

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02458

研究課題名(和文) ナノポーラス金による細胞接着制御

研究課題名(英文) Control of cell adhesion by nanoporous gold

研究代表者

袴田 昌高 (HAKAMADA, Masataka)

京都大学・エネルギー科学研究科・准教授

研究者番号：30462849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナノメートルオーダーの超微細な孔径の多孔質構造を持つ「ナノポーラス金」(NPG)を細胞培養基板として用いた場合の細胞の挙動を調べた。フィブロネクチンを介して接着するHeLa細胞の場合、細胞がいったんNPG基板に接着するものの、フィブロネクチンの細胞接着機能がNPGにより低下し、細胞内へのシグナル伝達を通じて細胞死を誘発することがわかった。また、コラーゲンを介して接着するヒト間葉系幹細胞の場合、細胞が最初からNPG基板に接着しにくいことがわかった。また、NPGに電解液中で電位を印加すると変形するという特性を利用し、ヒト線維芽細胞に周期的な機械的刺激を与え、増殖を促進できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回はナノポーラス金(NPG)基板を静的に利用し、単純に細胞を培養することによって細胞の不活性化を促した一方で、周期的な機械的刺激を与えるという動的な利用によっては細胞増殖を実現した。つまりNPGは、利用法も含めた周囲技術のチューニングによって細胞の活性をコントロールできる可能性のある、興味深い材料であることがわかった。NPGは他のナノ材料(ナノ粒子等)と異なり、材料そのものが肉眼で見え、バルクとして扱えるナノ材料であることも考えれば、細胞分析・培養装置への導入などの応用の道が拓けたといえる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the activity of cells on nanoporous gold (NPG) with nanometer-sized pores and ligaments. HeLa cells were inactivated by NPG substrates after initial temporary adsorption because of the conformational deterioration of fibronectin, which is an important protein for the adsorption of HeLa cells. On the other hand, human mesenchymal stem cells (hMSCs) were not adsorbed on NPG substrates, which may be due to local conformational change in collagen, which mediates the adsorption of hMSCs. Furthermore, cyclic stretching by the actuation of NPG significantly enhanced the proliferation of human embryo-derived fibroblasts.

研究分野：金属学

キーワード：ナノポーラス 細胞 機械的刺激

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新しいナノ金属材料として、ナノメートルオーダの孔径の多孔質構造を有する「ナノポーラス金属」が注目されている。例えば、ナノポーラス金 (NPG) においては、バルク金に見られない特異的な物理的・化学的性質が見出されている。本研究では、NPG を細胞培養基板に用いた場合に、細胞の接着挙動をどのように制御できるかを明らかにすることを目的とした。

接着性ヒト細胞である HeLa 細胞が NPG 基板に接着する際の接着挙動を平滑金 (FG) 基板の場合と比べ、ナノポーラス金属独特の細胞接着への効果を調べることを当初の検討事項とした。特に、細胞接着を担う培地中のタンパク質「フィブロネクチン」に注目し、これがナノポーラス金表面で安定して存在するかどうかを、実験・計算科学の両面から明らかにすることを目的に設定した。

### 2. 研究の目的

研究の進捗に応じ、上記も含めた以下の3項目を研究目的と定めた。

(1) HeLa 細胞の NPG 基板への接着挙動を、FG 基板の場合と比較した。フィブロネクチンの分子構造の変化に着目し、分子生物学的な手法も含めた実験に加え、フィブロネクチンの分子構造中、接着に主要な役割を果たすアミノ酸配列である RGD 配列 (アルギニン グリシン アルギニン酸) および、細胞の膜タンパク質であり、やはり基板との接着に重要である「インテグリン」とフィブロネクチンの複合体について、計算科学的な検討を行った。

(2) ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の NPG 基板への接着挙動を、FG 基板の場合と比較した。hMSC は (1) の HeLa 細胞と異なり、タンパク質「コラーゲン」を主に介して基板と接着することが知られている。このため、コラーゲンの分子構造の安定性に対する NPG 基板の影響を、実験的・計算科学的手法で調べた。

(3) NPG を電極として用い、電解液中で別の電極に対して電位を印加すると、NPG 電極そのものに肉眼でも確認できるような巨視的変形が生じる (アクチュエーション効果)。これを用いて、細胞に対する基板からの機械的刺激の影響を調べた。基板あるいは細胞の環境からの機械的刺激にもインテグリンが関与することが知られているが、NPG アクチュエータにより生じる変形がどのように影響するかを、インテグリンの種類に注目して実験的・計算科学的に解析した。

