

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14493

研究課題名(和文)三次元パターンを用いた曲率認識タンパク質群の単一細胞スクリーニング

研究課題名(英文)Single cell screening of the curvature recognition protein group using a 3D micropattern

研究代表者

角南 寛 (Sunami, Hiroshi)

琉球大学・医学部・特命助教

研究者番号：50374723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、異方的ドライエッチングと等方的ドライエッチングを組み合わせることで、凹凸マイクロパターン表面の突出部のカーブの曲率を10 nmから1000 nmの範囲で自在に作り分けることに成功した。次に、この凹凸マイクロパターン上で、NIH3T3細胞などの培養を行い、単一細胞内にさまざまな曲率のカーブを創り出す技術を確立した。更に、単一細胞内に創り出されたさまざまな曲率のカーブから発せられる生化学的なシグナルの観察を行った。生化学的なシグナルの観察は、膜タンパク質および低分子量Gタンパク質の発現を時空間的に追跡することで行われた。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in making the projecting portion with various curvatures (from 10 nm to 1000 nm) on a micropattern surface by using anisotropic dry etching and isotropic dry etching. Next, we could establish the technology which can create the membrane curves with various curvatures in a single cell, by just culturing cells on the micropattern. Moreover, it was observed the biochemical signals from the curves with various curvatures in the single cell. The observation of the biochemical signals were performed by tracking spatiotemporally the expression of membrane proteins and small G-proteins.

研究分野：複合領域

キーワード：細胞バイオメカニクス バイオMEMS 細胞足場基材 細胞膜形態 BARドメイン 細胞膜カーブ カーブ
認識 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、カーブした細胞膜に集まる膜タンパク質群が次々に報告され、これらのタンパク質群がどのようなカーブに集まるのか、カーブ形成のメカニズムとあわせて研究が進められている。現在までに、これらのタンパク質群は、認識するカーブの曲率が異なることが人工的なリポソームを用いた研究により明らかにされている。本研究は、人工的なリポソームではなく生きた細胞で曲率認識タンパク質群をスクリーニングすることを目指している。まず、凹凸マイクロパターンを用いて単一細胞内にさまざまな曲率のカーブをいくつも創り出し、次に、そのカーブごとに集まったタンパク質を観察する。更に、さまざまな曲率のカーブにおいて、どのような低分子量 G タンパク質が活性化しているのか時空間的にイメージングする。

2. 研究の目的

これまで、カーブした膜を研究するには、人工的なリポソームを用いるしか選択肢がなかった。そのため、生きた細胞でカーブした膜を創るアプローチは非常に独創的である。生きた細胞でカーブした膜を創ることで、リポソームでは不可能だったカーブから生じる生化学的なシグナルを観察できるようになる。本研究は、単一細胞内に異なる曲率の膜を調製できる点においても大きな利点を持っている。単一細胞内のさまざまな曲率のカーブを同時に調査できれば、細胞の接着形態や周期などの個体差に応じた評価ができるからである。

本研究は、凹凸マイクロパターンを用いて単一細胞内にさまざまな曲率のカーブを自在に創り出し、カーブに局在するタンパク質を顕微鏡観察することで、カーブの持つ生化学的な意義を明らかにする。

3. 研究の方法

我々は、凹凸マイクロパターン上で細胞を培養し、パターン形状によって細胞膜のカーブの曲率が変化することをこれまでの研究で見いだしていた。パターン形状を調節することで細胞膜のカーブの曲率を制御可能であることも既に掴んでいた。これらの実績があったからこそ、凹凸マイクロパターンを利用して膜のカーブの曲率を制御する着想、および単一細胞内に曲率の異なるカーブを連続して形成させる発想を得ることができた。本研究は、凹凸マイクロパターンの形状によって細胞膜のカーブの曲率を変化させる技術を開発し、これまで明らかにされていない細胞膜のカーブの曲率とタンパク質の局在との相関関係を明らかにする。最終的には、カーブの持つ生化学的な意義を低分子量 G タンパク質の活性化に焦点を絞って明らかにする。

まず、我々は、細胞膜に望む曲率のカーブを自在に創り出す凹凸マイクロパターンを

フォトリソグラフィ技術により作製した。(この方法は我々の独自技術であり本研究の根幹であるが、特許出願を予定しているため、一切記述できない。)作製されたカーブを FE-SEM によって観察し、カーブの直径を計測した。

次に、上述の凹凸マイクロパターンの上に NIH3T3 や HaCaT、MEF、HeLa、HUVECs、ADSCs を 1 万 cells/cm² で播種し、播種から 12 h 後に各種プラスミドを導入した。導入されたプラスミドは、F-BAR ドメインを持つ Amphiphysin やカベオラを形成する Caveolin、EGF receptor、Insulin receptor、Raihu-HRas、Raihu-RhoA などのものである。プラスミドが導入された細胞は 48 h から 72 h 程度培養 (37 °C, 5%CO₂) され、細胞内に上述のタンパク質を過剰発現させた。培養終了後、直ちに固定化し、必要に応じて抗体染色を行った。

