

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05351

研究課題名(和文) 高機能化ペプチド足場材料を利用した細胞の三次元培養と細胞外環境イメージング

研究課題名(英文) Development of functionalized peptide materials for 3D culture of cells and fluorescent imaging of extracellular environment.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：人工的にデザインしたペプチド性足場材料を用いて細胞を三次元的に培養し、培養空間における細胞外環境をリアルタイムにイメージングするための手法を新たに開発した。細胞の三次元培養のために生理活性配列RGDSを導入した自己組織化ペプチドと、弱酸性環境で発蛍光性となる蛍光pHプローブRhoB-Aibを導入した自己組織化ペプチドを併用したペプチドゲル内で乳がん細胞MCF7を三次元的に培養することができた。また、培養日数の経過に伴って増殖したMCF7細胞外のRhoB-Aibの蛍光強度が増大し、がん細胞外が弱酸性環境になる過程をリアルタイムに可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は三次元的な細胞培養材料と蛍光イメージングプローブを駆使して、これまでに対象とされていなかった細胞外・細胞間の「空間」を新たなイメージング対象とする革新的な研究である。本研究は、がん細胞の悪性化の一因と考えられている細胞外酸性環境を蛍光によりリアルタイムにイメージングした最初の研究であり、がん疾患のメカニズム解明に貢献することが期待され、学術的に意義のある研究である。また、腫瘍に特有の微小環境を標的とした新しい創薬にも応用できると考えられ、社会的にも有意義な研究である。

研究成果の概要(英文)：We developed a new method to visualize extracellular environment of cancer cells cultured in 3D scaffolds composed of self-assembling peptide materials. We synthesized self-assembling peptide derivatives conjugated with a bioactive sequence (RGDS) and a pH sensitive fluorescent probe (RhoB-Aib). MCF7, a breast cancer cell, was successfully cultured in a 3D peptide hydrogel. In addition, an acidic environment of extracellular region was visualized by the fluorescent pH probe.

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 pH

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光プローブや蛍光タンパク質を利用して細胞内や細胞表層の微小器官や生体分子を高解像度でイメージングすることにより、分子レベルでの生命現象の詳細な解析が広く行われている。その一方で、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」にはほとんど目が向けられていない。例えば、細胞外の pH・温度・栄養成分の分布は細胞活動に大きな影響を与える。一方で、細胞は成長や分化の過程において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、またサイトカインや情報伝達物質、エクソソームなど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。つまり、細胞外には細胞の増殖・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種々の因子が存在し、それらをリアルタイムにイメージングすることが、細胞の機能や個性を理解する上で重要であると言える(図 1)。

従来培養皿を用いた二次元での培養法では、細胞が本来存在している生体内の環境を再現することはできない。また、細胞外の空間にイメージングのためのプローブを固定することができないため、細胞外環境をリアルタイムにイメージングする手法は確立されていないのが現状である。

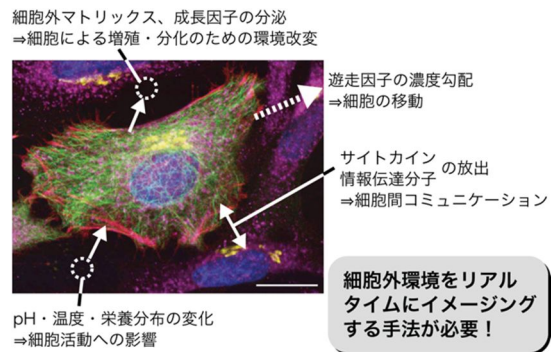


図 1. 細胞中のタンパク質・小器官などのマルチカラー蛍光イメージングとイメージング対象と成り得る細胞外環境の例

## 2. 研究の目的

これまでに、精密に設計したペプチド(自己組織化ペプチド)が温和な条件下、水中で自己組織化してナノファイバーネットワークを形成し、ヒドロゲルを与えることを見出している。本研究では、自己組織化ペプチドに生理活性配列を導入して高機能化することにより、細胞の三次元培養の足場材料を創製することを目的の 1 つとした。また、自己組織化ペプチドに pH を蛍光イメージング可能なプローブを導入することで、細胞外環境に三次元的にプローブをレイアウトし、細胞外 pH 環境を蛍光イメージングする手法を確立することを目的とした(図 2)。

