

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16559

研究課題名(和文) ペプチドゲルを足場とした細胞三次元培養と細胞外pH環境の蛍光イメージング法の確立

研究課題名(英文) 3D culture of cells and fluorescent imaging of extracellular environment using self-assembling peptide gels

研究代表者

堤 浩 (Tsutsumi, Hiroshi)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70398105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：両親媒性に設計した自己組織化ペプチドu(FFiK)2がβ-シート構造を形成してナノファイバーへと自己組織化し、中性条件下で透明なヒドロゲルを形成することを明らかにした。またu(FFiK)2は細胞培養に用いる培地でもヒドロゲルを形成でき、HeLa細胞およびHEK293細胞をゲル内に分散させることに成功した。次に、シート状に成型したu(FFiK)2ゲル上で、HEK293細胞、HeLa細胞、HepG2細胞、MCF7細胞、HT-29細胞などさまざまな細胞が培養可能であることを明らかにした。また、ファイバー状に成型したペプチドゲル上でHEK293細胞およびHeLa細胞を立体的に培養できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Self-assembling peptide u(FFiK)2 was designed as an amphiphilic peptide and synthesized. u(FFiK)2 assembled into nanofibers with a β-sheet structure and formed transparent hydrogels under physiological condition. HeLa and HEK293 cells were encapsulated in u(FFiK)2 hydrogels without cytotoxicity. Various cells, HeLa, HEK293, HepG2, MCF7 and HT-29 were successfully cultured on hydrogel sheets of u(FFiK)2. In addition, HeLa and HEK293 cells were cultured on hydrogel fibers of u(FFiK)2.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ペプチド 自己組織化 ヒドロゲル 細胞 三次元培養 イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞の蛍光イメージング技術の進展により、pH や温度、活性酸素種などの生理活性小分子、タンパク質などの生体分子、核やミトコンドリアといった細胞小器官などを生きた細胞でリアルタイムにイメージングすることが可能になり、非常に高度な細胞機能の解析が精力的に行われている。しかしながら、従来のイメージングはほとんどが細胞内や細胞表面のみで行われており、離れた細胞間や細胞集団の間に存在する空間、すなわち「細胞外環境」はイメージングの対象とされていない。細胞外には、細胞の活動に大きな影響を与える pH や温度の分布があると考えられる。また、細胞が自身の成長や分化に必要な細胞外マトリックスや成長因子を産生して能動的に増殖や分化に適した環境を形成し、サイトカインや情報伝達物質を分泌して空間を介した細胞間コミュニケーションを成立させていることが明らかにされつつある。さらに、がん転移などに見られる細胞の移動過程にはプロテアーゼ分泌による細胞外マトリックスの分解や細胞外における遊走因子の濃度勾配形成が関与している。よって、細胞の増殖・分化・移動・細胞間コミュニケーションなどに大きく影響する細胞外環境をリアルタイムにイメージングすることは非常に重要である (図 1)。

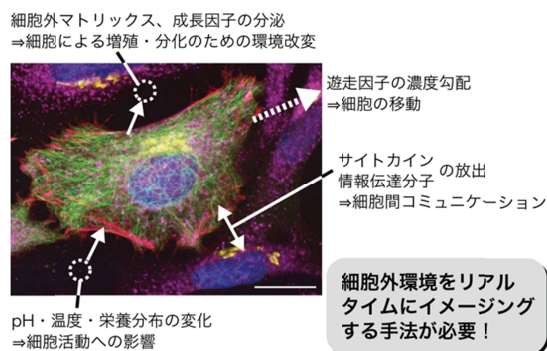


図 1. 細胞中のタンパク質・小器官などのマルチカラー蛍光イメージングとイメージング対象と成り得る細胞外環境の例

近年、再生医療に向けて細胞工学・組織工学が急速に進展し、細胞集団を三次元的に培養して神経などの組織のモデル構築が可能になりつつあることを踏まえると、三次元の空間的な広がりをもった細胞外環境をイメージング・解析する手法の開発が必要である。しかしながら、ほとんどの細胞イメージングは開かれた平面培養環境下で行われているため、細胞活動に由来する不均一な細胞外環境をリアルタイムにイメージングすることは非常に難しかった。

