

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12814

研究課題名（和文）細胞培養標準化に向けた細胞培養基板の分子レベル評価及びナノ制御された表面の構築

研究課題名（英文）Molecular level evaluation of cell culture substrate and construction of nano-controlled surface toward cell culture standardization

研究代表者

関 禎子（SHIBATA-SEKI, Teiko）

国立研究開発法人物質・材料研究機構・先端材料解析研究拠点・NIMS特別研究員

研究者番号：90773309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ディッシュ表面に、細胞認識性キメラ型抗体E-カドヘリン-Fc(E-cad-Fc)タンパク質をコーティングし、その表面の吸着状態・機能発現等について解明し、基板コート標準化材としての可能性を評価する目的で研究を行った。E-cad-Fcの吸着状態を液中AFMで解析し、凹凸像に加えAFM探針と試料との吸着力を簡便に被覆状態の指標に利用可能であることを提案し、また、カドヘリン同士のホモフィリック結合の状態をナノスケールで可視化することに成功した。さらにAFMとQCMにより、分子の配向状態を解明した。細胞培養は、基質の材質や表面状態を確認して行うことが重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療の基礎となる細胞培養基質の標準化は、バイオマテリアルの発展に繋がり、人類の福祉に貢献する。

研究成果の概要（英文）：The surface of the dish was coated with the cell-recognizing chimeric antibody E-cadherin-Fc (E-cad-Fc) protein, and the adsorption state and functional expression of the surface were elucidated, and its possibility as a substrate coat standardization material was clarified. The adsorption state of the dish surface of E-cad-Fc was analyzed by submerged AFM, and it was proposed that it could be easily used as an index of the coating state by using not only the image but also the adsorption force between the AFM probe and the sample. We also succeeded in visualizing the state of homophilic bonds between cadherins on a nanoscale. Furthermore, by combining AFM and QCM measurement, it was possible to investigate the orientation of molecules in the liquid. It was confirmed that the material and surface condition of the cell culture substrate is important, and the research results of E-cad-Fc here will be useful for future cell culture.

研究分野：SPM 表面

キーワード：細胞培養 細胞培養基質 カドヘリン AFM SPM QCM

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

再生医療や医薬品の開発等のために行われている細胞培養には、多くの場合プラスチックディッシュが用いられている。しかし、その表面の構造、物理的および化学的性質が製造会社、ロットによって異なることに留意して実験を行っている研究者は少ない。プラスチックディッシュ表面をマトリックスでコーティングすれば、下地の影響は軽減され则认为られるが、実際のコーティング状態は確認されていない。例えば、我々の検討では、一般的なディッシュ表面をゼラチンコーティングして用いる場合、細胞認識が変わるだけでなく、細胞培養基質の硬さがディッシュの素材であるポリスチレンの弾性率 GPa からゼラチンコーティング最表面の kPa へと非常に柔らかくなっているという事実を確認しており、このような定量的解析は、一般的には全くなされていない。この場合ゲルではなく数 nm のゼラチン分子層である。周知のように、細胞培養基質の硬さは細胞の分化に大きな影響を及ぼす(1,2)。また、数 nm ~ μm の微細な表面構造の違いも細胞機能や増殖に影響を及ぼすことが知られている(3,4)。しかし、最も基本的な培養ディッシュの表面構造の研究はほとんど皆無である。我々は培養ディッシュの表面構造が製造会社により異なることを明らかにしており、それらで培養した細胞の形態や機能に大きな差も生じている(図1)。

