

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14026

研究課題名(和文)非拡散性因子に由来する細胞内シグナル伝達の時間分解分析法の開発

研究課題名(英文)A time-resolved analysis of intracellular signal transduction in response to non-diffusible factor

研究代表者

中西 淳(Nakanishi, Jun)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・グループリーダー

研究者番号：60360608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：通常は液性因子としてふるまう生体分子を材料に固定化するとその活性が顕著に変化することが知られている。本研究ではこの作用の時間分解分析を行うための研究ツールとしてマイクロパターン化基板と反応性ナノ粒子を開発した。女性ホルモンエストラジオールと上皮成長因子をこれら材料に固定化することで、細胞応答の時間空間動態を捉えることができるようになった。本手法は新たなバイオマテリアルや薬剤の開発に重要な情報を与える。

研究成果の概要(英文)：Some diffusible biomolecules change their activities upon their conjugation to materials. In this project, we developed new research tools for cellular responses to material-biomolecule conjugates. We have succeeded in observation dynamic processes of estradiol or epidermal growth factor conjugated to micropatterned substrates and nanoparticles, respectively. These methods will give us useful information for the developments of new biomaterials and drugs.

研究分野：生体分析化学

キーワード：ナノバイオ シグナル伝達 細胞・組織 生体材料 ケージド化合物

### 1. 研究開始当初の背景

本来は液性因子として作用する成長因子やホルモンを、基板や高分子ゲルに固定化して細胞に作用させると、通常よりも持続・亢進した生理活性や、時として全く異なる生体応答を惹起することがある。このことから液性因子を化学的に固定化したバイオマテリアルに注目が集まり、組織工学や疾患治療への応用が進められている。ただ、肝心のメカニズムについては、諸説あるものの、決定打が出ていないのが現状だ。それは、基質への定量的な固定化と反応開始時点の制御が難しいことに起因している。これは、通常の液性因子ではストフトフロー法やフラインジェクションが使えるのと大きな違いといえる。

一方で申請者は、光応答性分子に基づくクレード基板を利用した細胞接着現象の時空間制御法を開発してきた。最近では、ナノパターン基板を用いることで、基質の細胞接着力の定量的な制御を達成している。これらの戦略は先述の固定化液性因子の研究にも好適と考え本研究に想到した。

### 2. 研究の目的

本研究では、固定化液性因子などの非拡散性因子が誘起する細胞応答の定量的な時間分解分析法を開発する。

研究対象とする液性因子の一つにエストラジオール (E2) を用いた。E2 は女性ホルモンの一種であり、通常は核内受容体に作用し、様々な遺伝子発現を調節する役目を果たしている。その一方で、E2 には細胞膜での作用 (非ゲノム作用) もあり、通常の溶存状態の E2 を添加した場合、両方を刺激することになる。ここでは E2 を基盤に固定することで、非ゲノム作用のみにフォーカスする方法論を開発した。この場合は、マイクロ・ナノパターンングで基質への液性因子の定量的な固定化を担保することをめざした。

また、二つ目の研究対象には上皮成長因子 (EGF) を選んだ。EGF は増殖性を示すが固定形態を変えることで分化誘導を引き起こすことが知られている。本研究では、金のナノ粒子に固定化した場合の細胞応答について調べた。こちらについては、添加量は通常の液性因子と同じようにコントロールできるが、細胞に暴露される局所密度としては、EGF の表面密度を変化させることで調節する。

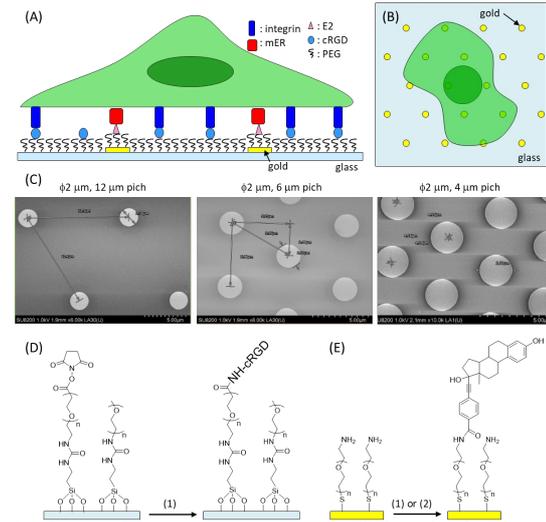
以上の二つの課題について、材料の精確なキャラクタリゼーションの上で、生化学分析と照合しながら、本手法の有用性を検証することをめざした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 固定化 E2 に関する研究

