

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：82108

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750093

研究課題名（和文）ケージド細胞培養基材を用いた細胞微小環境の光制御と細胞機能分析

研究課題名（英文）Control of cellular microenvironments and analysis of cellular functions by using caged culture substrates

研究代表者

中西 淳（NAKANISHI JUN）

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・独立研究者

研究者番号：60360608

研究成果の概要（和文）：外部刺激に応じて細胞接着性が変化する基板は、基礎研究や組織工学等に重要である。本研究では、光応答性のケージド細胞培養基材の発展と応用範囲の拡大を目指した。表面アミノ基密度の制御と同官能基の光解離性ポリエチレングリコールによる修飾で、基板のスペックが格段に向上した。また、微小環境を精密に制御した細胞の移動挙動を調べることで、細胞間相互作用の時空間的な成熟が、集団性の獲得につながることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Dynamic substrates that change surface cell adhesiveness in response to an extracellular stimulus are useful for fundamental biological studies as well as tissue engineering applications. This project focused on the development and applications of photo-responsive “caged culture substrates”. By functionalization of a surface with the controlled amino group density, we succeeded in improving the photoswitching efficiency. Furthermore, by analyzing cell migration in controlled cellular microenvironments, we found that the cells achieve collective characteristics as increasing cluster size as well as incubation time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析

1. 研究開始当初の背景

生体内における細胞は、ホルモンなどの液性因子のみならず、近接する細胞や細胞外マトリクス（ECM）が構成する微小環境により活性が調節されている。したがって、細胞機能の理解を目指す基礎研究や培養細胞を対象とした薬効・毒性試験においても、この点を考慮して生体を模倣した微小環境を構築することが望ましい。外部刺激に応じて表面の細胞接着性が変化する動的基板は、複数種の細胞の位置選択的な配置や細胞移動の誘導が実施可能である。我々は、先に光応答性

の動的基板としてケージド細胞培養基板を開発し、一連の研究を進めてきた。ケージド細胞培養基板の理想型は、光照射前は「完全に」細胞接着を抑え、光照射後に「即座に」細胞接着性になる基板である。しかも、その機能が長期間にわたって維持されるのが望ましい。ただ、残念ながら先の基板では、時間とともに細胞排除能が低下するという欠点があった。

2. 研究の目的

（1）光照射前は細胞接着を「完全に」抑え、

光照射後に「即座に」細胞接着性となる新規ケージド細胞培養基板の開発。

(2) 本技術を用いた細胞微小環境の制御による細胞機能の理解。

3. 研究の方法

(1) 末端に光解離性の活性エステルを有するポリエチレングリコール (PCP, 分子量 2000 or 5000) を合成した (図 1 A)。次に, アミノプロピルシラン (APTES) とプロピルトリエトキシシラン (PTES) の混合溶媒でガラス基板を修飾することで, 表面アミノ基の密度を制御した基板を作製した (図 1 B)。この基板を前記 PCP を修飾することでケージド細胞培養基板を開発した。この基板表面の物理化学的評価 (接触角, ゼータ電位, 膜厚) およびタンパク質・細胞付着力の変換効率を評価し, 所望の機能を有するかを評価した。

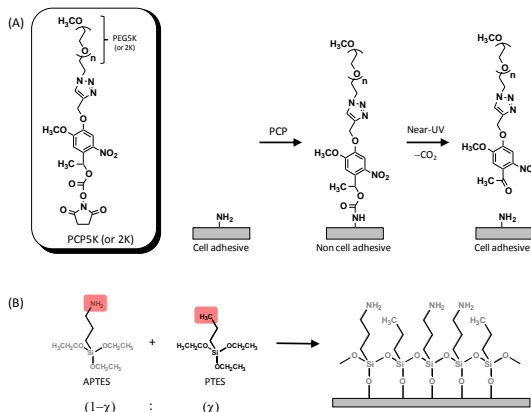


図 1. 光解離性 PEG を用いたケージド細胞培養基板の作製と 2 種類のシランによる表面アミノ基密度の制御。

(2) ケージド細胞培養基板上で, 細胞集団の幾何学的形状を厳密に規定することで細胞の微小環境を制御した (図 2)。その後, 光照射を行うことで細胞移動を誘導した。この際に集団性の指標として先端端に発生するリーダー細胞に注目し, 細胞微小環境への依存性を調べた。

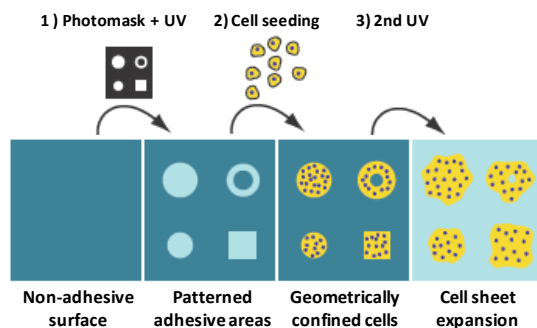


図 2. ケージド細胞培養基板を用いた細胞集団移動の微小環境依存性の評価

(3) 金基板の表面にニトリロトリ酢酸 (NTA), 光分解性の PEG およびトリエチレングリコール (EG3) を有する三種類のジスルフィドで修飾し, 光照射に応じて His-tag タンパク質を補足する基板を作製した (図 3)。His-tag タンパク質としてフィブロネクチンの細胞接着領域の断片 (His-FNIII₇₋₁₀) を用いることで, 特定のタンパク質を介して細胞接着を光制御するケージド細胞培養基板を開発した。

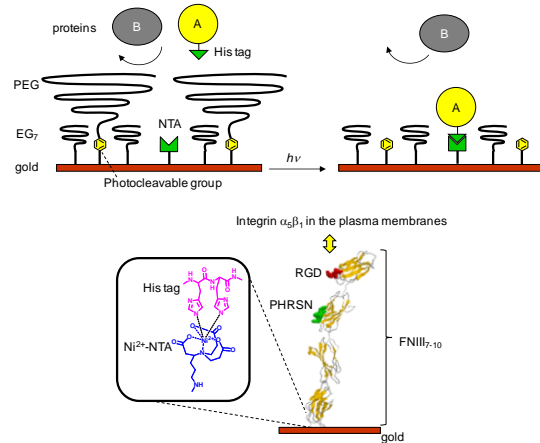


図 3. 特定タンパク質を介して細胞を付着するケージド細胞培養基板

4. 研究成果

(1) 先の論文で (Kaneko et al., Phys. Chem. Chem. Phys., 2011) では, APTES が 100% の基板に PCP5K を修飾した基板を報告したが, この基板は, 光照射後に強い細胞接着性を示すが, 細胞のパターンが 2 日程度で崩れてしまうという欠点もあった (図 5 A)。この現象がおこる原因として, APTES のアミノ基による正電荷が強すぎるために, PEG 修飾後も表面のゼータ電位が残存し, タンパク質の付着, ひいては細胞の接着 (光非照射部位への) を引き起こしていることが予想された。そこで, 適当比で混合した APTES と PTES の混合溶液でカバーガラスを処理し, アミノ基の表面密度の異なる基板を調製した (PTES のモル分率を χ とする)。表面のゼータ電位の絶対値は低下し, それに対応するように FITC-BSA の吸着量も減少した (図 4 A,B)。一方, PTES の混合によりアミノ基密度を減少させた基板では, PEG 化によるゼータ電位の低下がより顕著に見られ, それと同様に FITC-BSA の吸着も大幅に低下した (図 4 A,B)。 $\chi = 0.8$ の基板に PEG5K および PEG2K を修飾した基板では, 細胞は 2 時間で十分に伸展し, しかも 8 日間以上細胞パターンが維持された (図 5 B)。このように, 基板表面のゼータ電位は, 光照射面への細胞接着性のみならず, 光非照射面へのタンパク質の非特異吸着, ひいては細胞パターンの維持時間と深く関係するこ

とが分かった。以上より、表面のシラン層のアミノ基密度の調整および PCP5K および PCP2K の植え継ぎにより、①照射により即座に強い接着性を示し、②しかも長期間細胞パターンが維持できるという、所望の機能を示す基板の作製に成功した。

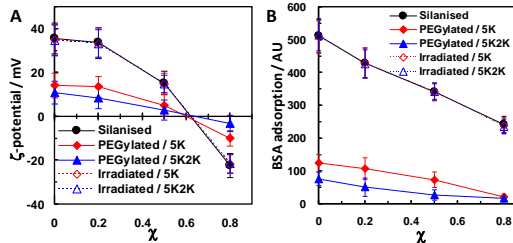


図4. 種々の表面組成および PCP の植え継ぎを行った基板のゼータ電位およびタンパク吸着量

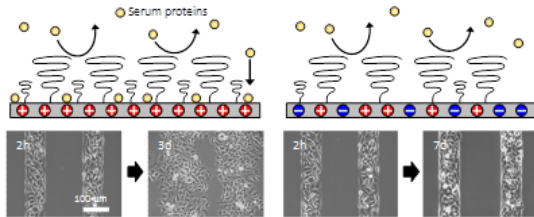


図5. (上) 表面電荷および植え継ぎ PCP のタンパク吸着抑制への効果 (予想図)。 $\chi=0$ および $\chi=0.8$ の PCP 植え継ぎ基板の細胞パターン維持能。

(2) 創傷治癒のプロセスにおいて、上皮細胞はシート状の移動挙動を示し、移動の先端部では活発に仮足を形成するリーダー細胞が出現し、その他の細胞はリーダーに追随するフォロワー細胞となることが知られている。ただ、それを運命づける外的・内的要因は明らかになっていない。そこで、図2に示したように、ケージド細胞培養基板を用いて細胞集団移動の微小環境依存性を調べた。集団の形状を円形に保ちつつ、領域の半径を $44 \mu\text{m}$ から $142 \mu\text{m}$ に増大させると、リーダー細胞の出現頻度は単調に減少した (図6 A)。一方で、半径 $142 \mu\text{m}$ の円形領域において、中心部を除いたドーナツ形状にしたところ、リーダー細胞の出現頻度は変化しなかった。この際、ドーナツの内側に収縮する細胞にも着目注目すると、外側に拡張する細胞よりもリーダー細胞の出現頻度が低いことを見いだした (データ省略)。このことから、リーダー細胞の出現は、集団規模に加えて境界部の曲率の影響を受けることを示唆しているが、あきらかになった。さらに、このドーナツ状の細胞の培養時間を 9, 25, 38 時間と変化させたところ、培養時間が短い方がリーダー細胞の出現確率が高いことが分かった (図6 B)。以上より、細胞間相互作用の時空間的な成熟が、集団性の獲得につながる事が明らかになった。

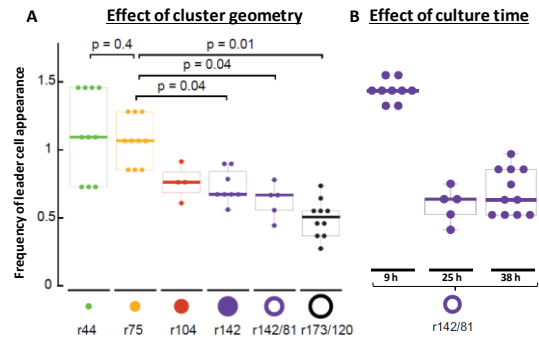


図6. リーダー細胞の出現率の細胞集団の(A)幾何学的形状および(B)培養時間への依存性

(3) 三種類のジスルフィドの混合比を最適化することで、照射応答的に His-FNIII₇₋₁₀ は捕捉するが、His-tag を有さない BSA は固定化しない組成を突き止めた。実際にこの組成の基板を細胞培養に用いると、細胞は His-FNIII₇₋₁₀ 存在時のみに照射パターンに応じたコロニーを形成した (図7 A-C)。一方で、競争阻害剤として GRGDS ペプチドを添加した場合には細胞は接着せず (図7 D)、また免疫染色実験で、フィブロネクチン受容体であるインテグリン $\alpha 5$ 抗体では染まり、ビトロネクチン抗体である αV 抗体では染まらないことから (図7 E, F)、確かに細胞は His-FNIII₇₋₁₀ を介して接着していることが分かった。以上のように、本手法を用いることで、ECM タンパク質の種類という細胞微小環境を記述する上で極めて重要な要素を規定しながら動的パターンニングが実施できるようになった。

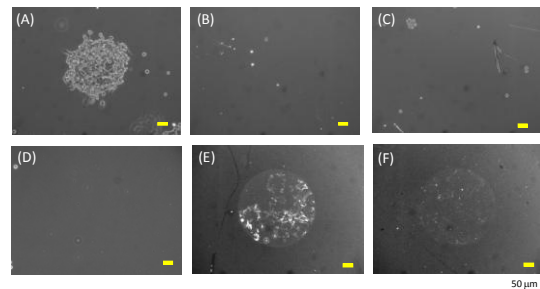


図7. 特定タンパク質を光応答的に捕捉する基板による細胞パターンニング. (A) His-FNIII₇₋₁₀ 存在下 (B) 非存在下, (C) 野生型 FN 存在下, (D) GRGDS 存在下でのパターンニング. (E) $\alpha 5$ および (F) αV 型インテグリン抗体による染色

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3件)

- ① S. Kaneko, K. Yamaguchi, and J. Nakanishi, "Dynamic Substrate Based on Photocleavable Poly(ethylene glycol): Zeta

Potential Determines Capability of Geometrical Cell Confinement", Langmuir, in press, 査読有り.

DOI: 10.1021/la304569e

- ② C. Rolli, H. Nakayama, K. Yamaguchi, J. P. Spatz, R. Kemkemer, and J. Nakanishi, "Switchable adhesive substrates: Revealing geometry dependence in collective cell behavior" Biomaterials, 33, 2409-2418 (2012), 査読有り.

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.012

- ③ J. Nakanishi, H. Nakayama, K. Yamaguchi, A. Garcia, and Y. Horiike, "Dynamic Culture Substrate That Captures Specific Extracellular Matrix Protein in Response to Light", Science and Technology of Advanced Materials, 12, 044608 (2011), 査読有り.

DOI: 10.1088/1468-6996/12/4/044608

〔学会発表〕(計2件)

- ① 中西 淳, 金子信悟, 山口和夫, 堀池靖浩, 「ケージド培養基板の細胞接着性変換能向上のための検討」, 第60回高分子討論会, 2011年9月29日, 岡山
- ② 中西 淳, 金子信悟, 山口和夫, 堀池靖浩, 「細胞移動計測に適したケージド培養基板の開発」, 日本分析化学会第60年会, 2011年9月16日, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 淳 (NAKANISHI JUN)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・独立研究者

研究者番号: 60360608

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし