

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20545

研究課題名（和文）インテグリンシグナルの全原子解析に基づくナノ構造基板の細胞死誘導機構解明

研究課題名（英文）Understanding of apoptosis of cells on nanostructured substrates utilizing all-atomic analyses of integrin signal

研究代表者

馬 渕 守 (Mabuchi, Mamoru)

京都大学・エネルギー科学研究科・教授

研究者番号：00358061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、分子動力学（MD）計算と遺伝子解析を連携した新たな研究システムを構築し、金属基板表面のナノ構造がそこに接着する細胞の分化や増殖、アポトーシス（自発死）を制御する遺伝子に影響を及ぼすまでの、シグナル伝達経路の全貌を明らかにすることである。細胞接着におけるインテグリンの役割の多様性の一部が、実験（細胞培養・遺伝子解析）・計算（MD・モンテカルロシミュレーション）の組み合わせにより明らかにされた。さらに、得られた研究結果を活かした人工高細胞密度組織の創成なども行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：細胞の種々の挙動に及ぼす金属ナノ構造の影響を、工学的・生物学的実験手法と原子シミュレーションを融合して明らかにした。また、知見を活かして新しい人工高密度細胞組織の作製に取り組み、部分的に成功しつつある。

社会的意義：新しい材料であるナノ構造が「細胞」という生命活動の基本要素に及ぼす影響を明らかにしたことで、例えば環境分野や医療分野における応用、またそれらの分野におけるナノ材料の安全性等評価に活かせる成果である。応用のひとつとして、人工高密度細胞組織を創製できたことを挙げる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish a new research system linking molecular dynamics (MD) calculations and genetic analysis to reveal the full picture of the signaling pathways by which nanostructures on metal substrate surfaces influence the genes that control the differentiation, proliferation, and apoptosis (spontaneous death) of cells adhering to them. Part of the diversity of integrin roles in cell adhesion was revealed by a synergistic combination of experiments (cell culture and genetic analysis) and calculations (MD and Monte Carlo simulations). Furthermore, the research results were used to create artificial high cell density tissues.

研究分野：金属学

キーワード：ナノポーラス 培養基板 モンテカルロシミュレーション 分子動力学計算

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、過去にナノポーラス金（np 金）が細胞外基質（ECM、コラーゲン・フィブロネクチンなど）に及ぼす影響に着眼した研究を行っており、その中で実験／計算の連携研究も実践してきた。しかし、培養基板-ECM 間での知見を、遺伝子レベルで細胞の分化や増殖、アポトーシスへ結びつけるまでに至っていない。そこで、基板の情報が遺伝子に作用するまでの「シグナル伝達の全貌」を明らかにし、基板が細胞に及ぼす影響の系統的解明を試みる着想に至った。

また近年、細胞の基板接着に重要な役割を果たす膜タンパク質であるインテグリンのフルスケールモデルを計算機上で構築し、その複雑なダイナミクスを解明しようとする試みが積極的に行われている。しかし、扱える原子数の限界により、詳細な知見は得られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子動力学計算と遺伝子解析を連携した新たな研究システムを構築し、金属表面のナノ構造が細胞の分化や増殖、アポトーシス（自発死）を制御する遺伝子に影響を及ぼすまでの、シグナル伝達経路の全貌を明らかにすることである（図 1）。

基板が細胞に及ぼす影響を複雑にする最大の要因は、細胞内外を結びつける膜貫通タンパク質であるインテグリンが特殊かつ複雑なダイナミクスを有する点にある。従来の X 線や NMR による結晶構造解析では、インテグリンには open/closed と称される二つの構造が存在し、基板の情報(形状、ひずみ、弾性率等)を細胞内部に伝達する「スイッチ(on/off)」の役割をもつとされてきた。ところが、近年の研究で、iPS 細胞や幹細胞が基板の弾性率に応じて様々な細胞へと分化することが報告されており、このような分化の多様性は on/off という二値性では説明がつかない。また、申請者らのこれまでの研究においても np 金の影響を強く受ける細胞もいれば、そうでない細胞も存在することがわかっている。以上より、off から on に至る経路で生じる準安定構造の多様性が、細胞応答の多様性に帰結するという新しいアイデアを提示する。

具体的には、 $\alpha 2 \beta 1$ および $\alpha v \beta 3$ インテグリンのヘッドピースが ECM セグメントとどのように相互作用するかを調べるために、実験とシミュレーションを組み合わせた。

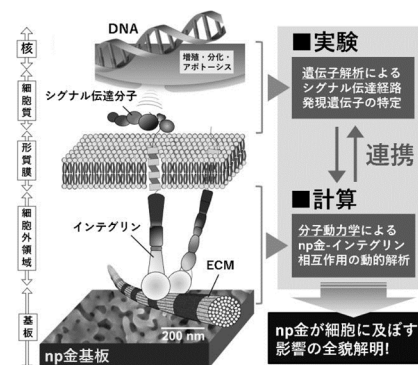


図 1 np 金から遺伝子に至るシグナル伝達

3. 研究の方法

np 金を積層構造中に含むアクチュエータを作製した。np 金アクチュエータの動作は 0.5% 程度の小さいひずみの周期引張刺激を 1 または 5 Hz の振動数で与えることができるものであった（図 2）。このアクチュエータを動作させつつ細胞培養基板として使い、ヒト胚由来線維芽細胞を Dulbecco 修正イーグル培地中で培養した。培養後の細胞増殖率を評価するとともに、方向性評価や円形度評価を免疫蛍光染色により行った。

インテグリンの構造変化が細胞内に及ぼす影響に関して、実験的には、タンパク質・遺伝子解析実験（ウェスタンブロッティング (WB)、リアルタイム PCR (RT-PCR) 等）を実施し、シグナル伝達経路や発現遺伝子の特定を試みた。

別途、分子動力学 (MD) 計算を実施することで、インテグリンの動的挙動を明らかにした。最終的に、基板-インテグリン間を対象とした MD 計算の解析結果と、インテグリンから遺伝子に至るシグナル伝達を対象とした実験結果を統合し、基板の細胞に及ぼす影響の解明を試みた。

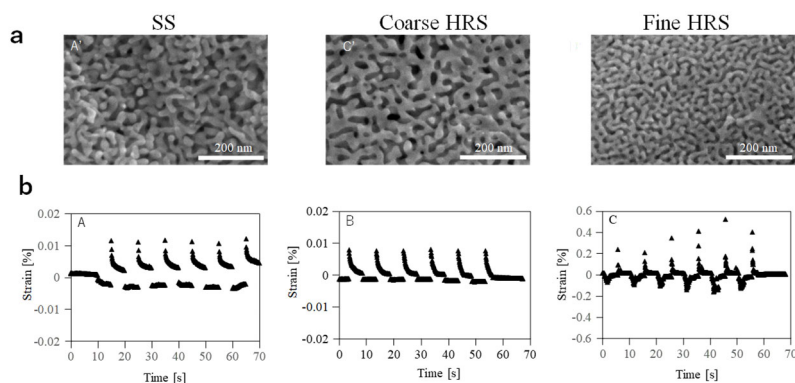


図 2 np 金の走査電子顕微鏡像 (a) およびアクチュエータ性能 (b)

4. 研究成果

図3 (a) に示すとおり、np 金アクチュエータ培養基板から 1 Hz の周期的引張刺激を与えることにより細胞増殖が促進された。引張刺激を与えない場合 14%であった増殖率は、24 時間の周期的引張刺激により 38%まで増加した。また、周期的引張刺激は細胞円形度も大きくした (図3 (b))。細胞は分化中に円形度を高めることが知られており、周期的引張刺激が分化に影響したことが示唆される。一方で、周期的引張刺激の周波数を 5 Hz にした場合には、細胞数には影響を及ぼさなかった (図3 (c))。細胞の増殖・分化挙動が周期的引張刺激の周波数に敏感であり、1 Hz といった脈拍の周波数程度の際に影響が大きく表れた。また、比較的厚いコラーゲンでアクチュエータをコーティングした場合は周期的引張刺激の影響が表れなかった (図3 (d)) ことから、直接的な周期的引張刺激の伝達が重要であることが予想される。