フォトリソグラフィおよび電子線リソグラフィによって、ガラス基板上に  $\mu\text{m}/\text{nm}$  サイズの金領域 ( $\phi = 2 \mu\text{m}$ ) をアレイ状に形

成した。ガラス領域を PEG silane で不動態化し、その末端に細胞接着性ペプチドの RGD を修飾するとともに、金領域はチオール化 PEG で修飾しその末端に E2 を固定化した (図 1)。細胞はこの基板に対して RGD を介して接着でき、かつ基板に固定化された E2 が暴露される状態になる。それぞれのリガンドが PEG を介して提示されているため、細胞が分泌するタンパク質や培地中のタンパク質の吸着によりこれらのリガンドが覆い隠されないように設計されているのがキモである。また、金領域のサイズ・密度を変えることで、



細胞に暴露される E2 の量 (濃度に相当する) も変化させることもできる。

図 1 .E2 を固定化したマイクロ・ナノパターン化基板の設計と電顕写真, 表面修飾方法

#### (2) EGF 固定化ナノ粒子に関する研究

直径 20nm の金ナノ粒子の表面を、末端に PEG と活性エステルを有するジスルフィドで修飾した。ここに EGF を作用させ、繰り返し遠心洗浄することで EGF 固定化ナノ粒子を作製した。ナノ粒子の粒径は動的光散乱法で求めた。また、ナノ粒子当たりの EGF 固定化量は遠心洗浄操作前後での溶液中の EGF 濃度の減少分から見積もった。このナノ粒子を HeLa 細胞に作用させた際の細胞内での分布を暗視野観察によって評価した。また、細胞への作用は代表的なリン酸化酵素の活性化のウェスタンブロッティングによる解析と、Annexin V 染色によるアポトーシス活性をもって評価した。いずれの解析においても通常の可用性の EGF と結果を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 固定化 E2 に関する研究

リソグラフィーで作製したパターン化基板は走査型顕微鏡で確認し、金領域のサイズや間隔を望み通りコントロールできることを確認した (図 1C)。つぎに基板表面での化学反応の可否を確認するために、マイクロパターン基板と同じ方法で、別途用意した全面金基板に E2 を修飾し、QCM-D および SPR

によりその修飾過程を評価するとともに、固定化された E2 に対するエストロゲン受容体の結合能を評価した。特に QCM-D による解析で求めた  $\Delta D_f$ - $\Delta f$  のプロットをコントロールの基盤と比較すると、基板上で E2 と結合したエストロゲン受容体の粘弾性情報および含水量を求めることができ、この結果からもエストロゲン受容体が非特異吸着で結合しているわけでは無いことが示された(図2)。以上の結果から、金基板表面に活性を保持した状態で E2 を固定化できていること確認され、さらに PEG を介して E2 を固定化することによる表面不動態化の有効性も明らかになった。

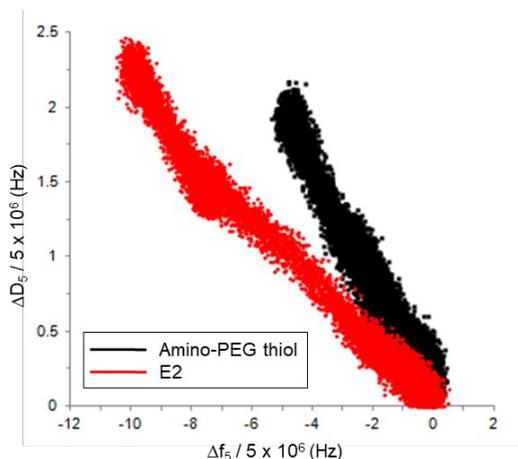


図2 . QCM-D を用いた固定化 E2 の評価

最後に、マイクロパターン化基板上に乳がん細胞株 MCF-7 細胞を付着させ、その細胞応答を解析した。E2 を修飾していないコントロールの基盤では、ERK の活性化は細胞接着時の一時的なものであったが、E2 固定化基盤では、その活性化が持続した(図3A)。さらに、E2 固定化した基盤は、通常の遊離状態の E2 とは異なり、細胞増殖を更新しないことも確認した(図3B)。これらより、本手法が材料に固定化した E2 の作用の解析に有用であることが示された。