カーブに集まるタンパク質およびその活性化は共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-1000D (オリンパス株) によって三次元的に観察された。

4. 研究成果

凹凸マイクロパターンの突出部のカーブの直径を 10 nm から 1000 nm の範囲で自在に作り分けることに成功した。(この方法は我々の独自技術であり本研究の根幹であるが、特許出願を予定しているため、一切記述できない。)突出部の先端のカーブの直径が 50 nm の凹凸マイクロパターンの例を図 1 に示す。こういった凹凸マイクロパターンを用いて、NIH3T3 や HaCaT、MEF、HeLa、HUVECs、ADSCs などの単一細胞内にさまざまな曲率のカーブを創り出すことにも成功した。

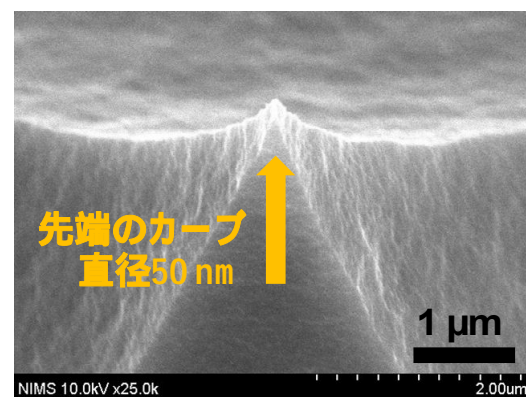


図 1 凹凸マイクロパターン先端のカーブの FE-SEM 像 (鳥瞰)

次に、凹凸マイクロパターンによって創り出された生きた細胞内のさまざまな曲率のカーブに、曲率認識能を持つタンパク質が集まることを見いだした。その中には F-BAR ドメインを持つ Amphiphysin やカベオラを形成する Caveolin など含まれる。

Amphiphysin が直径 50 nm のカーブに集積した例を図 2 に示す。この現象は、カベオラを形成するカベオリンでも確認されており、凹凸マイクロパターンによって曲率認識タンパク質の局在を制御できることを示唆している。

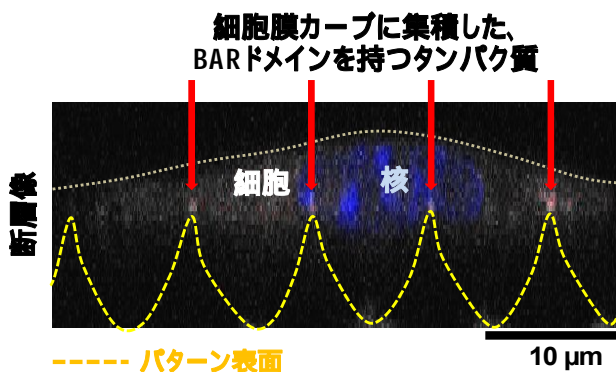


図 2 凹凸マイクロパターン先端のカーブに集積した NIH3T3 細胞の Amphiphysin(赤色)の共焦点顕微鏡像(断層像)

更に、単一細胞内に創り出されたさまざまな曲率のカーブから発せられる生化学的なシグナルの観察を行った。(この方法および結果は、我々の独自技術であり本研究の根幹であるが、特許出願を予定しているため詳細を記述できない。)生化学的なシグナルの観察は、膜タンパク質の集積および低分子量 G タンパク質の活性化を共焦点レーザー走査型顕微鏡によって三次元的に観察することで行われた。その結果、Amphiphysin や Caveolin が集積する曲率のカーブ、EGF receptor や Insulin receptor は集積する曲率のカーブがあることが分かった。また、HRas と RhoA は、リン酸化されるカーブの曲率が異なることが分かった。以上、膜タンパク質 (Amphiphysin, Caveolin) や膜受容体 (EGF receptor, Insulin receptor) の局在、低分子量 G タンパク質 (Ras, Rho) のリン酸化に細胞膜のカーブの曲率が大きく関与していることが明らかにされた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Sunami H, Shimizu Y, Denda J, Yokota I, Yoshizawa T, Uechi Y, Nakasone H, Igarashi Y, Kishimoto H, Matsushita M, "Modulation of surface stiffness and cell patterning on polymer films using micropatterns", *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 2018 Apr;106 (3): 976-985. (査読あり)

Sunami H, Shimizu Y, Yokota I, Igarashi Y, Kishimoto H, Matsushita M, "Live Cell

Migration Imaging on a Microfabricated Silicon Wafer", *Hyomen Kagaku*, 2017, 38(9):473-478. (査読あり)

[学会発表](計 13 件)

野村 紘史, 清水 雄介, 友利 新, 角南 寛, 培養上清を利用した化粧品の開発, 第 132 回 日本美容外科学会 学術集会 (沖縄県南風原町), June 2018.