### 3. 研究の方法

(1) HeLa 細胞の NPG 基板への接着挙動を明らかにするため、スパッタリング装置によりディッシュ底に厚さ約  $1\ \mu\text{m}$  で成膜した金銀合金を 69 質量%硝酸中、温度 253 K で脱合金化することで、HeLa 細胞の培養に用いる NPG 基板とした。なお、金銀合金のスパッタリング成膜に先立ち、あらかじめ純金属層の下地 (厚さ約  $0.6\ \mu\text{m}$ ) をディッシュ底にスパッタリング成膜することで、脱合金化時の脆化により NPG 層が散逸することを防いだ。比較対象である FG 基板も、ディッシュ底に純金を成膜することで用意した。NPG のポーラス構造を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察するとともに、サイクリックボルタンメトリ (CV) により NPG 基板の表面積の増加を確認した。

約  $3.5 \times 10^5$  個の HeLa 細胞を、1.6 mL のダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて上記基板上で培養し、細胞の接着率および死細胞率を評価するとともに、細胞の自発死があるかどうかを蛍光顕微鏡観察で確認した。また、細胞培養後の培地上澄みに含まれるタンパク質の質量分布をポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 分析により評価するとともに、ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 法により、両基板上に吸着させたフィブロネクチンの分子構造を比較した。

計算科学的検討として、金 (111) 表面に RGD 配列を吸着させた原子モデルについて、Dmol<sup>3</sup> コードを用いた第一原理計算により RGD 配列のねじれ角に及ぼす金の格子定数の影響を調べた (先行研究に基づき、NPG では FG に比べ格子定数が 5% 収縮しているものとした)。さらに、この第一原理計算で計算された RGD 配列を含むようにインテグリン フィブロネクチン複合体の原子モデルを構成し、GROMACS コードによる分子動力学計算に供した。

(2) hMSC の NPG 基板への接着挙動を明らかにするため、上記と同様の手法により NPG 基板および FG 基板を作製した。hMSC を  $5.0 \times 10^3$  個/cm<sup>2</sup> となるように基板上に播種し、細胞の接着率を調べた。また、細胞の接着を担うコラーゲンの三重らせん構造がほどこしているかどうかを蛍光顕微鏡観察および ELISA 法により調べた。

計算科学的検討として、金 (111) 表面に三重らせん構造のコラーゲン分子を吸着させた原子モデルについて、NAMD-CHARMM コードを用いた分子動力学計算により三重らせん構造に及

ぼす金の格子定数の影響を調べた（先行研究に基づき、NPG では FG に比べ格子定数が 5% 収縮しているものとした）。

(3) NPG アクチュエータによる機械的刺激が接着細胞にどのように影響するかを明らかにするため、上記と類似のスパッタリング装置を用いた手法、ならびに圧延金銀合金を出発材料とする手法で NPG アクチュエータを作製した。実験に適した変形挙動を示した後者について、細胞に電位の影響がないように表面をポリテトラフルオロエチレン (PTFE) テープにより絶縁したのち、金を厚さ 20 nm でスパッタリング成膜し、その上にヒト線維芽細胞 (HEFs) を  $3.6 \times 10^3$  個/cm<sup>2</sup> になるように播種し、培地 (L-グルタミンピルビン酸ナトリウム添加 DMEM-10% ウシ胎児血清) 中で 12 時間の前培養後、NPG アクチュエータ電極に振幅  $\pm 1$  V の電位を 1 または 5 Hz の周期で印加した。この際に対極は白金電極とした。電位印加後、蛍光顕微鏡観察により細胞数等を評価するとともに、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) の発現の局在化も調べた。また、ウエスタンブロッティング (WB) 法によってもタンパク質の発現解析を行った。これらは振動電位を印加していない (= 機械的刺激を与えていない) 細胞についても行い、比較した。さらに、一部の試験はインテグリンの抑制剤を用いても行い、数種あるインテグリンのどの種が影響するかを調べた。

計算科学的検討として、NAMD-CHARMM コードを用いた分子動力学計算により、インテグリンに周期引張を与えた際の活性化挙動を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) HeLa 細胞への NPG 基板の接着挙動 SEM 観察および CV 測定により、NPG 基板にナノポーラス構造が形成されていること、また FG 基板にナノポーラス構造がないことを確認した。NPG 基板上および FG 基板上で 24 時間培養した HeLa 細胞の死細胞率はそれぞれ約 70% および 12% であった。また、HeLa 細胞の接着率の経時変化を調べた結果、FG 基板では 24 時間培養中に 80% 程度の接着率を保ちつつ微増する傾向があったが、NPG 基板では初期 (培養 4 時間後) に 80% 程度あった接着率がその後徐々に低下していき、24 時間後には約 16% の低い値となった。別途行った蛍光顕微鏡観察により、細胞死 (アポトーシス) は培地中ではなく NPG 基板上で起こっていることがわかった。以上より、NPG 基板のナノポーラス構造に接触していることによって、HeLa 細胞が不活性化することが示唆された。

