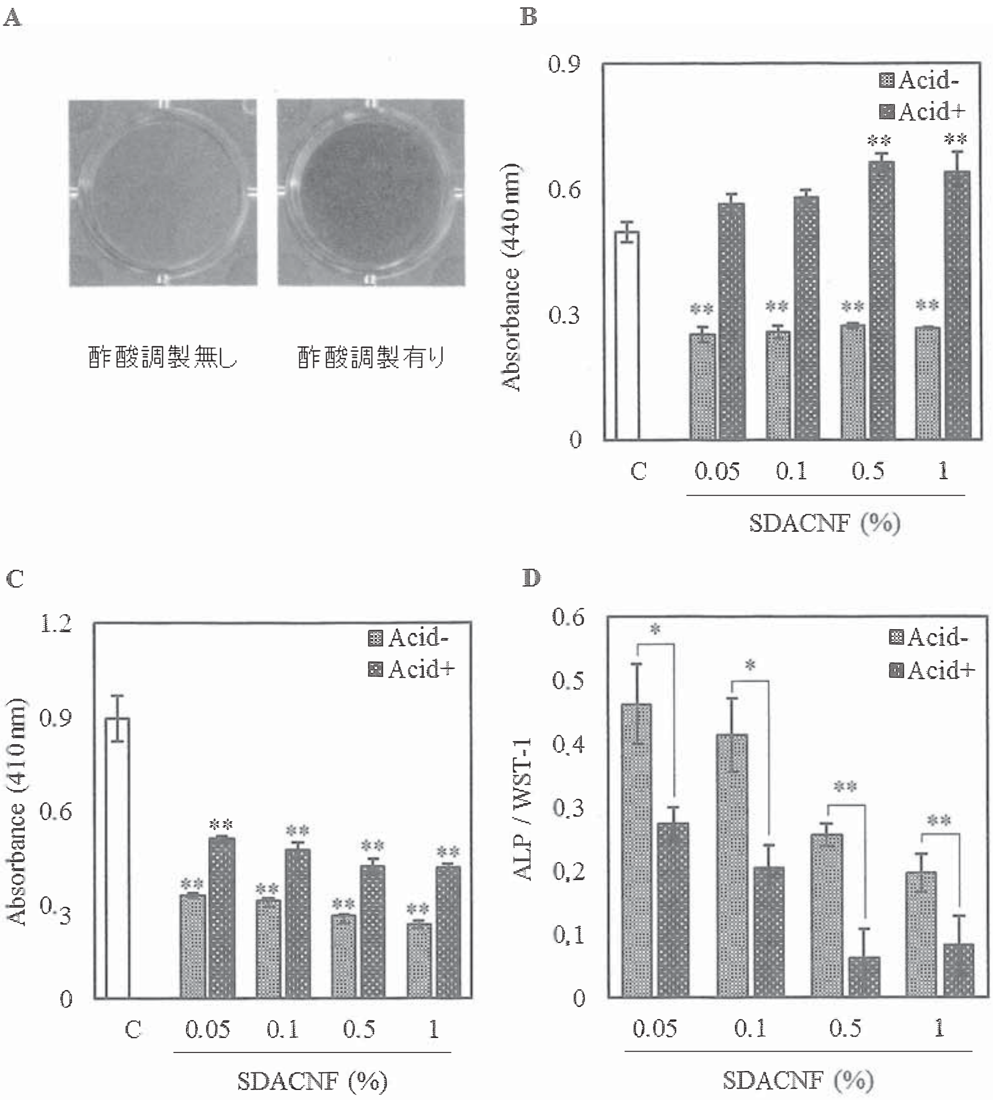

図5　酢酸を使用して調製したSDACNF基材におけるATDC5の増殖・分化に与える影響.
(A) 水のみ (左) または酢酸を使用 (右) して調製したSDACNFのコーティングプレートの写真.
(B) 増殖活性 (WST-1法). (C) 分化能 (ALP活性試験). (D) 細胞当たりの分化能.

Means ± SEM Dunnett's Test $**p<0.01$ (n=4), Means ± SEM Student t Test $*p<0.05$ $**p<0.01$ (n=4)

まとめ

本研究ではキチン由来NFの動物細胞に対しての培養基材としての有用性を評価することを目的とした．酢酸を使用して調製したSDACNF基材は軟骨細胞の接着効率を増加させ，細胞増殖を促進させることを明らかにした．軟骨組織は自己修復能が低いため，再生医療による培養および移植が期待されている組織である．本研究で用いたSDACNFを培養基材として利用することで，効率的な軟骨細胞の増殖に有用である可能性が示された．

文献

1) A. Pitchaimani, T.D.T. Nguyen, M. Koirala, Y. Zhang, S. Aryal, Impact of cell adhesion and migration on nanoparticle uptake and cellular toxicity, Toxicol In Vitro 43 29-39, 2017.