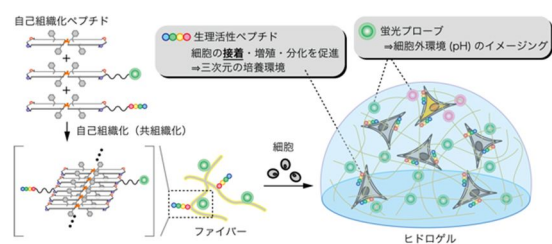


図 2. 自己組織化ペプチドからなるヒドロゲルを足場材料とした細胞の三次元培養と細胞外環境イメージングの概略

## 3. 研究の方法

### (1) 生理活性配列を導入した自己組織化ペプチドの合成と自己組織化能の評価

生理活性配列として、細胞接着促進配列である RGDS および PHSRN を選択し、固相合成法により合成した。これらのペプチドの N 末端をプロモアセチル化し、自己組織化ペプチド u(FFiK)<sub>2</sub> のアミノ基と固相担体上で反応させ、生理活性配列を導入した自己組織化ペプチドを合成した。合成したペプチドは逆相 HPLC によって精製し、MALDI-TOF MS により同定した。生理活性配列を導入した u(FFiK)<sub>2</sub> 誘導体と u(FFiK)<sub>2</sub> を混合して共組織化させ、ヒドロゲルを形成させた。共組織化したペプチドナノファイバ

一上への生理活性配列の提示は、ビオチン標識した生理活性配列導入  $u(\text{FFiK})_2$  誘導体を金ナノ粒子で標識したストレプトアビジンで検出することにより評価した。

#### (2) 蛍光 pH プロープの合成と機能評価

当初、使用予定であった蛍光 pH プロープの量子収率が低かったため、量子収率が高く明るい蛍光を示すローダミン B (RhoB) を母骨格として蛍光 pH プロープの合成と機能評価を行った。RhoB に種々のアミノ酸メチルエステル誘導体を縮合させ、蛍光 pH プロープ候補化合物を合成した。腫瘍組織ではがん細胞外の pH が約 6 程度の弱酸性になることを指標として、合成した化合物の pH 滴定実験を行った。

#### (3) 細胞の三次元培養法の確立

乳がん組織由来の MCF7 細胞と非がん組織由来の HEK293 細胞を用いた。ペプチドゲル内での細胞の様子を蛍光観察するため、sfGFP を安定発現する細胞株を樹立して実験に用いた。共組織化における生理活性配列の割合を変えたペプチドゲル内に sfGFP-MCF7 と sfGFP-HEK293 細胞を内包させ、細胞培養を行った。また、死細胞を PI で染色し、細胞毒性についても評価を行った。

#### (4) 細胞外酸性環境の蛍光イメージング

生理活性配列と蛍光 pH プロープをそれぞれ導入した  $u(\text{FFiK})_2$  誘導体を用いて調製したペプチドゲル内で、sfGFP-MCF7 と sfGFP-HEK293 細胞を培養し、細胞外 pH 変化を経時的に蛍光イメージングした。

### 4. 研究成果

固相担体上で生理活性配列と  $u(\text{FFiK})_2$  誘導体を反応させることにより、生理活性配列を導入した  $u(\text{FFiK})_2$  を合成することに成功した。本研究で選択した RGDS や PHSRN に限らず、他のさまざまな生理活性配列を導入することができる汎用的な合成方法を確立した。

赤外吸収スペクトル測定の結果、生理活性配列を導入した  $u(\text{FFiK})_2$  誘導体は、 $u(\text{FFiK})_2$  と同様に  $\beta$ シート構造を形成することを明らかにした。また、共組織化させたナノファイバーを透過型電子顕微鏡により観察した結果、生理活性配列がペプチドナノファイバー上に提示できることを明らかにした (図 3)。

次に、ペプチドゲル内で細胞培養を行った結果、MCF7 および HEK293 のいずれの細胞も三次元的に内包でき、10 日間以上の培養が可能であることを確認した。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。また、RGDS を提示したペプチドゲルは  $u(\text{FFiK})_2$  単独のゲルと比較して、細胞増殖を促進することがわかった。

蛍光 pH プロープをレイアウトしたペプチドゲル内で MCF7 を培養した結果、培養 3 日目からプロープの蛍光強度が増大し、細胞外 pH が弱酸性環境になることをリアルタイムで可視化することに成功した。HEK293 の場合、培養日数が 10 日の場合でも蛍光強度の増大は見られず、がん細胞に特有の微小酸性環境を可視化できていることが示唆された。

以上の結果から、高機能化した自己組織化ペプチドゲルを用いて細胞の三次元培養が可能であり、

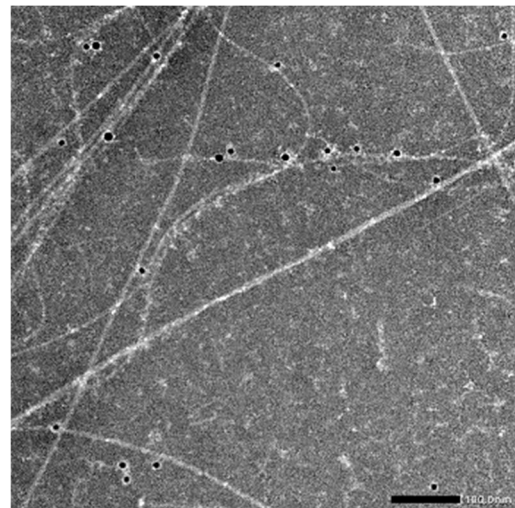


図 3. Biotin-RGDS- $u(\text{FFiK})_2$  を共組織化させたペプチドナノファイバーの透過型電子顕微鏡画像。提示された Biotin-RGDS を金ナノ粒子標識したストレプトアビジンで検出している。