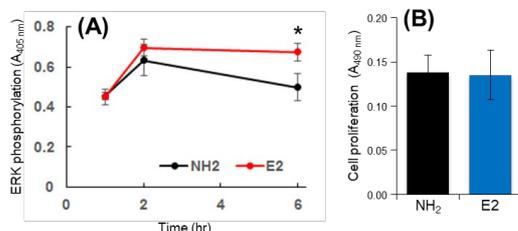


図3 . E2 固定化マイクロパターン基板での

#### (2) EGF 固定化ナノ粒子に関する研究

最初に EGF 固定化ナノ粒子のキャラクタリゼーションを行ったところ、このナノ粒子は粒径が 50 nm 程度で、1 粒子当たり 50 分子程度の EGF が固定化されていることが分かった。つぎに HeLa 細胞への作用を調べた。EGF 受容体の代表的な下流タンパク質とし

て ERK と AKT のリン酸化を調べたところ、可用性の EGF については、ERK と AKT とともに一過性の活性化が起こるのに対して、EGF 固定化ナノ粒子は、AKT のみ一過性の応答を示し、ERK の活性化は長時間持続された。つづいて HeLa 細胞のアポトーシス誘導能を調べたところ、通常の EGF は細胞増殖を当然のようにその活性は示さないが、EGF 固定化ナノ粒子はアポトーシスを引き起こすことが分かった。また、EGF の固定化量を 1/4 および 1.5 倍に変化させてもアポトーシス活性にはほとんど影響がないことも確認している。そこで、EGF 固定化ナノ粒子の作用点を調べるべく、暗視野観察で金ナノ粒子を観察しつつ、ラフトマーカを蛍光観察したところ、EGF 固定化ナノ粒子はラフトに作用していることが示唆された。一方で、ラフトの形成を阻害する -CD で予め処理した細胞に EGF-GNPs を添加したところ、アポトーシス誘導活性がほぼ失われることが分かった。この結果より、通常は細胞増殖・分化を促進する EGF を金ナノ粒子に固定化することで、逆に細胞死を誘導するメカニズムにおいて、脂質ラフトが重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の結果から、ナノ粒子によって固定化することで EGF の活性は決定的に変化することが分かった。

#### 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 1 件)

B. Qi, Baowen, Y. Shimizu, J. Nakanishi, F. M. Winnik, “Estradiol-tethered micropatterned surfaces for the study of estrogenic non-genomic pathways”, Chemical Communications, 査読有, 52: 10056-10059 (2016)  
DOI: 10.1039/C6CC03899A

〔学会発表〕(計 6 件)

S. Yamamoto, Y. Iwamaru, Y. Shimizu, K. Yamaguchi, J. Nakanishi, “A mechanism study of unique apoptosis-inducing activity of epidermal growth factor immobilized on gold nanoparticles”, MANA Symposium 2018, 2018 年 3 月 6 日, つくば

山本翔太, 岩丸祥史, 清水喜久, 山口和夫, 中西淳, “金ナノ粒子固定化上皮成長因子の特異なアポトーシス誘導活性に対する脂質ラフトの役割”, つくば医工学フォーラム 2018, 2018 年 1 月 26 日, つくば

中西淳, “上皮成長因子-金ナノ粒子コンジュゲートの特異なアポトーシス誘導活性のメカニズム探究”, RIKEN-iCONM-物材機構医工学ネットワーク, 2017 年 12 月 12 日, 川崎

S. Yamamoto, Y. Iwamaru, Y. Shimizu, K. Yamaguchi, J. Nakanishi, “Role of lipid rafts in unique apoptosis inducing activity of epidermal

growth factor-gold nanoparticles conjugates”, 第 27 回日本 MRS-J, 2017 年 12 月 6 日, 横浜

山本翔太, 岩丸祥史, 清水喜久, 山口和夫, 中西淳, “上皮成長因子担持金ナノ粒子の特異的アポトーシス誘導活性における脂質ラフトの役割”, 第 39 回バイオマテリアル学会大会, 2017 年 11 月 21 日, 東京

山本翔太, 岩丸祥史, 清水喜久, 山口和夫, 中西淳, “上皮成長因子担持金ナノ粒子が特異的に誘起するアポトーシス活性に対する脂質ラフトの関与”, 分析化学第 66 年会, 2017 年 9 月 10 日, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 淳 (NAKANISHI, Jun)

物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク

トニクス研究拠点・グループリーダー

研究者番号: 60360608

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし