

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882048

研究課題名(和文) 近赤外光で弾性が制御可能なゲルを用いる細胞運動の時空間解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal analysis of cell movement based on near-infrared responsive stiffness controlled polymeric hydrogels

研究代表者

上村 真生 (Kamimura, Masao)

東京理科大学・基礎工学部・助教

研究者番号：80706888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近赤外光により弾性が変化する新奇なゲルを開発し、細胞培養基板に応用することを目指した。基材に用いるためのゲルとして、任意の弾性に制御したポリアクリルアミドゲルを作製し、ゲル表面に細胞接着性を付与することで、実際に細胞が接着できる様子を確認した。また、架橋点となる希土類含有セラミックス発光ナノ粒子を合成し、ナノ粒子表面にポリエチレングリコール/ポリアクリル酸共重合体を固定することに成功した。今後、これらの材料を組み合わせることで、近赤外光応答性弾性基板を作製し、細胞運動の挙動を解明する研究への利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is preparation of near-infrared light stimuli responsive polymeric hydrogel and application for cell culture substrate. Stiffness controlled polyacrylamide gel was prepared as the substrate. Additionally, as a cross-linker, near-infrared excited nanoparticle, rare-earth doped ceramic nanoparticles was also synthesized. The surface of nanoparticle was effectively modified by poly(ethylene glycol) based block copolymer. The obtained materials can be applied for preparation of near-infrared light stimuli responsive polymeric hydrogel.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：バイオマテリアル ゲル 細胞接着 ECM 細胞移動 メカノバイロロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞が自らの居場所を変化させる現象である細胞移動は、形態形成や表皮の再生などの生理現象のみならず、ガン細胞の浸潤・転移などの病態にも関与する。細胞移動の機構を解明することは、生命の構成原理を探るという学術的意味のみならず、その制御が可能になれば、ガン細胞の拡散防止や細胞組織体の構築などの医工学的な応用も期待される。さらに近年、幹細胞やガン細胞の研究から、細胞の様々な活動が、細胞外マトリクス (ECM) といった細胞周辺環境 (ニッチ) による調節を受けることが明らかとなっている。とりもなおさず ECM の力学的特性は細胞の移動挙動にも影響を及ぼすことが指摘されているが、分化のように、"日(day)" オーダーで進む現象と異なり、細胞はその場その場で足場の弾性を感知していることが予想され、その制御機構を解明するためには、弾性を高い時間(空間)分解能で制御できる材料の開発が重要な意味を持つ。弾性を制御可能な材料として、UV 照射で架橋構造を切断することで弾性を制御可能な光分解性ゲルが報告されている。しかしながら、ゲルの弾性を変化させながら細胞移動を観察する際には、長時間の連続 UV 照射が必要とされ、細胞に重大なダメージ(光毒性)を与えることが懸念される。一方で、近赤外(NIR)光(> 700 nm)は、UV 光(< 400 nm)と比べて低エネルギーであることが一般的に知られ、NIR 光を基板の弾性制御に利用できれば、照射が細胞移動にほとんど影響を与えないことが期待される。

2. 研究の目的

ECM の弾性が幹細胞の分化や細胞の運動性などを変化させることが指摘されているが、その制御機構については不明な点が多い。本研究では NIR 照射により弾性が変化する新奇なゲルを開発し、このゲルを細胞培養基板に用いて、ゲルの弾性が細胞の運動性に及ぼす影響を時空間的に解析することで、ECM の弾性が細胞移動現象に与える影響を体系的に明らかにすることを目指した。申請者はこれまでに、NIR 光励起により UV または可視光を発生する(アップコンバージョン発光)希土類含有セラミックスナノ粒子(UCNP)の粒子表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾することで、生体内外の目的分子・部位を観察する蛍光バイオイメージングに応用する研究を行ってきた。UCNP は励起光源に NIR 光を用いるため、UV 光と比較して生体へのダメージを大幅に軽減することができる。一方で近年、UCNP を光分解性ゲル中に混合し、NIR 光励起に伴って UCNP から放射される UV 発光によりゲル架橋の切断を行う方法が提案されている。しかしながら、このゲル上で細胞培養を行う場合、NIR 励起光の強度によっては、UCNP の UV 発光

がゲル上の細胞に影響を与える可能性がある。このような研究背景を踏まえ、本研究では、UCNP 自体を架橋点とすることで、細胞にダメージを与えずにゲルの弾性を調節できる新奇な NIR 光応答性ゲルを開発する。さらにこのゲル上において、NIR 照射でゲルの弾性を制御し、細胞運動の時空間解析を行うことを目指した。

本研究でははじめに、弾性を制御したゲルを作製し、このゲル表面に細胞接着性を付与することで細胞培養基板への応用を試みた。また、NIR 光応答性ゲルの架橋点となる UCNP の合成およびナノ粒子表面へのポリマー導入を行った。さらに応用研究として、光応答性ポリマーを 96well ガラスプレート上に修飾することで光応答性表面を作成し、薬物スクリーニング材料としての応用を試みた。

3. 研究の方法

本研究ではまず、弾性を制御したポリアクリルアミドゲル基板を作製し、ゲル表面上に細胞附着性を付与することを試みた。UV-オゾン洗浄したカバーガラスに、メタクリル酸 3-(トリメトキシシリル)プロピルを反応させることで表面にメタクリル基を導入した。次に、混合比を調節したアクリルアミドとビスアクリルアミドの水溶液に、過硫酸アンモニウムとテトラメチルエチレンジアミンを添加した後、カバーガラス上に滴下し、疎水化ガラスでゲルを圧縮成型することで、ポリアクリルアミドゲル基板を作製した。さらに、このゲル上に、光活性化架橋剤(Sulfo-SANPAH)を紫外照射によって固定し、Sulfo-SANPAH の活性エステル基と PDL のアミノ基を反応させることで PDL 修飾表面を作製した。得られた光応答性基板の特性はゼータ電位測定および蛍光標識ウシ血清アルブミン(FITC-BSA)の吸着量測定により評価した。細胞附着性の確認はイヌ腎臓尿管上皮由来 MDCK 細胞を PDL 修飾ゲル基板上に播種し、接着性の有無を確認した。

次に、NIR 光応答性ゲルの架橋点となる、UCNP を合成した。サイズがそろった UCNP を合成可能な方法として知られる熱分解法を用いて、オレイン酸(OA)が粒子表面に配位した希土類イオンドープ NaYF₄(OA-NaYF₄) ナノ粒子(平均粒径 60 nm)を合成した。この OA-NaYF₄ ナノ粒子をシクロヘキサン中に分散させ、NOBF₄ の DMF 溶液に滴下し、攪拌・混合することで OA を粒子表面から脱離させた。ナノ粒子を遠心精製後、DMF 中に再分散させ、PEG の片末端にポリアクリル酸(PAAc)のブロック構造を有するポリマー(PEG-*b*-PAAc)(Mn = 5000/2800)を加えて攪拌・混合することで、ナノ粒子表面の PEG 修飾を行った(PEG-NaYF₄)。この PEG-NaYF₄ ナノ粒子の特性を、FT-IR 測定、 ζ 電位測定、DLS 測定、TEM 観察により評価した。

また応用研究として、NIR 光応答性ゲルのリンカーとして用いるための光分解性ポリエチレングリコール(PEG)を、市販のガラスボトム 96 ウェルプレート上に修飾し、細胞移動現象を利用したハイスループットな薬物アッセイ系への発展を検討した。はじめにカバーガラス基板上に光応答性表面を作製し、その機能性を評価した。基板上に静電相互作用によってポリ-D-リジン (PDL) を吸着させ、さらにポリエチレングリコール (PEG) の片末端に光分解性の 2-ニトロベンジル基を介して活性エステル基を有する光解離性 PEG (PCP) で修飾した。この際、表面の PEG 密度を高めるために、分子量 5000 の PCP と 2000 の PCP を逐次反応させた。基板表面はゼータ電位および蛍光標識 BSA の吸着量によって評価した。その後、MDCK 細胞を基板上に播種し、光照射による細胞移動の誘導を検討した。また、同様の修飾をガラスボトム 96 ウェルプレート上に施し、細胞移動能を調節する薬剤の影響や細胞が移動する幾何学的空間による薬剤の効き方の違いを調べた。

4. 研究成果

はじめに、ヤング率がそれぞれ 5 kPa と 55 kPa のポリアクリルアミドゲル基板を作製した。作製したゲルのヤング率は、既報に従い、蛍光ビーズ取り込ませたゲル上に重さが既知のスチレン球を静置した前後における、蛍光ビーズの焦点のずれを共焦点顕微鏡により観察、算出した。このゲル上に、Sulfo-SANPAH を用いて、細胞付着性を有する PDL を修飾した。作製した弾性基板のゼータ電位を測定したところ、ポリアクリルアミド表面ではゼータ電位がほぼ 0 mV であったのに対して、PDL 修飾時に +80 mV 付近を示しており、PDL によって基板表面が修飾されていることを確認した。次に、基板表面への FITC-BSA の吸着量を測定したところ、ポリアクリルアミド表面には FITC-BSA がほとんど吸着できないのに対して、PDL 修飾によって FITC-BSA 吸着量が大幅に増加することが明らかとなった。さらに、作製した弾性基板上に MDCK 細胞を播種し、細胞の付着性を確認した。この結果、表面未修飾のポリアクリルアミド表面には細胞がほとんど接着できないのに対して、PDL 修飾ゲル表面では細胞が接着、伸展している様子が確認された(図 1)。この結果から、得られた PDL 修飾ゲルは、細胞接着性を有し、細胞運動の観察に用いることが可能であることが明らかとなった。

次に、ゲルの架橋点に用いるための UCNP の合成を検討した。熱分解法によって作製した OA-NaYF₄ ナノ粒子の表面に、リガンド置換により PEG-*b*-PAAc を導入した。調製した PEG-NaYF₄ ナノ粒子の FT-IR 測定より、PEG-*b*-PAAc 由来と考えられるピークが存在を確認した。さらにこの PEG-NaYF₄ ナノ

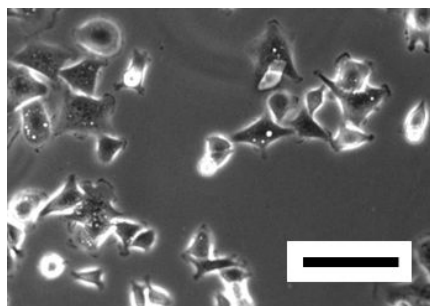


図 1. PDL 修飾ゲル(55 kPa)表面上における細胞接着の様子。

粒子の ζ 電位を測定したところ、pH によらずニュートラル付近を示しており、NaYF₄ ナノ粒子表面に PEG-*b*-PAAc が吸着し、電位が遮蔽されているものと考察した。次に PEG-NaYF₄ ナノ粒子の水中における粒径を DLS によって評価した。疎水性表面を有する OA-NaYF₄ ナノ粒子は水中で分散することができないが、PEG-NaYF₄ ナノ粒子は水中において高い分散性を示し、平均粒径 65 nm で単分散であることが明らかとなった。これらの結果から、得られた PEG-NaYF₄ は、粒子表面に PEG が固定されており、同様の手法で光分解性 PEG を導入することで、ゲルの架橋点に用いるための光分解性リンカーを作製することが可能であると考えられる。

さらに本研究では、応用研究として、PCP をガラスボトム 96 ウェルプレート上に修飾し、細胞移動現象を用いた薬物アッセイへの展開を試みた。まずモデル実験として、カバーガラス上に PDL、PCP を修飾することで、光応答性基板を作成した。ゼータ電位測定の結果、はじめ -120 mV だったガラス表面が、カチオン性の PDL の吸着によって +120 mV に変化し、さらに PCP を修飾することでほぼ 0 mV 付近を示すことが明らかとなった。次に、この修飾過程での基板表面への FITC-BSA の吸着量の変化を調べたところ、PDL 修飾によって FITC-BSA 吸着量が増加したが、PCP 修飾によって吸着量が大幅に抑制され、その後に光照射によって PCP を解離させたところ、FITC-BSA 吸着量が PDL 表面とほぼ同程度まで回復した。また、この基板の円形領域を光照射した後に細胞を播種すると、照射パターンに対応した細胞接着が観察され、その後に二次照射をすると細胞移動を誘導できることがわかった。以上より、この修飾法でガラス基板に光応答性を付与することができることが明らかとなった。さらに、市販のガラスボトム 96 ウェルプレートに同様の表面修飾を行い、細胞の移動する空間が薬剤応答に与える影響を調べた。初めに一次照射で大きな長方形の細胞接着領域を形成し、そこに接する幅 20 μm と 200 μm の領域を光照射して細胞移動を誘導した。この際、ミオシン阻害剤のプレバスタチンを様々な濃度で添加したところ、プレバスタチンが通路幅に応じて細胞を減速 / 加速させ