PAGE 分析の結果、どちらの基板を用いた場合でも HeLa 細胞を培養した培地のタンパク質の分子量組成に大きな違いはなかった。一方で、ELISA 法によれば、NPG 基板上に吸着固定したフィブロネクチンの RGD 配列の機能は FG 基板上に吸着固定したフィブロネクチンのそれより有意に低下していた。このことから、NPG 基板のナノポーラス構造が吸着フィブロネクチンの分子構造を変化させ、そして接着能を低下させたことがわかった。この実験的結果は、第一原理計算結果とおおむね一致した。さらに、インテグリン フィブロネクチン複合体の分子動力学計算からは、NPG により分子構造が変化したフィブロネクチンと複合化した場合、インテグリンが活性化しえない (細胞接着に必要な複合構造に遷移しない) 可能性が示された。

(2) hMSC の NPG 基板への接着挙動 (1) と同様に作製した NPG 基板で 2 時間培養した hMSC の接着率は、FG 基板で 2 時間培養した場合の接着率に比べて低かった。一方で、上澄みの培地に浮遊している細胞の死細胞率は NPG 基板を用いた場合と FG 基板を用いた場合でほぼ同等であった。つまり、(1) の場合と異なり、NPG 基板は hMSC の接着を阻害したものの、細胞を死滅させるには至らなかった。両基板上で 2 時間培養した時点での hMSC の形状はどちらも球形に近く、接着しようとして細胞骨格を形成するより前の段階で hMSC は NPG 基板から離れた。このことから、コラーゲンを介する細胞接着の場合は、(1) のフィブロネクチンの場合とは異なる機構

最初から細胞が NPG に接着しない が働いていることがわかった。また、蛍光顕微鏡観察および ELISA 分析の結果、NPG がコラーゲンの三重らせん構造を特異的にほどいているということはない。

計算科学的検討の結果、基板金の格子定数は三重らせん構造に大きな変化を与えはしなかったが、吸着エネルギー、また個々のアミノ酸残基の基板への吸着挙動には影響していることがわかった。

(3) NPG アクチュエータによる接着細胞への機械的刺激負荷 ひずみゲージを用いて NPG アクチュエータによる変形量を調べた結果、最大 0.5% 程度と小さい変形量であった。1 Hz の振動電位の印加後、HEFs の細胞数は振動電位 (= 周期的な機械的刺激) を与えていない場合に比べて平均で約 1.3 倍となった。一方で、5 Hz の振動電位は細胞数を有意に増加させなかった。蛍光顕微鏡観察や WB 法により、ERK を含む分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) が 1 Hz の周期の機械的刺激により強く活性化していることがわかった。種々のインテグリンの抑制剤を用いた実験の結果、周期的な機械的刺激による細胞数増加に際し  $\alpha_5\beta_1$  および  $\alpha_v\beta_3$  のインテグリンが有効に機能していること、また  $\alpha_1\beta_1$  および  $\alpha_2\beta_1$  のインテグリンは寄与していないことがわかり、この結果の一部は分子動力学計算の結果と定性的に一致した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Deguchi Soichiro, Yokoyama Ryo, Maki Takuya, Tomita Kazuki, Osugi Ryosuke, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 119
2. 論文標題 A new mechanism for reduced cell adhesion: Adsorption dynamics of collagen on a nanoporous gold surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 111461 ~ 111461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2020.111461	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 Deguchi Soichiro, Kato Atsushi, Wu Peizheng, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 121
2. 論文標題 Heterogeneous role of integrins in fibroblast response to small cyclic mechanical stimulus generated by a nanoporous gold actuator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 418 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2020.12.014	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 Deguchi Soichiro, Hakamada Masataka, Shingu Jumpei, Sakakibara Susumu, Sugiyama Hironobu, Mabuchi Mamoru	4. 巻 7
2. 論文標題 Inactivation of HeLa cells on nanoporous gold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materialia	6. 最初と最後の頁 100370 ~ 100370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mtla.2019.100370	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0件

〔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
研究分担者	中野 裕美 (NAKANO Hiromi) (00319500)	豊橋技術科学大学・教育研究基盤センター・教授 (13904)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	湯浅 元仁  (YUASA Motohiro)  (70635309)	同志社大学・理工学部・准教授     (34310)	

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