2. 研究の目的

我々はこれまで、疎水性相互作用・静電相互作用・水素結合などを適切に組み合わせて設計したペプチドが水中で自発的に規則正しく集合し、ナノメートルからマイクロメー

トルにおよぶ精密なファイバー様構造体を形成することを見出してきた。また安定な自己組織化能を有しているペプチドは、さまざまな機能ユニットを導入しても自己組織化が可能であり、共組織化により機能ユニットを提示したファイバーを形成することができることを実証してきた。その結果、機能ユニットとして細胞の接着や増殖、分化を促進する生理活性分子を導入することにより、細胞を三次元培養するための適切な環境を提供するヒドロゲル足場材料の構築が可能になり、また、機能ユニットとして蛍光プローブ・センサーをもった自己組織化ペプチドを共組織化させることにより、ヒドロゲル内の空間にこれらのプローブを自在にレイアウトして細胞外環境を解析することができる考えた。そこで、設計ペプチドの自己組織化により構築されるファイバー様構造体からなるヒドロゲルを人工足場材料として利用することを考案した。まず三次元培養における細胞外環境のリアルタイムイメージングのモデルシステム構築を目指し、本研究では細胞の接着・増殖を促進する生理活性ペプチドを導入した自己組織化ペプチドゲルを足場として細胞三次元培養と、pH をイメージング対象とした細胞外 pH 環境のリアルタイムイメージングを行うことを目的とした (図 2)。

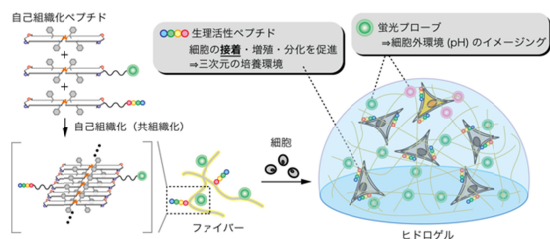


図 2. 自己組織化ペプチドからなるヒドロゲルを足場材料とした細胞の三次元培養と細胞外環境イメージングの概略

3. 研究の方法

(1) 自己組織化ペプチドの合成と機能評価

両親媒性に設計した自己組織化ペプチド $u(\text{FFiK})_2$ および $u(\text{FFiO})_2$ を合成し、これらの自己組織化能を評価した (図 3a)。これらのペプチドは diphenylalanine (FF) の疎水性相互作用、中心のウレア結合が形成する水素結合ネットワーク、末端に配した Lys または Orn のイオンペアの静電相互作用により水中、中性条件下で β -シート構造となってファイバー様のナノ構造体へと自己組織化しゲルを形成すると期待した (図 3b)。合成したペプチドの自己組織化能は、以下に示す構造解析により評価を行った。

- ・二次構造 (β -シート構造) : 円偏光二色性スペクトル測定
- ・ナノ構造 : 透過型電子顕微鏡
- ・ゲル形成 : 倒立法

次に、 $u(\text{FFiK})_2$ の pH 応答的ゲル形成能を利

用して、ヒドロゲルの成型実験を行った。24ウェルのマイクロプレート上に薄く広げたペプチド溶液に対して細胞培養用の培地を添加することによりシート状ゲルを成型した。また、シリンジを用いてペプチド溶液を培地に射出することによりゲルファイバーを成型した。さらに、シリンジ筒の中でペプチドゲルを調製し、円筒形ペプチドゲルの成型を行った。

