

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20645

研究課題名（和文）液体材料を足場とする革新的細胞培養技術の開拓

研究課題名（英文）Innovative culture system based on liquid scaffolds

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・機能性材料研究拠点・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） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、液体材料を足場に用いる革新的な細胞培養技術の開拓を行った。具体的な研究成果として、新たにイオン液体を足場材料に用いられることを実証し、液体の化学構造に応じて細胞接着が劇的に変化することを見出した。また、液体界面に吸着したタンパク質のナノ構造と細胞側の脂質ナノドメインの構造共鳴によって間葉系幹細胞が神経分化するという分化機構を突き止めることができた。以上のように、液体足場材料の適用範囲とそれにたいする細胞力覚機構の理解を深めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の培養手法とは一線を画す液体を足場に用いる細胞培養技術において、どのような液体が細胞足場となり、それらを細胞がどのように細胞が力覚しているのかの理解が不十分であった。本研究で開拓したイオン液体材料ならびに界面にナノ線維を被覆する技術はこれらに明確な回答を与え、液体足場材料の学術的な理解を深めた。また、従来の細胞培養技術に廃プラや低生産効率などの課題が存在していたのに対して、新たな細胞培養モデルとして液々界面培養技術の可能性を示した本研究成果は、環境・エネルギーなど社会的な意義もあるものと言える。

研究成果の概要（英文）：This project develops new cell culturing method based on fluid interfaces. We have demonstrated successful cell culturing at the interface of ionic liquids and the dependence of cell morphologies on the chemical structures of the ionic liquids. We also identified that an essential role of structural coupling between protein nanostructures assembled at the fluid interface and lipid nanodomains within cells. Overall, we have succeeded in broadening the spectra of liquid-based materials capable for cell culturing and identified cellular mechanosensing mechanism at the fluid interfaces.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：メカノバイオロジー 液々界面 細胞接着 幹細胞 イオン液体

1. 研究開始当初の背景

細胞はプラスチックやハイドロゲルなどの硬い材料の上でのみ接着・伸展でき、有機溶媒などのように応力が緩和する培養基質では培養できないと考えるのが一般的だ。それに対して我々は、水と二相分離するパーフルオロカーボン類との液々界面においても、適切な種類の液体を選ぶことで、何ら特別な処理をせずに細胞を培養・増殖させることに成功している。従来の細胞培養技術の常識を覆すこの発見については未だ不明な点も多いが、水-パーフルオロカーボン間の界面自由エネルギーが小さくなるよう、培地中のタンパク質が変性を伴い、自己組織化によって単分子レベルのナノ薄膜を界面に形成し、それが細胞の牽引力に抵抗できるほどの力学強度に達することを明らかにしている。しかもこのタンパク質ナノ薄膜上で培養したヒト間葉系幹細胞(hMSC)は、単なる増殖培地中でも、自ら進んで神経細胞に分化することも突き止めている。これらの結果は、液体基質という特殊新奇な環境の培養・分化誘導場のポテンシャルを強力に支持するものである。液体が本質的に持つ可変形性や操作性を利用すれば3Dプリンティングやマイクロ流体デバイスなど、一般的な固体やハイドロゲル材料にはない応用展開も可能となるなど細胞培養に新たなモダリティを提案できる。ただ、外部からの振動を切欠に、(おそらくタンパク質薄膜が破断して)スフェロイド化するなど、薄膜故のロバスト性に課題が残っていた。この解決にはより培養に適した液体の探索が望まれるが、これまで疎水性液体として用いてきたパーフルオロカーボン類は、液体自体の物理化学的特性のレンジが狭く、その上、物質に対する溶解性が低いため液体のパラメータを変化させるのに限界があった。また、上述のhMSCの神経分化に先立って、細胞の牽引力に促されて線維化されたタンパク質が界面で観察されたが、その役割やメカノセンシング機構についても未解明の点が多く残っていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、このように細胞培養技術に大きな変革・転換をもたらすことが期待される、「液体」を足場を用いる培養技術をさらに拡充すべく、上記の課題の解決・解明に取り組むことで、当該技術の基盤を確固たるものとするをめざした。第一に、より培養に適し、且つ液体基質に求められる物理化学的特徴を特定するために、下層に用いる液体のスペクトルを広げることめざした。具体的には純粋なイオンより構成される常温溶融塩であるイオン液体の中でも水と二相分離する疎水性イオン液体に注目し、液体足場材料としての可能性を追求した。イオン液体はデザイナー液体とも呼ばれ、カチオンとアニオンの組み合わせにより液体の物理化学的特性を自在に制御できるメリットがある。次に、液々界面という特殊な場におけるhMSCの神経分化誘導のメカニズムを解明すべく、界面に形成される線維化構造の役割とそれに対する細胞のメカノセンシングについて調べた。

3. 研究の方法

(1) イオン液体足場材料の開拓

典型的なオニウム系の疎水性イオン液体の中から、カチオン種として脂肪族アンモニウム、芳香族アンモニウム、脂肪族ホスフォニウム系を、アニオン種としてフッ素を多く含む bis(fluorosulfonyl)imide([FSI]), bis(trifluoromethanesulfonyl)imide([TFSI]), hexafluorophosphate ([PF₆]), N,N-hexafluoro-1,3-disulfonylimide ([cTFSI]), bis(pentafluoroethenesulfonyl)imide ([BETI]), bis(nonafluorobutanesulfonyl)imide ([NFSI])を選択した(図1)。培養液中にこれらの疎水性イオン液体を一定量添加し、hMSCに加え、イヌ腎臓上細管上皮由来細胞株(MDCK)、ヒト子宮頸癌由来細胞株(HeLa)、ヒト肺基底上皮腺癌細胞株(A549)に対する毒性をLIVE/DEADアッセイによって評価した。毒性が低いと判断されたイオン液体と培養液s界面を形成し、フィブロネクチンでコーティング後に上層を培地に置換し、hMSC細胞を1x10⁴細胞/ウェルで播種した。細胞の観察は位相差顕微鏡並びに、カバーガラスに転写後に免疫染色による観察を行い、当該イオン液体の有用性を検証した。

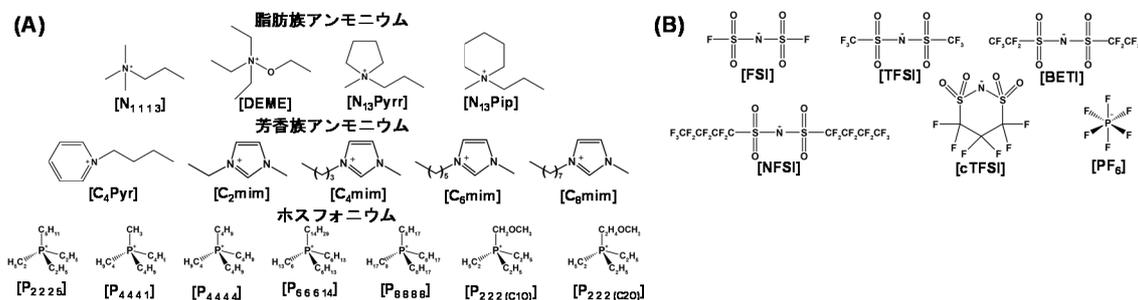


図1. 本研究で使用した疎水性イオン液体の(A)カチオン種および(B)アニオン種の化学構造

(2) ナノフィブリルタンパク質を用いた細胞メカノセンシング機構の探究

液々界面にコーティングするタンパク質として、さまざまな物理刺激によってアミロイド状線維を形成するリゾチームを用いた。リゾチームを熱処理してナノフィブリルを形成後、2種類のpHで水/パーフルオロオクタン(PFO)界面に集積化し、hMSCを播種・培養を行った。細胞の免疫染色はイオン液体の場合と同様の処理により行い、遺伝子発現解析については TRIzol 処理によってトータルRNAを抽出し、所定の処理を経て定量PCR法によって実施した。

4. 研究成果

(1) イオン液体足場材料の開拓

最初に図1に示したカチオン種・アニオン種より構成されるさまざまなイオン液体を対象に、無毒性の疎水性イオン液体の探索を行った。アンモニウム系のイオン液体については、培養一時間後において、[C4min][BETI]や[C6min][BETI]などで高い生存率が観察されたのに対して、24時間ではそのほとんどの細胞が死んでいた。細胞種ごとに一時間後の生存する液体の種類も多少の変動があるものの、24時間後に死滅することには変わりなかった。一方で、ホスフォニウム系では、一部アニオン種によっては多少の細胞死が見られるものの、多くの種類において24時間後にも細胞が生存している様子が確認された。この中から、アニオンとしてはTFSIにフィックスし、ホスフォニウムイオンに結合するアルキル鎖長の異なる[P2,2,2,5][TFSI]、[P4,4,4,1][TFSI]、[P6,6,6,14][TFSI]の三種類にフォーカスし、以降の実験に使用した。

次に、これらのイオン液体にhMSCを播種したところ、分子構造に応じて異なる細胞の接着形態を示した。具体的には、カチオンを[P2,2,2,5]から[P4,4,4,1]、[P6,6,6,14]へと変化させていくにつれて細胞の接着面積は大きくなり、且つ円形度の低下を見ることができた(図2)。カチオンに結合するアルキル鎖長が長くなることは、すなわちイオン液体のイオン性を低下させ、分子性の特性を高めることを意味するが、それに応じてより細胞にとって接着しやすい界面に変化していることを示唆している。そこでそれぞれのイオン液体界面に形成されるタンパク質ナノ薄膜をAFMのナノインデンテーションによって求めたところ、細胞の接着形状に対応するように、弾性率が高まっていくことを確認することができた。さらに、免疫染色法によって、転写補因子のYAPのhMSC内の分布を調べたところ、これらの結果と対応するように[P6,6,6,14][TFSI]界面において最も高くYAPの核内移行が観察された。YAPは細胞質と核内を行き来するタンパク質であるが、硬い基材の上では核内移行が進行することが知られている。これらの結果は、確かにhMSCも[P6,6,6,14][TFSI]界面に形成されたタンパク質ナノ薄膜を「硬く」感知していることを裏付けている。

以上より、液々界面培養に用いる液体として新たにイオン液体をその候補に加えることに成功した。また、イオン液体のデザイナー液体としての特徴を利用することで、その構造設計により、液体の物理化学的特性を調節し、形成されるタンパク質ナノ薄膜の設計ならびに細胞接着・運命制御できることを実証することができた。

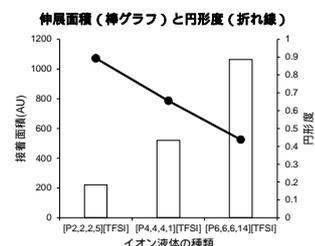


図2. ホスフォニウム系イオン液体上でのhMSCの接着挙動。

(2) ナノフィブリルタンパク質を用いた細胞メカノセンシング機構の探究

天然のlysozymeは、BSAなどと同様に、水/PFO界面で密に詰まったタンパク質ナノ薄膜を形成するのに対し(図3A)、熱処理してナノフィブリル形成した後に界面に添加すると、繊維構造を維持したまま界面に集積化する様子が観察された(図3B)。このことより、前処理によって液々界面に形成するタンパク質の形態を制御できることが分かった。つぎにこの上でhMSCを接着させると、いずれの表面においてもhMSCは良く接着し、ここに細胞のミオシン阻害剤、アクチン重合阻害剤、ROCK阻害剤を抑える薬剤を添加すると、いずれの場合も細胞の接着面積は低下し、細胞は界面に形成されるタンパク質ナノ薄膜を力覚していることが明らかになった。次に初期神経マーカーのTUBB3と成熟マーカーのMAP2の発現を調べたところ、いずれの遺伝子もナノフィブリルを形成した方が高い発現量を示した(図3C)。これら神経マーカーの発現は、ポリスチレンディッシュ(TCPS)を同様にタンパク質コーティングしたものよりも有意に発現量が増大しており、液々界面によるさらにナノフィブリル形成の効果が高まることが明らかになった。

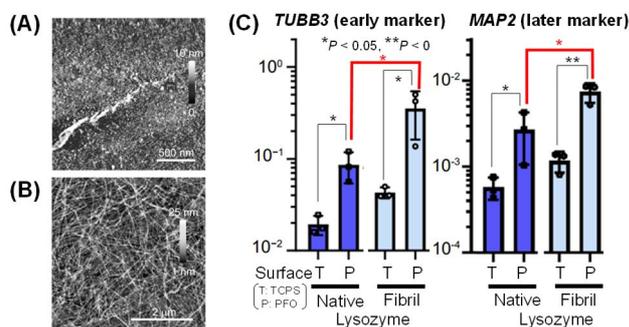


図3. 水/PFO界面に形成したリゾチームナノフィブリルの(A)蛍光と(B)AFM画像

つづいてナノフィブリル線維に対する細胞力覚における脂質ラフトの関与を調べた。水/PFO界面に形成したlysozymeナノフィブリル上に接着したhMSCを低濃度のmethyl-β-cyclodextrin(MβCD)処理により脂質ラフトを崩壊させたところ、TUBB3の発現量には変化がなかったものの、接着班部におけるFAKのリン酸化が低下するとともに、MAP2の発現量も大幅に減少する

ことが分かった(図4).これはTCPS上では見られない液々界面に特異的な現象である.以上より,先の我々の報告で見られた液々界面のアダプティブな特徴によって形成されたナノ構造と細胞側の脂質ナドメインのナノスコピクな構造共鳴が神経分化誘導の本質であるというメカノセンシング機構が明らかになった.

以上のように,本研究を通して液々界面培養技術にイオン液体に拡充することに成功するとともに,液々界面における hMSC の神経分化機構に関する有用な知見を得ることができた.

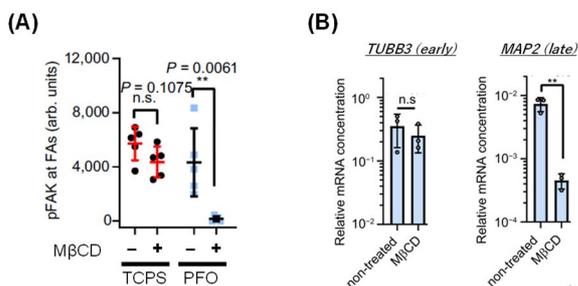


図4. 水/PFO界面に形成したリゾチームナノフィブリル上に接着した(A)細胞の焦点接着におけるFAKのリン酸化.(B)MβCD添加による初期・後期神経分化マーカーの発現量の変化.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chang, A. C.; Uto, K.; Abdellatef, S. A.; Nakanishi, J.	4. 巻 38
2. 論文標題 Precise Tuning and Characterization of Viscoelastic Interfaces for the Study of Early Epithelial-Mesenchymal Transition Behaviors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.1c03048	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 該当する
1. 著者名 S. Yamamoto and J. Nakanishi	4. 巻 37
2. 論文標題 Epidermal growth factor-gold nanoparticle conjugates-induced cellular responses: Effect of interfacial parameters between cell and nanoparticle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 741-745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCP16	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 K. Homma, A. C. Chang, S. Yamamoto, R. Tamate, T. Ueki, and J. Nakanishi	4. 巻 132
2. 論文標題 Design of azobenzene-bearing hydrogel with photoswitchable mechanics driven by photo-induced phase transition for in vitro disease modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomater.	6. 最初と最後の頁 103-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2021.03.028	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 該当する
1. 著者名 A, C, Chang, K. Uto, K. Homma, and J. Nakanishi	4. 巻 274
2. 論文標題 Viscoelastically tunable substrates elucidate the interface-relaxation-dependent adhesion and assembly behaviors of epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2021.120861	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 該当する

1. 著者名 X. Jia, J. Song, W. Lv, J. P. Hill, J. Nakanishi, K. Ariga	4. 巻 13
2. 論文標題 Adaptive liquid interfaces induce neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through lipid raft assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30622-y	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中西淳
2. 発表標題 散逸材料上での細胞挙動の研究
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakanishi, J.
2. 発表標題 Viscoelastic interfacial materials for analyzing and engineering cellular mechanobiological responses
3. 学会等名 MRM 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakanishi, J.; Chang, A. C.; Uto, K.
2. 発表標題 Impact of Interfacial Viscoelasticity on adhesion and assembly behaviors of epithelial cells
3. 学会等名 MRS-J 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakanishi, J.
2. 発表標題 Unique apoptosis-inducing activity of epidermal growth factor upon tethering to nanoparticles
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Tatematsu, S. Yamamoto, K. Yamaguchi, M. Kamimura, J. Nakanishi
2. 発表標題 Development of Photoactivatable Cell Culture Substrate with Controlled Mechanical and Chemical Properties
3. 学会等名 MANA Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 J. Nakanishi
2. 発表標題 Material-based Mechanobiology
3. 学会等名 India-Japan Webinar on Nanotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 J. Nakanishi
2. 発表標題 Photoreponsive substrates for resolving mechanobiology in cell migration
3. 学会等名 2nd Virtual European Polymer Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Nakanishi, J.; Yamamoto, S.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Japan	5. 総ページ数 12
3. 書名 Geometrical and Mechanical Nanoarchitectonics at Interfaces Bridging Molecules with Cell Phenotypes	

1. 著者名 Nakanishi, J; Uto, K.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 350
3. 書名 Material-based Mechanobiology	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞牽引エネルギー測定システム、細胞牽引エネルギー測定方法、及び液 - 液界面観察用容器	発明者 中西淳, 陸洲, 天神林瑞樹	権利者 物質・材料研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、2022-050055	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	上木 岳士 (UEKI Takeshi) (00557415)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主任研究員 (82108)	

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