野村 紘史, 清水 雄介, 角南 寛, 琉球大学における再生医療研究成果の産業化の取り組み, 第 17 回 日本再生医療学会総会 (神奈川県横浜市), March 2018.

H. SUNAMI, Y. SHIMIZU, Y. IGARASHI, T. TABELI, S. YOKOYAMA, H. KISHIMOTO, M. MATSUSHITA, H. ISHIDA, Control of cellular functions using micro-patterned scaffolds, The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering (Tokyo, Japan), November 2017.

清水 雄介, 野村 紘史, 角南 寛, 培養ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた臨床研究 - 研究初心者によるゼロからのスタート -, 第 32 回 日本整形外科学会基礎学術集会 (沖縄県宜野湾市), October 2017.

清水 雄介, 野村 紘史, 山崎 俊, 竹丸 雅志, 田村 健, 稲澤 今日子, 角南 寛, 再生医療における資金獲得 ~ 産官学連携の重要性 ~, 第 26 回 日本形成外科学会基礎学術集会 (大阪市北区), October 2017.

H. SUNAMI, Y. SHIMIZU, J. DENDA, I. YOKOTA, Y. IGARASHI, H. KISHIMOTO, M. MATSUSHITA, H. ISHIDA, Modulation of stiffness and cell patterning using micropatterned films, TERMIS-AP (Nantong, Jiangsu, China), September 2017.

H. SUNAMI, Y. SHIMIZU, Y. IGARASHI, H. KISHIMOTO, M. MATSUSHITA, Development of a new scaffold technology for regenerative therapy, International Biomedical Interface Symposium (Taipei, Taiwan), March 2017.

H. SUNAMI, J. DENDA, I. YOKOTA, Y. UECHI, H. NAKASONE, T. YOSHIZAWA, Y. IGARASHI, Y. SHIMIZU, Modulation of surface elasticity and cell patterning on polymer films by using micropatterns, 3rd ICoBT (London, UK), September

2016.

H. SUNAMI, J. DENDA, I. YOKOTA, H. NAKASONE, Y. IGARASHI, R. KUBA, Y. SHIMIZU, Development of a new cell separation method using micropattern, TERMIS-AP (Tamsui, Taipei, Taiwan), September 2016.

角南 寛, 安全で良質な再生医療用細胞を大量生産する培養容器の開発, 第 5 回 TOBIRA 研究交流フォーラム (東京都千代田区), June 2016.

角南 寛, 形に起因するメカニカルストレスの向きを利用した再生医療研究, 7th Biomedical Interface Workshop (沖縄県石垣市), March 2016.

H. SUNAMI, I. YOKOTA, H. NAKASONE, Y. IGARASHI, Development of a new taxis assay using three-dimensional patterns, 6th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues (Waikoloa, Hawaii, USA), December 2015.

角南 寛, 三次元パターンを用いた細胞抽出システムの開発, プロセスインテグレーションによる次世代名のシステム創製「3領域合同公開シンポジウム」(東京都品川区), September 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
なし

○出願状況 (計 1 件)

名称 : METHOD FOR CULTUREING MESENCHYMAL STEM CELL BY USING NONWOVEN SHEET FORMED OF SYNTHETIC FIBERS
発明者 : Hiroshi Sunami et al.
権利者 : University of Ryukyus, ORTHOREBIRTH CO. LTD.
種類 : US Provisional Patent Application
番号 : No. 62/636,056
出願年月日 : February 27, 2018
国内外の別 : 国外

○取得状況 (計 2 件)

名称 : 動物細胞の運動方向の制御基材、当該基材を用いた細胞の識別及び細胞の分離方法
発明者 : 角南 寛、横田 育子
権利者 : 国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)

種類 : 特許
番号 : 特許第 6128620 号
取得年月日 : 平成 29 年 4 月 21 日
国内外の別 : 国内

名称 : 動物細胞用構造体、動物細胞の分離方法及び動物細胞用構造体表面の弾性調節法
発明者 : 角南 寛、横田 育子
権利者 : 国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)
種類 : 特許
番号 : 特許第 6226338 号
取得年月日 : 平成 29 年 10 月 20 日
国内外の別 : 国内

〔その他〕
なし

6 . 研究組織
(1)研究代表者
角南 寛 (SUNAMI Hiroshi)
琉球大学・医学部・特命助教
研究者番号 : 50374723

(2)研究分担者
村上 明一 (MURAKAMI Akikazu)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 00733635

(3)研究分担者
石田 昌義 (ISHIDA Masayoshi)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号 : 50643251