

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20183

研究課題名（和文）基材表面微小凹凸構造によって誘起される細胞の軟領域指向性運動メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of soft-domain-directed movement of cells induced by micro-topography of substrate surfaces

研究代表者

佐々木 沙織（Sasaki, Saori）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：20772320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：機能性材料、特に生体模倣ソフトハイドロゲルの表面の微細なしわを正確に制御することはまだ困難である。この問題を解決するために、ゼラチンゾルをグルタルアルデヒド（GA）で2段階に架橋する手法を開発した。本研究では、ゲル表面に自発的に形成されるマルチスケールの微細凹凸構造の精密な制御法を確立することで、バイオミメティックなプラットフォームを開発した。本研究は弾性率と微細凹凸構造の独立制御を可能とする細胞培養ハイドロゲルを開発し、表面微細凹凸構造への細胞遊走挙動メカニズムを明らかにしているものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞遊走は、恒常性の維持、様々な生理機能の発現や、組織・器官の発生において基礎をなす機能である。細胞外環境の特性が細胞の接着、伸展、増殖、分化などの特性に決定的な影響を与える。得られたゲルは表面微細凹凸構造への細胞遊走挙動を観察するプラットフォームとして期待できる。また、細胞形状が微細凹凸構造に反応していることが示されており、細胞操作材料としての応用も期待される。細胞の遊走について新たなメカニズムが提案されることは、細胞バイオメカニクス領域の発展に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is still difficult to precisely control the surface micro-wrinkles of functional materials, especially biomimetic soft hydrogels. To solve this problem, we developed a two-step cross-linking method of gelatin sols with glutaraldehyde (GA). In this study, we developed a biomimetic platform by establishing a method to precisely control the multi-scale microporosity structures that spontaneously form on the gel surface. This study has developed a cell culture hydrogel that enables independent control of elastic modulus and microporosity structure, and can elucidate the mechanism of cell migration behavior to the surface microporosity structure.

研究分野：材料工学

キーワード：ゼラチン ハイドロゲル リンクル構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞遊走は、恒常性の維持、様々な生理機能の発現や、組織・器官の発生において基礎をなす機能である。細胞外環境の特性が細胞の接着、伸展、増殖、分化などの特性に決定的な影響を与える。従来研究において、細胞は基材の硬さの違いを感知し、接着した基材表面に弾性率勾配がある場合、より硬い領域へ遊走することが知られている。この運動はがん細胞などで観察されている。それに対し軟らかい領域に凹凸構造が存在する場合において細胞が軟らかい領域に遊走することが観察された。この指向性運動は従来のように焦点接着斑の牽引力差によって説明することができない。しかし、これが凹凸構造によるものなのかは明らかになっていない。生体内のトポグラフィーは、細胞の機能配置と恒常性維持の両方の役割を担っている。生体組織を模倣することでゲル上に生命機能を再現することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

しかし、機能性材料、特に生体模倣ソフトハイドロゲルの表面の微細なしわを正確に制御することはまだ困難である。この問題を解決するために、ゼラチンゾルをグルタルアルデヒド (GA) で 2 段階に架橋する手法を開発した。本研究では、ゲル表面に自発的に形成されるマルチスケールの微細凹凸構造の精密な制御法を確立することで、バイオミメティックなプラットフォームを開発した。本研究は弾性率と微細凹凸構造の独立制御を可能とする細胞培養ハイドロゲルを開発し、表面微細凹凸構造への細胞遊走挙動メカニズムを明らかにしうるものである。