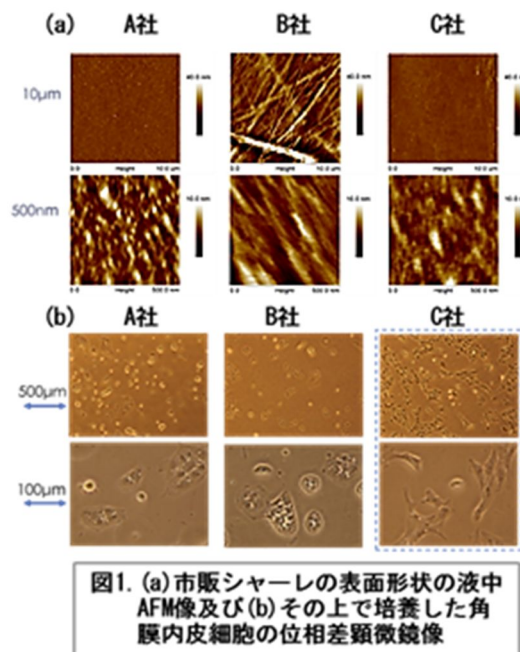


図1. (a)市販シャーレの表面形状の液中AFM像及び(b)その上で培養した角膜内皮細胞の位相差顕微鏡像

現在、再生医療実現のため、ES/iPS 細胞の培養が行われているが、扱いが難しく、増殖・分化・機能維持を安定的に再現性よく培養することが求められている。そのために細胞培養の標準化が必要である。しかし、今回の提案のように細胞培養基質の標準化に着目した検討はないと思われる。

2. 研究の目的

本研究では細胞培養基材である培養ディッシュのナノメートルレベルでの構造と機械的特性(弾性率)分子レベルでの化学的特性(官能基)を系統的に評価しようとするものである。その上で、さらにディッシュにタンパク質やポリマーをコーティングした場合の吸着状態を精査するとともに、コーティング表面の機能および細胞への影響を解明する。

上述のように再生医療のための iPS 細胞培養の標準化が国策として進められているが、培地・培養用マトリックス・発現遺伝子などウエットな部分の解析は進んでいるものの、培養ディッシュ及びマトリックスでコーティングしたときの差異を基準化した例はない。我々は、iPS 細胞の培養における表面構造が分化誘導や増殖に与える影響を明確にし、少なくともマトリックスがコーティングされた表面がいつも同一であることを検証する構造解析手法を確立し、iPS 細胞培養の基準の一つとして提案したいと考えている。今回、ディッシュ表面に、我々が設計・開発してきた細胞認識性キメラ型抗体 E-カドヘリン-Fc(E-cad-Fc)タンパク質をコーティングし、その表面の吸着状態・機能発現等について解明する。E-cad-Fc は、細胞間接着分子である E-カドヘリンの細胞外部位とディッシュコーティング能力の高い抗体の Fc 部位を繋げた分子である(図2)。このバイオマテリアルの基板コート標準化材としての可能性を評価する。

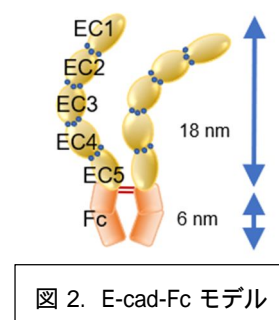


図2. E-cad-Fc モデル

3. 研究の方法

カドヘリンの結合は Ca^{2+} に依存する。開発したバイオマテリアル E-cad-Fc が基板にどのように吸着・配向しているのか、また、その結合活性がどうかに焦点を当て、主に AFM、QCM、細胞培養実験を行う。具体的な方法は結果とともに示す。

4. 研究成果

- (1) モデル基板の作製: 培養基板のタンパク質コーティング状態を AFM で調べるにあたって、通常の培養ディッシュの表面は図1に示したように、メーカーにより異なり表面凹凸も大きいことから、AFM 観察用基板を培養ディッシュと同じ素材のポリスチレン (PS) で作製した。市販の培養ポリスチレン (PS) ディッシュの成分を NMR で調べると、PS 以外の成分も検出さ

れたため、モデル基板にはPSペレットを精製して用いた。条件検討した結果、m.w.280,000のPSペレットを、濃度3wt%でクロロホルムに溶解し、シリコンコートしたカバーガラスに滴下乾燥すると、Raが約0.2nmのモデル基板の作製に成功し以後の実験に用いた。

- (2) ポリスチレンビーズを用いたタンパク質活性の確認：直径121nmのPSビーズにE-cad-Fcをコーティングして結合活性をDLSにより調べた。コーティングしないPSビーズのCa²⁺無しPBS中で148.3(5.6)nm(図3a)、E-cad-FcコートPSビーズのCa²⁺無しPBS中では174.2(35.8)nm(図3b)、E-cad-FcコートPSビーズの2mM Ca²⁺PBS中では329.5(77.3)nm(図3c)(数値は平均値(SD))となり、Ca²⁺に依存してビーズが凝集しており、E-cad-Fcの結合活性を確認した。