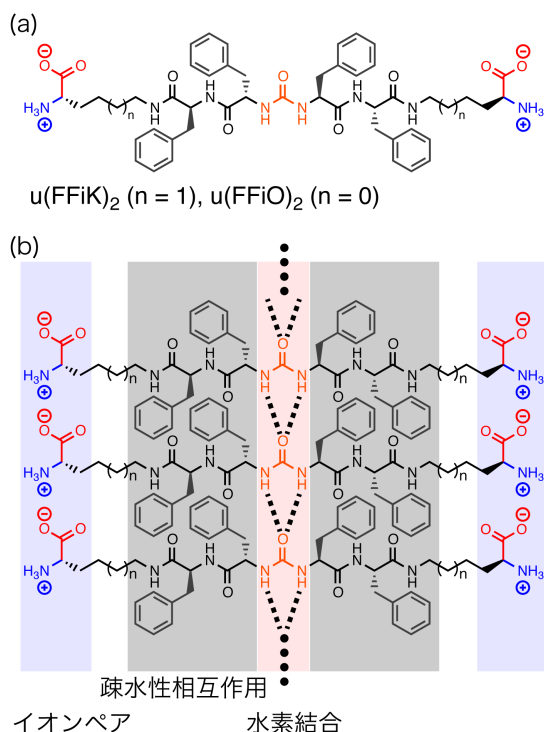


図3. (a) 自己組織化ペプチドの構造. (b) 自己組織化の模式図.

(2) 自己組織化ペプチドゲルの細胞培養への応用

モデル細胞として、がん組織由来の HeLa 細胞、HepG2 細胞、MCF7 細胞、HT-29 細胞および正常組織由来の HEK293 細胞を用いた。自己組織化ペプチドゲルの細胞培養への適合性を検討するため、シート状に成型したペプチドゲル上でこれらの細胞の接着と増殖および細胞毒性について評価した。生細胞を選択的に蛍光染色する試薬を用いて蛍光顕微鏡による観察を行った。また、死細胞を選択的に蛍光染色する試薬を用いて、蛍光顕微鏡で観察することにより細胞毒性についても評価した。次に、ファイバー状に成型したペプチドゲルを用いて HeLa 細胞および HEK293 細胞の立体的培養について検討した。評価は上記と同様に生細胞を蛍光染色して顕微鏡観察により行った。さらに、円筒形ゲルの中に HeLa 細胞と HEK293 細胞を分散・内包させ、三次元培養についても検討を行った。

4. 研究成果

円二色性スペクトル測定および透過型電子顕微鏡観察の結果、合成したペプチドはすべてβ-シート構造を形成してナノファイバーへと自己組織化することを明らかにした(図4)。また、ゲル化試験の結果、自己組織化ペプチド $u(\text{FFiK})_2$ および $u(\text{FFiO})_2$ は pH 応答的に自己組織化し、中性条件下で透明なヒドロゲルを形成することを見出した。特に、 $u(\text{FFiK})_2$ は 0.05wt% という低濃度でもヒドロゲルを形成できることがわかった(図5)。 $u(\text{FFiK})_2$ は優れたゲル化能を示し、シート状やファイバー状、円筒状などの様々な形状のゲルを形成可能であった。さらに、 $u(\text{FFiK})_2$ は細胞培養に用いる培地でもヒドロゲルを形成できることを確認した。

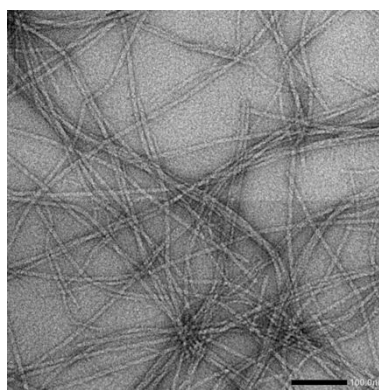


図4. $u(\text{FFiK})_2$ の透過型電子顕微鏡イメージ. スケールバーは 100 nm

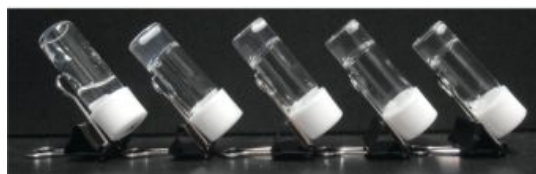


図5. $u(\text{FFiK})_2$ のゲル化試験. 左から、水、0.5wt%、0.2wt%、0.1wt%、0.05wt%.