3. 研究の方法

ゼラチンゲルへの表面追加架橋によってゲル表面に微細凹凸構造を導入した。化学架橋ゼラチンゲルに対して表面に架橋剤を更に添加することによって、表面バルク間で弾性率勾配が発生し膨潤時に表面が座屈する。ゼラチン粉末 (和光純薬) を 60 以上の純水に 10 分以上溶解して、ゼラチンプレゲル水溶液を得た。ゼラチンの量は 20wt% に調整した。その後、ゼラチンプレゲル水溶液 (1.6g) をポリエチレンディッシュ (内径 33mm) に流し込み、濃度の異なるグルタルアルデヒド (GA) 溶液を加えた後直ちにスピコートした。40 で一晩ゲル化後、PBS で洗浄を行い、GA 溶液を加えて追加架橋を行った。バルクの架橋剤濃度および追加の架橋剤濃度に応答して微細凹凸構造が変化することを確認し、そのゲル化条件を最適化した。

得られたハイドロゲルを用いて、細胞遊走における表面微細凹凸構造応答を観察した。本実験においては不死化間葉系幹細胞を用いた。ゲル上に 1000 cell / cm² で細胞を播種し、8 時間後から 24 時間タイムラプス撮影 (10 分間隔) を行って微細凹凸構造指向性運動の有無を調べた。

4. 研究成果

ゼラチンゲルへの表面追加架橋によってゲル表面に微細凹凸構造を導入した。Figure 1 に周期幅が異なる表面微細凹凸ゲルの表面を位相差顕微鏡で観察した結果を示す。一方、追加架橋時の GA 濃度が高いほど、微細凹凸構造の波長は劇的に増加しており、これは表面弾性率と表面薄膜厚さが増加したことに応答している。位相差顕微鏡で観察したところ、微細凹凸構造には種々のパターンがあり、ドットパターン、ピーナッツ状のへこみ、針状のスリット、T 字型の星状などが見られた。弾性率の変化に敏感に反応する微細凹凸構造は、その周期が大きく変化することを示唆していると考えられる。さらに、架橋条件が同じであってもスピコート速度に応答してリンクル構造が大きく変わることが明らかになった。

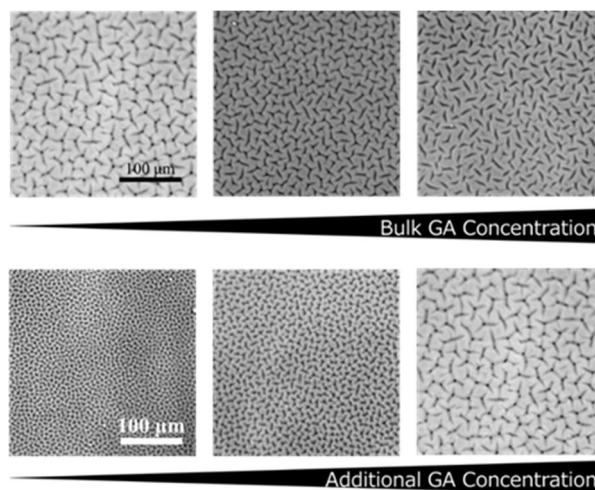


Figure 1 二段階架橋法で作製したゼラチンゲルのバルクGA濃度変化および追加架橋GA濃度変化によるリンクル構造の応答

そこで架橋条件が同じでスピコート速度の異なるゲルを用いて、微細凹凸構造指向性運動の有無をタイムラプス撮影で調べるとともに、微細凹凸構造によって誘起される指向性の遊走を観察した。結果を Figure 2 に示す。Figure 2 上段に示されているのはスピコート速度の異なるゲルに細胞を播種した表面位相差顕微鏡写真である。右にいくに連れてスピコート速度が遅くなっており、速度が遅くなるに連れて微細凹凸構造の大きさが大きくなっているのが分かる。そして同じく上段のデータから、いずれのゲル上においても細胞が良好に接着し、24 時間の培養が可能であることを確認した。Figure 2 の下段には 24 時間タイムラプス撮影(10 分間隔)から得られた細胞の遊走レーダーチャートを示した。各条件 5 つの細胞をピックアップして軌跡を得た。レーダーチャート内の色は細胞によって異なっている。このレーダーチャートより、中くらいのリンクル構造を有しているゲルにおいて細胞が最も活発に遊走することが明らかになった。一方リンクル構造が小さい場合は細胞遊走が見られたが、非常にラフな表面上では細胞がほとんど動かなかった。つまり、表面の微細凹凸構造が細胞よりも大きい場合は遊走が抑制され、特定の微細凹凸構造の場合で遊走が促進されることが確認された。

