

令和 元年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0184

研究課題名（和文）細胞・材料界面と細胞膜表面の分子プロセス解析に基づく新しいバイオマテリアルの創成（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Design of biomaterials based on analysis of molecular processes at biointerfaces (Fostering Joint International Research)

研究代表者

林 智広 (Hayashi, Tomohiro)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：30401574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,300,000円

渡航期間： 3ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では材料-細胞界面における分子プロセスを解析し、それに基づく新しいバイオマテリアルの設計を目指した。ここでは、表面間力測定による界面分子、イオンの振る舞いの解析、体液に接した材料表面上に堆積したタンパク質の同定、吸着タンパク質の構造変化の解析、細胞接着挙動の解析を行った。また、本成果は現在の脂質2重膜を用いたバイオセンサーの共同開発にも繋がっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は東京工業大学とシンガポール・ナンヤン工科大学の国際共同研究であり、研究代表者(表面科学)、Prof. Namjoon Cho(バイオマテリアル、バイオセンサー)Prof. Lay Poh Tan(再生医療)を中心メンバーとする異分野融合共同研究である。本研究の学術的意義は、バイオマテリアルあるいはバイオセンサーの表面における分子の振る舞いを明らかにした点であり、材料・センサーの性能との関連についても議論出来た点である。社会的意義としては日本・シンガポールの研究メンバーを増やし、今後の更なる共同研究に繋げることが出来た点にある。

研究成果の概要（英文）：In this work, we investigated molecular processes at interfaces of biomaterials with proteins and cells. In particular, we conducted the following things. 1. we performed surface force measurements to investigate the interfacial behavior of water molecules and ions. 2. we analyzed the proteins accumulated from serum to biomaterials using MALDI ToF Mass spectroscopy. 3. we investigated correlation between chemical structure of biomaterials and protein- and cell-resistance. These findings obtained here is now applied to develop biosensors using lipid bilayers.

研究分野：表面・界面科学、バイオ界面

キーワード：バイオマテリアル バイオ界面

## 様式 F-19-2

### 1. 研究開始当初の背景

人工臓器、再生医療が今後の医療において重要な位置を占めることは確実である。血中細胞の変性・活性化を抑える、幹細胞のがん化を抑えつつ増殖を促進するなど、細胞と適切な相互作用し、細胞の挙動を精密に制御する機能が足場材料に求められている。細胞が材料に接触すると、細胞膜内の受容体タンパク質は足場材料(足場となるタンパク質も含む)、培養液中のイオン、タンパク質(サイトカイン、成長因子)等と相互作用し、細胞の挙動を決定するシグナル伝達が行われる。それ故、細胞と材料の相互作用・細胞の挙動の精密制御のために、細胞膜における分子プロセスの理解の深化が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究では材料-細胞(接着斑)と細胞-培養液の界面(細胞膜表面)の2つの界面における分子プロセスの同時解析を目指す。そのために分子の組成、タンパク質の量・2次構造の解析に有効なラマン散乱分光法を応用し、以下を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

1. 材料-細胞及び細胞膜-培養液界面という2つの界面における分子プロセス、ナノスケールの分解能での細胞膜上の膜タンパク質の分布、局所的力学特性、水和構造を同時に解析する手法を開発した。
2. モデル有機物表面と接着性細胞(血管内皮細胞、繊維芽細胞)を用いた材料-細胞及び細胞膜-培養液界面の分子プロセスの解析を行った。
3. 界面の分子プロセス、細胞膜の局所的力学特性・水和構造という視点から、通常細胞とがん細胞の相違点について検討し、再生医療における、がん化した細胞の識別・選別可能な足場材料の設計指針について提案した。

### 4. 研究成果

1. 細胞接着斑における足場タンパク質の量・構造変化の時間発展と細胞接着後の細胞の挙動との相関の解析

接着性細胞(血管内皮細胞、繊維芽細胞など)が材料表面に吸着した際に、プリコンディショニングによる材料表面への血清タンパク質吸着から細胞接着後の細胞自身による足場タンパク質の生成の一連のプロセスにおいて、これらの細胞-材料界面のタンパク質の量・2次構造の変化を追跡し、細胞の接着密度・接着後の挙動との相関を明確にした。

2. 細胞接着後の細胞膜上(培養液との界面)における膜タンパク質の分布の解析と局所的力学特性の解析

細胞膜中での脂質分子、膜タンパク質(イオンチャンネル、接着タンパク質)の分布、膜の力学特性(硬さ、柔軟性)を20 nm以下の空間分解能で分析した。これらの局所物性・分布と細胞の接着形態との相関、さらに培養液中のサイトカイン(成長因子、分化誘導剤など)などに対する感受性との相関について調べた。ここでは1で得られる知見と組み合わせ、足場材料、培養液という2つの環境因子により、細胞の挙動がどの様に決定されるかを精密に議論するための知見を得た。