2) A. Suzuki, A. Iwama, H. Miyashita, H. Nakauchi, H. Taniguchi, Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells, Development 130(11) 2513-24, 2003.

3) Y. Zhou, J.C. Horowitz, A. Naba, N. Ambalavanan, K. Atabai, J. Balestrini, P.B. Bitterman, R.A. Corley, B.S. Ding, A.J. Engler, K.C. Hansen, J.S. Hagood, F. Kheradmand, Q.S. Lin, E. Neptune, L. Niklason, L.A. Ortiz, W.C. Parks, D.J. Tschumperlin, E.S. White, H.A. Chapman, V.J. Thannickal, Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease, Matrix Biol 73 77-104, 2018.

4) P. Viswanathan, M.G. Ondeck, S. Chirasatitsin, K. Ngamkham, G.C. Reilly, A.J. Engler, G. Battaglia, 3D surface topology

guides stem cell adhesion and differentiation, Biomaterials 52 140-7, 2015.

5) R. Fraioli, F. Rechenmacher, S. Neubauer, J.M. Manero, J. Gil, H. Kessler, C. Mas-Moruno, Mimicking bone extracellular matrix: integrin-binding peptidomimetics enhance osteoblast-like cells adhesion, proliferation, and differentiation on titanium, Colloids Surf B Biointerfaces 128 191-200, 2015.

6) M. Ahmed, C. Ffrench-Constant, Extracellular Matrix Regulation of Stem Cell Behavior, Curr Stem Cell Rep 2 197-20, 2016

7) D. Diekjurgen, D.W. Grainger, Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems, Biomaterials 141 96-115, 2017.

8) E. Szymanska, K. Winnicka, Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications, Mar Drugs 13(4) 1819-46, 2015.

9) I. Younes, M. Rinaudo, Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, Mar Drugs 13(3) 1133-74, 2015.

10) K. Madhumathi, P.T. Sudheesh Kumar, S. Abhilash, V. Sreeja, H. Tamura, K. Manzoor, S.V. Nair, R. Jayakumar, Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications, J Mater Sci Mater Med 21(2) 807-13, 2010.

11) C. Chen, Y. Wang, Y. Yang, M. Pan, T. Ye, D. Li, High strength gelatin-based nanocomposites reinforced by surface-deacetylated chitin nanofiber networks, Carbohydr Polym 195 387-392, 2018.

12) S. Ifuku, M. Nogi, K. Abe, M. Yoshioka, M. Morimoto, H. Saimoto, H. Yano, Preparation of chitin nanofibers with a uniform width as alpha-chitin from crab shells, Biomacromolecules 10(6) 1584-8, 2009.

13) S. Ifuku, H. Saimoto, Chitin nanofibers: preparations, modifications, and applications, Nanoscale 4(11) 3308-18, 2012.

14) S. Ifuku, Chitin and chitosan nanofibers: preparation and chemical modifications, Molecules 19(11) 18367-80, 2014.

15) T. Hoshiba, C. Yoshikawa, K. Sakakibara, Characterization of Initial Cell Adhesion on Charged Polymer Substrates in Serum-Containing and Serum-Free Media, Langmuir 34(13) 4043-4051, 2018.

16) C. Lee-Thedieck, N. Rauch, R. Fiammengo, G. Klein, J.P. Spatz, Impact of substrate elasticity on human hematopoietic stem and progenitor cell adhesion and motility, J Cell Sci 125(Pt 16) 3765-75, 2012.

17) J. Frisch, P. Orth, J.K. Venkatesan, A. Rey-Rico, G. Schmitt, D. Kohn, H. Madry, M. Cucchiarini, Genetic Modification of Human Peripheral Blood Aspirates Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Articular Cartilage Repair with a Focus on Chondrogenic Transforming Growth Factor-beta Gene Delivery, Stem Cells Transl Med 6(1) 249-260, 2017.

18) M. Sotomayor, K. Schulten, The allosteric role of the Ca switch in adhesion and elasticity of C-cadherin, Biophys J 94(12) 4621-33, 2008.

西潟　怜（Rei NISHIGATA）

2017年3月　城西大学薬学部薬科学科 卒業
2019年3月　城西大学薬学研究科薬科学専攻 修了