シート状に成型した $u(\text{FFiK})_2$ ゲル上で HeLa 細胞、HepG2 細胞、MCF7 細胞、HT-29 細胞および HEK293 細胞の培養を検討した結果、いずれの細胞も培養可能であることがわかった。特に、HepG2 細胞については、汎用される培養ディッシュと比べて、ペプチドゲル上では細胞増殖が促進されることがわかった。

次に、ファイバー状に成型した $u(\text{FFiK})_2$ ゲル上における細胞培養について検討した結果、HeLa 細胞および HEK293 細胞が接着し、増殖する様子を確認することができた(図6)。さらに、円筒形に成型したペプチドゲルの中に HeLa 細胞および HEK293 細胞を分散して内包することに成功した。この際、ペプチドゲルは細胞に対して毒性を示さなかった。

以上の結果から、自己組織化ペプチド $u(\text{FFiK})_2$ が細胞培養における新たな足場材料として機能し、細胞の三次元培養に適用可能

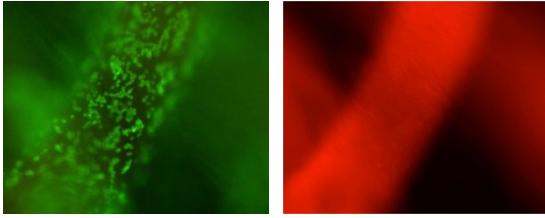


図6. ゲルファイバー上における HEK293 細胞の
蛍光顕微鏡イメージ. (左) HEK293 細胞. (右)
ペプチドゲル.

であることが明らかとなった。本研究で開発
した自己組織化ペプチド $u(\text{FFiK})_2$ を用いる
ことにより、細胞集団を立体的に培養し、未
開拓の領域である細胞外環境を可視化する
ことができ、生命現象のより深い理解や新た
な生命現象の発見において貢献するものと
期待される。

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)

[学会発表](計 7件)

1. ナノファイバーを形成する自己組織化ペ
プチドの創製と細胞培養への応用, 堤
浩・福永和人・三原久和, 平成 27 年度織
維学会年次大会, 2015年6月10日-12日,
東京
2. 自己組織化ペプチドの pH 応答的ゲル形
成と細胞培養への応用, 堤 浩・福永和
人・三原久和, 第 9 回バイオ関連化学シ
ンポジウム, 2015年9月10日-12日, 熊
本
3. pH 応答性自己組織化ペプチドゲルの創製
と細胞培養材料への応用, 堤 浩・田中邦
史・三原久和, 第 65 回高分子討論会,
2015年9月14日-16日, 仙台
4. Construction and application of
pH-responsive hydrogel materials
fabricated from designed
self-assembling peptides, Hiroshi
Tsutsumi, Hisakazu Mihara, 第 52 回ペ
プチド討論会, 2015年11月16日-18日,
神奈川
5. 生理活性配列導入による自己組織化ペプ
チドゲルの機能化と骨芽細胞培養への応
用, 堤 浩・川村愛・三原久和, 第 10 回
バイオ関連化学シンポジウム, 2016年9
月7日-9日, 金沢
6. 機能性配列を導入した自己組織化ペプチ
ドゲルの創製と骨芽細胞培養への応用,
堤 浩・川村愛・福永和人・三原久和, 第
65 回高分子討論会, 2016年9月14日-16
日, 神奈川
7. Construction of pH-responsive
hydrogel materials fabricated from
designed self-assembling peptides for
cell culture, Hiroshi Tsutsumi,
Hisakazu Mihara, International

Conference on Single Cell Research
2016, 2016年11月16日-17日, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.mihara.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 浩 (TSUTSUMI, Hiroshi)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号: 70398105