細胞外環境をリアルタイムにイメージングする手法を確立することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsutsumi Hiroshi, Tanaka Kunifumi, Chia Jyh Yea, Mihara Hisakazu	4. 巻 113
2. 論文標題 Short self assembling peptides with a urea bond: A new type of supramolecular peptide hydrogel materials	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pep2.24214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Anananuchatkul Teerapat, Chang Iou Ven, Miki Takayuki, Tsutsumi Hiroshi, Mihara Hisakazu	4. 巻 5
2. 論文標題 Construction of a Stapled $\alpha$ -Helix Peptide Library Displayed on Phage for the Screening of Galectin-3-Binding Peptide Ligands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 5666 ~ 5674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b03461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukunaga Kazuto, Tsutsumi Hiroshi, Mihara Hisakazu	4. 巻 92
2. 論文標題 Self-Assembling Peptides as Building Blocks of Functional Materials for Biomedical Applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 391 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20180293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi Hiroshi, Kawamura Megumi, Mihara Hisakazu	4. 巻 26
2. 論文標題 Osteoblastic differentiation on hydrogels fabricated from Ca <sup>2+</sup> -responsive self-assembling peptides functionalized with bioactive peptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3126 ~ 3132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.04.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 青木 蓮・Chia Jyh Yea・三木 卓幸・三原 久和・堤 浩
2. 発表標題 1.がん細胞外pH環境のイメージングを指向し弱酸性環境応答的蛍光プローブを組み込んだ自己集合化ペプチドゲルの創製
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩田 隼平・三木 卓幸・三原 久和・堤 浩
2. 発表標題 2.ウレア部位を有する金属イオン応答性自己集合化ペプチドの創製と金属ナノ材料への応用
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Tsutsumi
2. 発表標題 Functionalized Supramolecular Peptide Hydrogels for 3D Culture of Cancer Cells
3. 学会等名 10th RSC-CSJ Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ren Aoki, Takayuki Miki, Hisakazu Mihara, Hiroshi Tsutsumi
2. 発表標題 Development of fluorescent pH probes toward fluorescence imaging of extracellular environments using self-assembling peptides
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jyh Yea Chia, Takayuki Miki, Hisakazu Mihara, Hiroshi Tsutsumi
2. 発表標題 Self-assembling peptide materials functionalized with bioactive sequences for three dimensional MCF-7 cell culture
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 浩、Chia Jyh Yea、児玉伊織、三原久和
2. 発表標題 ウレア結合をもつ自己集合化ペプチドゲルを用いたがん細胞の三次元培養
3. 学会等名 第29回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chia Jyh Yea・児玉伊織・三原久和・堤 浩
2. 発表標題 Functionalized self-assembling peptide materials with a urea bond towards the establishment of three dimensional cancer cell culture
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chia Jyh Yea・児玉伊織・三原久和・堤 浩
2. 発表標題 ウレア結合をもつ自己組織化ペプチドの生理活性配列導入による機能化とがん細胞培養
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chia Jyh Yea, Iori Kodama, Takayuki Miki, Hisakazu Mihara, Hiroshi Tsutsumi
2. 発表標題 Construction and Characterization of Functionalized Self-assembling Peptide Materials with a Urea Bond for Three Dimensional Cancer Cell Culture
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Tsutsumi, Chia Jyh Yea, Iori Kodama, Hisakazu Mihara
2. 発表標題 Construction of supramolecular peptide hydrogels functionalized with bioactive sequences for 3D cell culture
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Oe, Hiroshi Tsutsumi, Takayuki Miki, Hisakazu Mihara
2. 発表標題 Development of Self-Assembling Peptide Materials Recruiting Growth Factors via Heparin Binding
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児玉伊織・Chia Jyh Yea・三原久和・堤 浩
2. 発表標題 自己集合化ペプチドマテリアル(1)：ウレア結合をもつペプチドの構造-集合化能の相関解析と細胞培養材料応用
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 堤 浩・Chia Jyh Yea・児玉伊織・三原久和
2. 発表標題 自己集合化ペプチドマテリアル(2)：がん組織工学に向けた自己集合化ペプチドヒドロゲルを用いたがん細胞の三次元培養
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関