ることが分かった。これらの結果から、このアッセイ系は細胞の微小空間に注目した細胞移動を用いた薬物スクリーニングに有用であることが明らかとなった。

今後、これらの材料を用いて、NIR 光応答ゲルを作製し、細胞運動の挙動を進めることで、これまでに観察することが難しかった、弾性が変化し続ける基板上での細胞の運動挙動を解明できると期待される。

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 2 件)

Masao Kamimura, Olivia Scheideler, Yoshihisa Shimizu, Shota Yamamoto, Kazuo Yamaguchi, Jun Nakanishi, Facile preparation of a photoactivatable surface on a 96-well plate: a versatile and multiplex cell migration assay platform, Physical Chemistry Chemical Physics, (2015), 17, 14159-14167, (Doi: 10.1039/c5cp01499a) 査読有.

Masao Kamimura, Yukio Nagasaki, PEGylated ceramic nanophosphors: latest developments and applications, Hot Topics in Biomaterials, (2014), 90-102, (Doi: 10.4155/ebo.13.390) 査読有.

[学会発表](計 7 件)

Masao Kamimura, Kohei Soga, Biofunctional polymer modification on ceramic nanophosphors for near-infrared biophotonics, 39th International Conference and Expo on Advanced Ceramics and Composites, 2015 年 1 月 25 日~30 日, Hilton Daytona Beach Resort and Ocean Center, FL, USA

上村 真生, 山口 和夫, 中西 淳, 力学・幾何学的に制御された「場」における細胞集団移動の解析: 光応答性弾性基板を用いるアプローチ, 第 36 回日本バイオマテリアル学会, 2014 年 11 月 17 日~18 日, タワーホール船堀, 東京

上村 真生, ナノ粒子による次世代治療・診断技術, 長野県テクノ財団第 2 回健康バイオ産業促進研究会, 2014 年 10 月 29 日, ホテル信濃路, 長野

上村 真生, 山口 和夫, 中西 淳, 細胞集団移動のメカノバイオロジーのための新規光応答弾性基板, 第 63 回高分子討論会, 2014 年 9 月 24 日~26 日, 長崎大学, 長崎

上村 真生, 山口和夫, 中西 淳, 生体に近似する弾性率を示す「場」における細胞集団移動現象の分析, 日本分析化学会第 63 年会, 2014 年 9 月 17 日~19 日, 広島大学, 広島

Masao Kamimura, Kohei Soga, Biofunctional Polymers for Application of Ceramic Nanoparticles for Fluorescence Bioimaging, 2014 Japan-Taiwan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES 2014), 2014 年 9 月 12 日-15 日, Hsinchu, Taiwan

上村 真生, 山口 和夫, 中西 淳, 新規光応答弾性基板を用いる細胞集団移動の解析, 第 24 回バイオ・高分子シンポジウム, 2014 年 7 月 24 日~25 日, 東京工業大学, 東京

[図書](計 1 件)

Masao Kamimura, Yukio Nagasaki, PEG block copolymer based micelles as drug delivery carrier, Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development, 2014, pp285-298 (ISBN: 9780444626141).

[その他]

ホームページ等

<http://sogalabo.jp/jp/>

http://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/index.php?696d

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 真生 (Kamimura Masao)

東京理科大学 基礎工学部 材料工学科 助教

研究者番号: 80706888