3. がん細胞と通常細胞の違いについて2,3で得られる知見から議論し、がん細胞を識別・選別するための足場材料の設計指針を提示

1及び2の解析をがん細胞に対して行い、従来に無いナノスケールの多次元パラメータから、通常細胞とがん細胞の相違点について明らかにした。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計23件)

(研究代表者は下線)

1. Tahara, H.; Nyu, T.; Mondarte, E. A. Q.; Maekawa, T.; Hayashi, T., Application of Fuzzy Logic Algorithm to Single-Molecule Force Spectroscopy of the Streptavidin-Biotin System. *Advances in Materials Physics and Chemistry* **2018**, *08* (05), 217-226. [査読有り]
2. Sung, T.; Seong, S.; Han, S.; Son, Y. J.; Ishida, T.; Hayashi, T.; Hara, M.; Noh, J., Well-Ordered Domains of 4-Fluorobenzenethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) Guided by a Displacement Reaction. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2018**, *18* (10), 7053-7057. [査読有り]
3. Sekine, T.; Kanayama, N.; Ozasa, K.; Nyu, T.; Hayashi, T.; Maeda, M., Stochastic Binding Process of Blunt-End Stacking of DNA Molecules Observed by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2018**, *34* (49), 15078-15083. [査読有り]
4. Hamamoto, R.; Ito, H.; Hirohara, M.; Chang, R.; Hongo-Hirasaki, T.; Hayashi, T., Interactions between protein molecules and the virus removal membrane surface:

- Effects of immunoglobulin G adsorption and conformational changes on filter performance. *Biotechnol. Prog.* **2018**, *34*(2), 379-386. [査読有り]
5. Chang, R.; Asatyas, S.; Lkhamsuren, G.; Hirohara, M.; Mondarte, E. A. Q.; Suthiwanich, K.; Sekine, T.; Hayashi, T., Water near bioinert self-assembled monolayers. *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* **2018**, *50*(8), 563-571. [査読有り]
  6. Araki, Y.; Sekine, T.; Chang, R.; Hayashi, T.; Onishi, H., Molecular-scale structures of the surface and hydration shell of bioinert mixed-charged self-assembled monolayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy. *Rsc Advances* **2018**, *8*(43), 24660-24664. [査読有り]
  7. 張嶺碩; 関根泰斗; Asatyas, S.; Lkhamsuren, G.; 大橋智幸; 林智広, 生体適合性をもつ単分子膜~表面・界面科学の手法を利用したメカニズムの解明~. *化学工業* **2017**, *68*(12), 886-890. [査読有り]
  8. Seong, S.; Kang, H.; Han, S.; Sung, T.; Park, J. B.; Hayashi, T.; Hara, M.; Noh, J., Formation and Structural Changes of 4-Fluorobenzenethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111). *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2017**, *17*(8), 5597-5600. [査読有り]
  9. Sekine, T.; Asatyas, S.; Sato, C.; Morita, S.; Tanaka, M.; Hayashi, T., Surface force and vibrational spectroscopic analyses of interfacial water molecules in the vicinity of methoxy-tri(ethylene glycol)-terminated monolayers: mechanisms underlying the effect of lateral packing density on bioinertness. *J Biomater Sci Polym Ed* **2017**, *28*(10-12), 1231-1243. [査読有り]
  10. Mochizuki, M.; Lkhamsuren, G.; Suthiwanich, K.; Mondarte, E. A.; Yano, T. A.; Hara, M.; Hayashi, T., Damage-free tip-enhanced Raman spectroscopy for heat-sensitive materials. *Nanoscale* **2017**, *9*(30), 10715-10720. [査読有り]
  11. Lkhamsuren, G.; Mochizuki, M.; Suthiwanich, K.; Hayashi, T., Fabrication of mechanically stable Au-coatings on probes of atomic force microscopes for nano-mechanical and -optical measurements. *Thin Solid Films* **2017**, *636*, 478-484. [査読有り]
  12. Hara, K.; Yano, T. A.; Suzuki, K.; Hirayama, M.; Hayashi, T.; Kanno, R.; Hara, M., Raman Imaging Analysis of Local Crystal Structures in LiCoO<sub>2</sub> Thin Films Calcined at Different Temperatures. *Anal. Sci.* **2017**, *33*(7), 853-858. [査読有り]
  13. Han, M. S.; Ku, K.; Kang, H.; Ohashi, R.; Hayashi, T.; Hara, M.; Noh, J., Standing-Up Phase of Hexanedithiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) Induced by Displacement Reaction. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2017**, *17*(8), 5780-5783. [査読有り]
  14. Yano, T.-a.; Tsuchimoto, Y.; Mochizuki, M.; Hayashi, T.; Hara, M., Laser-scanning-assisted tip-enhanced optical microscopy for robust optical nano-spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2016**, *70*(7), 1239-1243. [査読有り]
  15. Tsuchimoto, Y.; Yano, T. A.; Hayashi, T.; Hara, M., Fano resonant all-dielectric core/shell nanoparticles with ultrahigh scattering directionality in the visible region. *Opt Express* **2016**, *24*(13), 14451-62. [査読有り]
  16. Mochizuki, M.; Asatyas, S.; Suthiwanich, K.; Hayashi, T., Thiol Molecules as Temperature Sensors for Surface-enhanced Raman Scattering Measurements of Heat-sensitive Materials. *Chem. Lett.* **2016**, *45*(10), 1207-1209. [査読有り]
  17. Kim, Y.; Kang, H.; Tsunoi, A.; Hayashi, T.; Hara, M.; Noh, J., Striped Phase of 3-Hexylthiophene Self-Assembled Monolayers on Au(111) from Vapor Phase Deposition. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*(3), 2792-2795. [査読有り]
  18. Kim, S. O.; Jackman, J. A.; Mochizuki, M.; Yoon, B. K.; Hayashi, T.; Cho, N. J., Correlating single-molecule and ensemble-average measurements of peptide adsorption onto different inorganic materials. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*(21), 14454-9. [査読有り]
  19. Kang, H.; Ito, E.; Hayashi, T.; Hara, M.; Noh, J., Effect of Solution Concentration on the Formation of Ordered Domains in Pentachlorobenzenethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111). *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*(6), 6360-3. [査読有り]
  20. Kanayama, N.; Sekine, T.; Ozasa, K.; Kishi, S.; Nyu, T.; Hayashi, T.; Maeda, M., Terminal-Specific Interaction between Double-Stranded DNA Layers: Colloidal Dispersion Behavior and Surface Force. *Langmuir* **2016**, *32*(49), 13296-13304. [査読有り]
  21. Jeong, H.; Kang, H.; Han, S.; Park, H.; Han, J.; Hayashi, T.; Hara, M.; Noh, J., Comparative Study for Displacement of Cyclohexanethiolate and Cyclohexaneselenolate Self-Assembled Monolayers on Au(111) by Octanethiols. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*(8), 8508-8512. [査読有り]
  22. Han, S.; Kang, H.; Park, J. B.; Hayashi, T.; Hara, M.; Noh, J., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers by Adsorption of Octaneselenocyanate on

Au(111). *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*(8), 8610-8613. [査読有り]

23. Ganbaatar, N.; Matsuzaki, N.; Nakazawa, Y.; Afrin, R.; Aono, M.; Yano, T.-a.; Hayashi, T.; Hara, M., Surface Force Analysis of Pyrite (FeS<sub>2</sub>): Its Reactivity to Amino Acid Adsorption. *Advances in Materials Physics and Chemistry* **2016**, *06*(07), 167-176. [査読有り]

[学会発表] (計 71 件)

1. "実験とデータ科学の融合によるバイオ界面プロセスの解析と材料設計" 林智広, ニューセラミックス懇話会 バイオ関連セラミックス分科会第 60 回研究会, 2019 年 5 月 10 日, 大阪 中央公会堂.
2. "Understanding of the origin of bioinertness and design of antifouling surfaces" T. Hayashi, Kyoto Winter School 2019, 2019 年 3 月 15 日, 京都大学

[図書] (計 2 件)

1. 田原寛之; Kwaria, R. J.; 林智広, マテリアルズ・インフォマティクス～データ科学と計算・実験の融合による材料開発～ 第 8 節 「マテリアルズ・インフォマティクスを用いたバイオマテリアルの設計の現状と今後の展開. 情報機構: 2018. 10 ページ
2. 田原寛之; Kwaria, R. J.; 林智広, 「マテリアルズ・インフォマティクス」の 1 節 「マテリアルズインフォマティクスによる生体材料表面設計」. 技術情報協会: 2018. 8 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究成果をまとめた WEB サイト: <http://lab.spm.jp/>

## 6. 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名: チョー ナムジュン

ローマ字氏名: Cho Namjoon

所属研究機関名: Nanyang Technological University

部局名: Department of Material Science and Engineering

職名: Nanyang Associate Professor

[その他の研究協力者]

研究協力者氏名: タン レイポー

ローマ字氏名: Lay Poh Tan

所属研究機関名: Nanyang Technological University

部局名: Department of Material Science and Engineering

職名: Associate Professor

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。