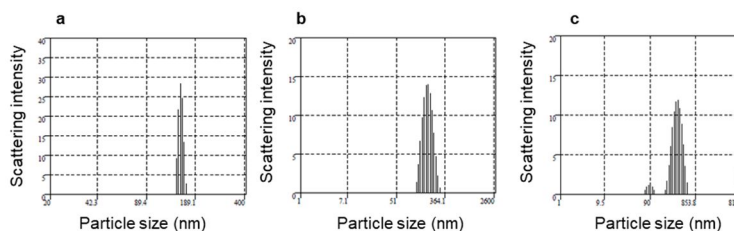


図3. PSビーズを用いた結合活性のCa²⁺依存性のDLS解析

- (3) モデル基板上での吸着状態の解析

表面のコーティング状態を示す新しい指標：作製したPS基板にE-cad-FcをコーティングしAFMを用いPBS中(Ca²⁺無し)で観察したところ、タンパク質の凝集が見られ、更にAFMプローブ探針と試料表面との吸着力を表す吸着力マッピング像において明確なコントラストが得られた(図4)。PS基板のみの測定では全面で吸着力が大きかったこと、また水溶液中で疎水性の探針先端と試料との相互作用において親水性のタンパク質表面では吸着力が低く、疎水性のPS表面では吸着力が高くなることは予想通りであったことから、E-cad-Fcコーティング

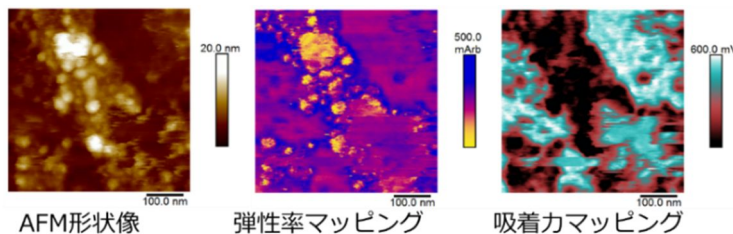


図4. E-Cad-Fcコーティングした表面のPBS中AFM像

表面の吸着力の高い部分はPS基板が露出していると推測された。つまり、AFM測定の凹凸像とともに吸着力もコーティング状態の一つの指標として用いることができると判明した。そこで、この新たな指標を用い、Ca²⁺及びタンパク質濃度のコーティングへの影響を調べるために、Ca²⁺有り、無し、それぞれE-cad-Fc濃度5μg/mL、10μg/mL、20μg/mLの溶液を用いたコーティング表面をPBS中でAFM測定し解析を行った。Ca²⁺有り溶液では、被覆率の濃度依存が見られたが、Ca²⁺を含まない溶液では濃度に無関係にほぼ全面にコーティングされていた。これは、カドヘリンのCa²⁺に依存する構造に依るものであると思われた。カドヘリンの細胞外部位は5つのタンデムに繋がるドメインからなり、Ca²⁺がある場合はドメイン間にCa²⁺が結合し湾曲した棒状構造を形成することがX線結晶構造解析より分かっているのに対し、Ca²⁺が無い場合はドメイン間の結合角は決まっていない(図5)。つまり、棒状構造の分子がランダムに吸着する場合は隙間が空き、形状に自由度のある分子は隙間なく敷き詰められたのではないかと考察した。

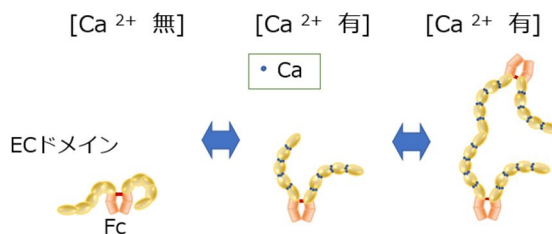


図5. E-cad-FcのCa²⁺依存性構造モデル

QCMとAFMによる吸着状態解析：QCMでは、Ca²⁺有無でのカドヘリン同士の結合と乖離、及びE-cad-Fcのコーティングの膜厚の変化を確認できた。E-cad-Fcの吸着状態の液中AFM観察より、その表面被覆率はコーティング時のタンパク質濃度に依存していることが確認でき、低濃度の場合にはカドヘリン分子が基板に水平に吸着し、高濃度の場合には、配向状態をAFMのみで判断することは困難であった。分子の水和による粘性も考慮されたQCMでの測定と組み合わせ、吸着モデルを考えると、カドヘリン分子は基板に対して垂直方向に配向することが示唆された。