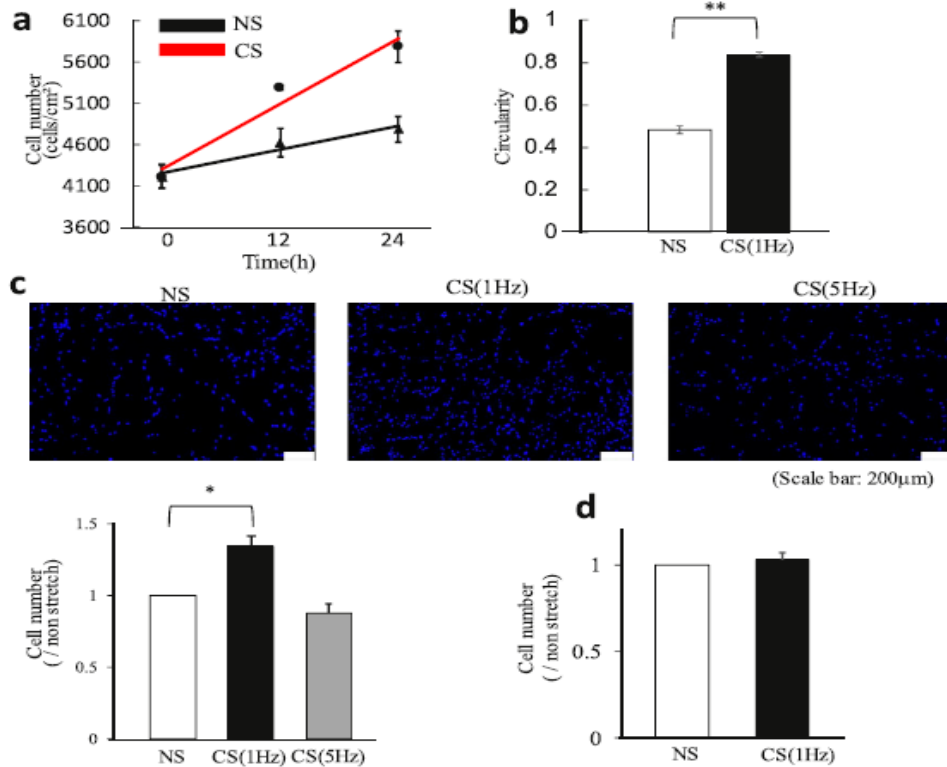


図3 周期引張刺激 (CS) による細胞増殖の促進。(a) 引張刺激なし (NS) と CS を 1 Hz で適用した場合の 24 時間の細胞数の変化。0-24h の間の増殖率は、それぞれ NS で 14%、CS で 38%であった。(b) NS と CS (周波数 1 Hz) での細胞円形度 (24 時間培養後)。N = 50. 結果は平均値±標準誤差で示し、** $p < 0.01$ 。(c) NS と CS (周波数 1 Hz および 5 Hz) 細胞核の DAPI 観察結果と細胞数。N = 3。結果は平均値±標準誤差で示し、* $p < 0.05$ 。(d) 厚いコラーゲンでコーティングされた基板に対して、NS と CS (周波数 1 Hz) を行った場合の細胞数。N = 3。

膜タンパク質のインテグリンは双方向性を持ち、細胞外の機械的刺激から細胞内シグナルへのメカノトランスダクションを媒介する。MAPK 経路は、インテグリンが介在する細胞内シグナル伝達において中心的な役割を果たす。そこで、引張刺激のない場合および周期的引張刺激 (周波数 1 Hz) を印加した場合の細胞質および核における ERK1/2 および p-ERK1/2 の分布を免疫蛍光染色により調べた (図4)。

引張刺激のない場合、ERK および p-ERK の分布に目立った違いはなかったが、周期的引張刺激を与えた場合、p-ERK1/2 が核に比較的集中することがわかった。核内の p-ERK1/2 は転写因子をリン酸化し、成長促進遺伝子の発現を促

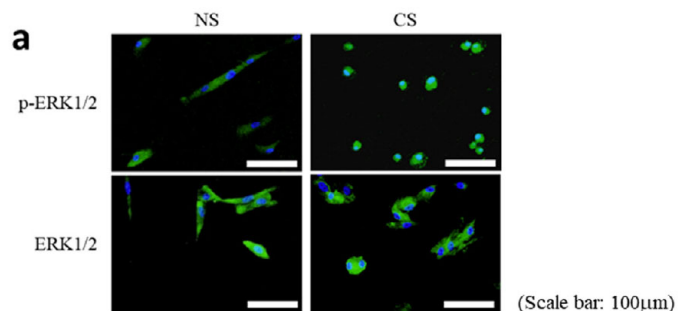


図4 ERK1/2 および p-ERK1/2 を染色した細胞の免疫蛍光画像

進する。周期的引張刺激により p-ERK1/2 が核に集中したことは、ERK-MAPK シグナル伝達経路が細胞増殖の促進に重要な役割を果たしたことを示唆している。また、WB によれば、p-JNK の p46 および p54 の発現レベルが、周期的引張刺激の適用で増加した。また、周期的引張刺激により、p-p38 の発現量も増加していることがわかった。

これらのデータを総合すると、MAPK 経路が周期的引張刺激による細胞増殖の促進に関与していることが示された。

異なるインヒビタを用いて同様の培養実験を行った結果、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと $\alpha v \beta 3$ インテグリンは機械刺激に対して高い感度を示したが、 $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンと $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンは低い機械感度を示した。MD シミュレーションの結果、ECM との結合によって引き起こされるインテグリンヘッドピースの異なるコンフォメーション変化が、 αI 型と αI -less 型インテグリン間の機械的刺激感受性の違いにつながっていることが示された。

そのほか、本結果を応用した細胞シート（細胞の 2 次元高密度集合組織）への周期的引張刺激の影響を調べ、単純な細胞培養に比べ細胞配向が促進されることを明らかにし（図 5）、さらに、応用のひとつとして、人工高密度細胞組織を創製できた。

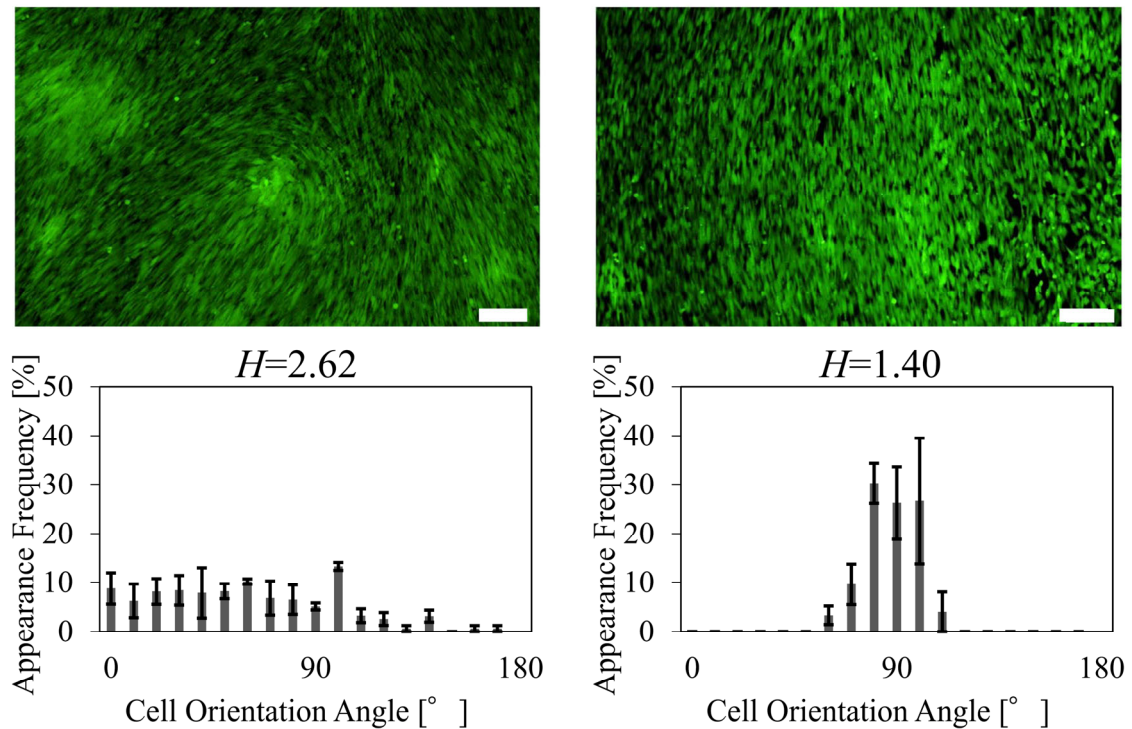


図 5 引張刺激なし（左）および周期的引張刺激あり（右）で培養した細胞シートの写真（上）および配向分布（下）。スケールバーは 200 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wu Peizheng, Asada Hiroki, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 35
2. 論文標題 Bioengineering of High Cell Density Tissues with Hierarchical Vascular Networks for Ex Vivo Whole Organs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 2209149～2209149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adma.202209149	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 —

1. 著者名 Deguchi Soichiro, Kato Atsushi, Wu Peizheng, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 121
2. 論文標題 Heterogeneous role of integrins in fibroblast response to small cyclic mechanical stimulus generated by a nanoporous gold actuator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 418～430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2020.12.014	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 —

1. 著者名 Wu Peizheng, Sawaki Shogo, Hakamada Masataka, Mabuchi Mamoru	4. 巻 32
2. 論文標題 Effects of actuation of nanoporous gold on cell orientation in a fibroblast sheet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Materials Science: Materials in Medicine	6. 最初と最後の頁 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10856-021-06584-w	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 —

〔学会発表〕 計0件

〔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	袴田 昌高 (Hakamada Masataka) (30462849)	京都大学・エネルギー科学研究科・准教授 (14301)	

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