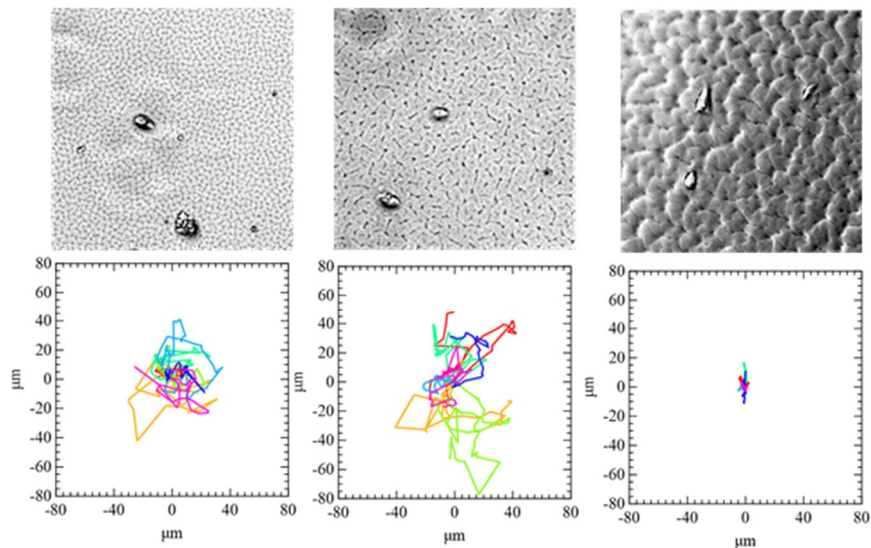


Figure 2 リンクルゲル上での間葉系幹細胞接着と24時間の遊走挙動

上述の結果より、得られたゲルは表面微細凹凸構造への細胞遊走挙動を観察するプラットフォームとして期待できる。また、細胞形状が微細凹凸構造に应答していることが示されており、細胞操作材料としての応用も期待される。新型コロナウイルスにより一時期実験を中止せざるを得なかった。したがって予定していた実験が行われなかったが、将来の細胞操作技術の発展に向けて有意義なプラットフォームの開発とデータの蓄積ができた。細胞の遊走について新たなメカニズムが提案されることは、細胞バイオメカニクス領域の発展に貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Saori Sasaki, Keita Eguchi, Ming Wei, Ryu Takahashi, Toshihiro Sera, Susumu Kudo
2. 発表標題 Development of gelatin gels for cell culture with controllable surface microwrinkles
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (MRM2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saori Sasaki, Keita Eguchi, Ming Wei, Ryu Takahashi, Toshihiro Sera, Susumu Kudo
2. 発表標題 Cell Migration on gelatin gels with controllable surface microwrinkle
3. 学会等名 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 沙織, 江口 慶太, 魏 銘, 高橋 龍, 世良 俊博, 工藤 奨
2. 発表標題 表面微細凹凸構造の制御可能な細胞培養ゼラチンゲルの開発
3. 学会等名 高分子学会 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木沙織、杜兆宜、江口慶太、孫琪、世良俊博、工藤奨
2. 発表標題 細胞培養基材ハイドロゲルの機械的特性が細胞遊走に及ぼす影響
3. 学会等名 日本バイオレオロジー学会 第44回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木沙織, 江口慶太, 高橋 龍, 世良俊博, 工藤 奨
2. 発表標題 細胞培養ゲル上への微細凹凸構造導入と遊走に及ぼす影響
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 2020年度九州ブロック学術講演会
4. 発表年 2021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

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