(4) E-cad-Fc の分子構造解析

タンパク質の吸着状態を詳細に解明するには、E-cad-Fc 分子の液中での形状を知る必要があった。そこで、ポリスチレン基板より更に平坦であるマイカを用い、表面を疎水性処理した上で E-cad-Fc の形状を AFM で観察した。その結果、カドヘリンの結合に関しては、10 年程前までは、(平行な)シス結合で二量体になったカドヘリンが、対面する細胞のもう一つの二量体とトランス結合すると考えられていたが、最近の研究ではシス結合は必須ではないと報告されている。

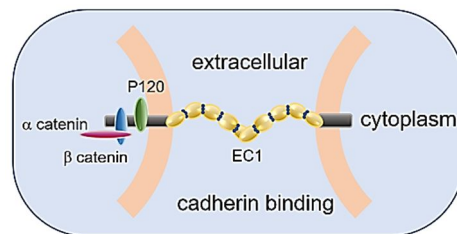


図6. カドヘリンの細胞接着モデル図

E-cadherin は5つの細胞外ドメインを持ち、N 末端側のドメインが、向かい合う細胞の E-cadherin の細胞外ドメインと Ca^{2+} 存在下でホモフィリックな結合をされると言われている(図6)。今回、シス結合せずにトランス結合しているカドヘリン結合の直接観察に成功し、後者を裏付ける結果ともなった(5)。細胞外ドメインのサイズは長軸約 18nm、短軸約 2nm であり、この細胞外部位のサイズ、湾曲したその曲率およびドメイン同志の結合角度は、X 線結晶解析のデータと一致した(図7)。

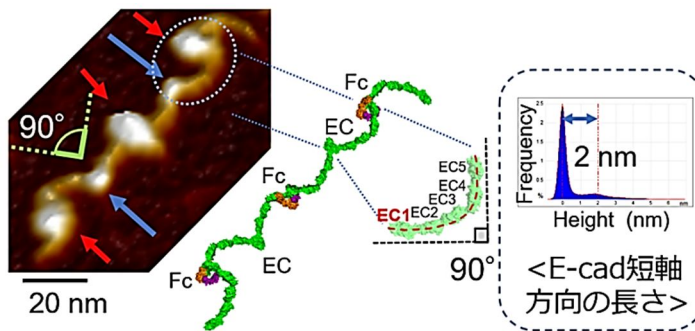


図7. E-cad-Fc の AFM 像 (in PBS with Ca^{2+}) と X 線結晶構造解析モデル図

更にキレート剤を作用させると、ドメイン同志の結合が切れ、細胞外部位の構造が変化していく様子を捉えることができた(図8)。これらは E-cad-Fc コーティングした基板で起こる細胞との相互作用と同等と考えられ、それらを分子レベルで確認したと考えられる。これは、ディッシュに E-cad-Fc をコーティングする際に非常に重要な知見となる。

(5) E-cad-Fc コーティング状態と細胞接着との相関

培養ディッシュに E-cad-Fc 濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で μ コーティングし F9 細胞を培養する僅かながら接着した。未処理ディッシュでは全く細胞が接着しなかったことから、細胞はこの濃度でもカドヘリンを認識していると思われた。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度では、AFM 及び QCM の結果から被覆率約 20% であり細胞は十分接着しなかった。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度では、AFM 及び QCM より被覆率 70% 以上であり良好な接着を示した。今回の実験では、被覆率 70% 以上で良好な結果となったが、メーカーによって異なるディッシュ表面の影響を排除するには露出部分を無くし被覆率 100% で細胞培養を行うことが、正確な実験を行うための一つの方法だと考えられる。

<引用文献>

- Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L. & Discher D.E., Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell, 126 (2006) 677-689
- Mouw J.K., Yui Y., Damiano L., Bainer R.O., Lakins J.N., Acsrbi I., Ou G., Wijekoon A.C., Levental K.R., Gilbert P.M., Hwang E.S., Chen Y.-Y., & Weaver V., Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. Nature Medicine, 20 (2014) 360-367
- Frey M. T., Tsai I. Y., Russell T. P., Hanks S. K., & Wang Y.-I., Cellular Responses to Substrate Topography: Role of Myosin II and Focal Adhesion Kinase. Biophysical Journal, 90(2006) 3774-3782
- Izawa H., Okuda N., Yonemura T., Kuroda K., Ochi K., Ifuku S., Morimoto M., Saimoto H., Noda M., Azuma K., Okamoto Y. & Ito N., Application of Bio-Based Wrinkled Surfaces as Cell Culture Scaffolds. Colloids Interfaces, 2 (2018)

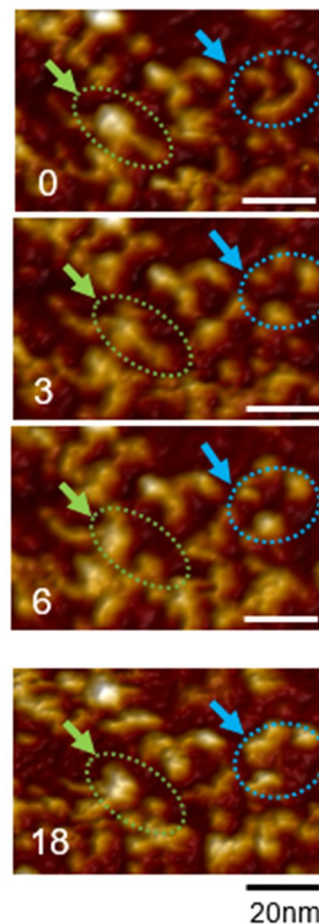


図8 カドヘリン結合が EDTA によって切断されていく様子を示す AFM 像 (左下数字は経過時間(分))

15, DOI:10.3390/colloids2020015

5. Teiko Shibata-Seki, Masato Nagaoka, Mitsuaki Goto, Eiry Kobatake, Toshihiro Akaike, Direct visualization of the extracellular binding structure of E-cadherins in liquid. Scientific Reports volume 10, Article number: 17044 (2020)

<https://www.nature.com/articles/s41598-020-72517-2>

DOI:10.1038/s41598-020-72517-2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibata-Seki Teiko, Nagaoka Masato, Goto Mitsuaki, Kobatake Eiry, Akaike Toshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct visualization of the extracellular binding structure of E-cadherins in liquid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72517-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 赤池 敏宏	4. 巻 19
2. 論文標題 細胞認識・機能制御性バイオマテリアルの設計・開発と再生医療・医工学への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 再生医療	6. 最初と最後の頁 122-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関禎子、永野聖子、大西桂子、後藤光昭、赤池敏宏
2. 発表標題 生体適合性を有する糖鎖高分子の液中での形状・物性のAFMによるナノスケール解析
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関禎子、大西桂子、我妻美千留、長岡正人、後藤光昭、小島英理、赤池敏宏
2. 発表標題 iPS細胞の未分化維持を担う細胞培養基質としてのEカドヘリンキメラ抗体の液中観察による分子構造解析
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤池敏宏
2. 発表標題 細胞認識・機能制御性バイオマテリアルの設計・開発と再生医療・医工学への応用
3. 学会等名 日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関禎子, 我妻美千留, 後藤光昭, 小島英理, 赤池敏宏
2. 発表標題 細胞培養標準化に向けた培養基質コーティングタンパク質カドヘリンのAFM及びQCMによる分子レベル評価
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関禎子, 我妻美千留, 後藤光昭, 小島英理, 赤池敏宏
2. 発表標題 iPS細胞の未分化維持を担う細胞培養基質としてのE-カドヘリンキメラ抗体のAFMとQCMによる分子レベル評価
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関禎子, 我妻美千留, 長岡正人, 後藤光昭, 小島英理, 赤池敏宏
2. 発表標題 iPS/ES細胞の未分化維持を担う細胞培養用マトリックスカドヘリンキメラ抗体のAFMとQCMによる分子レベル評価
3. 学会等名 日本顕微鏡学会SPM研究会
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
研究 分担者	赤池 敏宏 (AKAIKE Toshihiro) (30101207)	公益財団法人国際科学振興財団・その他部局等・主席研究員 (72101)	
研究 分担者	後藤 光昭 (GOTO Mitsuaki) (80235001)	公益財団法人国際科学振興財団・その他部局等・主任研究員 (72101)	

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
---------	---------