

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K05515

研究課題名(和文)細胞接着の物理の解明に向けた糖脂質膜と幹細胞の力学的相互作用の精密測定

研究課題名(英文)Quantification of mechanical interactions between glycolipid membrane and stem cells towards physical understanding of cell adhesion

研究代表者

山本 暁久(Yamamoto, Akihisa)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：90706805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト幹細胞膜の相互作用における糖鎖の役割を解明するため、糖脂質膜の力学的特性の定量と、ヒトiPS細胞の接着表面の揺らぎ評価を行った。浸透圧やカルシウムイオン濃度による膜間距離の変化に加え、糖鎖分子の種類・比率による脂質膜の曲げ剛性率と圧縮剛性率の変調を明らかにした。また、糖脂質膜の種類による細胞接着面積の違いを測定した。この手法を異なる実験系にも応用展開し、フッ化炭素鎖ナノドメイン構造の長距離相関、双対イオン性ポリマーブラシと赤血球の界面相互作用ポテンシャルの測定、さらにヒト角膜内皮細胞の品質管理や再生角膜の予後予測のためのバイオマーカーの開発など幅広い成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってこれまで評価が困難であった糖鎖分子同士の弱い相互作用を、分子間相互作用そのものでなく膜の構造揺らぎという物性を通して非侵襲的な手法で評価する方法論と解析法を確立した。特に幹細胞に特異的なSSEA分子によって膜間相互作用がどのように制御されるかを定量的に明らかにした。実際に生細胞を用いた実験系まで発展させることで、物理的な理解にとどまらず生物学的にも意義深い成果を得た。

研究成果の概要(英文)：This research focused on the role of saccharide chains expressed on human embryonic stem cells on their interactions. Dependence of equilibrium inter-membrane distance on the osmotic pressure and calcium ion concentration, and mechanical property of lipid membrane on the molecular structure of saccharide chains and molar ratio were systematically revealed. Adhesion area of human iPS cells on supported lipid membranes functionalized with various kinds of saccharide chains were also measured. The methodology developed in this research was also applied to other systems, resulted in such as revealing long-range lateral correlation of self-assembled domains of fluorocarbon-hydrocarbon molecules, quantification of the interfacial interaction potential between zwitterionic polymer brush and model cells, and the development of bio-marker for quality control and prognosis of human corneal endothelial cells/tissues.

研究分野：ソフトマター物理、モデル細胞膜、医学物理

キーワード：ソフトマター物理 糖鎖 脂質膜 力学特性 細胞接着

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜はやわらかな脂質二分子膜を基本構造に持ち、膜内部と表面には多種の糖鎖やタンパク質などの生体高分子が存在する。これらの分子は細胞内・界面での生化学反応をになうだけでなく、細胞接着においても必要不可欠な要素である。細胞接着は、特異的相互作用(接着タンパクと選択的に相互作用する受容体による引力、高分子や糖鎖同士の相互作用による力)と非特異的相互作用(表面電荷によるクーロン力、膜揺らぎのエントロピー斥力、ファンデルワールス力など)のバランスによって制御されている。人工膜モデル系や再構成タンパクを用いた各相互作用の強さの測定とその理論的記述をもとに、細胞接着を界面の濡れ現象として物理的に記述する試みが行われてきた[総説: Sackmann and Bruinsma, *Chemphyschem* (2002)など]。

このなかで、膜表面上の糖鎖と糖衣(糖鎖が構成する層構造)は長い間、膜間斥力を提供すると考えられてきた。しかし近年、同種糖分子同士では選択的な引力相互作用が働くことが、2次元 NMR を用いた実験などで明らかになってきた[Geyer et al, *Angew. Chem.* (2000)]。しかし、糖鎖の分子間引力は熱揺らぎオーダーの「弱い」エネルギーであり測定が非常に困難であるため、糖鎖の結合の強さには不明な点が多かった。一方、糖鎖を発現した細胞同士の接着に関する生物学的な研究もおこなわれてきたが、これらは分子マーカーの結合量や細胞の健康度を指標にした定性的なものであった。表面糖鎖が細胞接着に重要であることは認識されながらも、定量的な理解はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、膜の構造揺らぎ測定を通じて糖脂質膜の力学的相互作用を定量し、細胞接着における糖鎖の役割を解明する方法論と解析法の確立を目指した。

実験系として、胚発生に伴って膜に過渡的に発現する糖鎖に着目した。胚発生の過程では受精卵から細胞分裂が始まり、将来どの器官の細胞にもなることができる性質(多分化能)を持つ幹細胞が増殖する。幹細胞の表面では数種の糖鎖 SSEA (Stage-specific embryonic antigen) 分子(図 1)が過渡的に発現しており、互いに向かい合う細胞膜において SSEA 糖鎖分子の相互作用が生じる。本研究では、次の 2 つの相補的な実験手法を駆使し細胞接着における糖鎖の役割を明らかにすることを目的に、幹細胞に特異的な SSEA 分子によって制御される膜間相互作用を定量的に記述するための物理学的な実験と解析を行った。

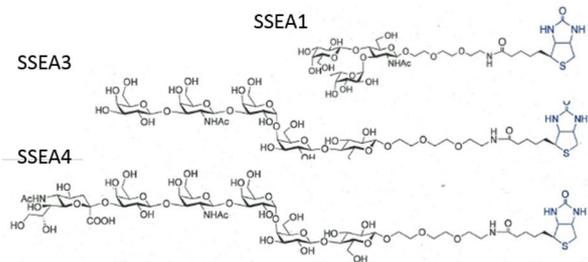


図 1: 本研究で扱った SSEA 糖鎖の化学構造。連携研究者・安藤氏(岐阜大)により合成。

(1) 逆空間的手法: 中性子非鏡面散乱法を用いた、糖脂質膜の力学特性の精密定量

本手法では糖脂質多層膜を作成し、膜に対する散乱プロファイルを測定し、膜同士の垂直な相互作用の強さを表す圧縮弾性率と膜の水平方向の揺らぎの大きさを表す曲げ剛性率を完全定量することができる。糖が膜同士の相互作用に及ぼす影響を圧縮弾性率の変化から評価する。

(2) 実空間的手法: RICM を用いた、細胞膜間の相互作用ポテンシャルの測定

本手法では基板と接着した細胞膜の界面間距離 h を、界面での反射光の干渉パターンから 10nm と 10ms のオーダーの時空間分解能で精密測定することができる。糖脂質膜同士、あるいは糖脂質膜と細胞膜の膜間距離揺らぎから、界面相互作用を定量する。

3. 研究の方法

(1) 中性子非鏡面散乱法: 力学パラメーターの解明

シリコン基板上に脂質膜の積層構造を形成し単色の中性子線を入射すると、ハミルトニアンから決定される膜構造に応じた散乱パターンを得る。多層膜を用いることで、散乱ベクトルを膜垂直方向と水平方向に分解し、膜に垂直方向の構造(膜厚・膜間距離)と水平方向の構造(揺らぎの空間波数)を分離して取得することが可能になる。膜間距離と膜の空間揺らぎの大きさを独立に得られるため、膜の曲げ剛性率と圧縮弾性率を一意に精度よく決定することができる。合成糖脂質を用いた脂質二分子膜のモデル系を用い、糖鎖の化学構造の違いや糖鎖を持たない脂質との混合比を変化させ、系統的に膜間の相互作用(膜間距離や圧縮弾性率)を定量する。SSEA1 については報告があるため[Schneck et al., *Biophys. J.* (2011)]、本研究では SSEA3・4 に焦点を当てた。

(2) RICM: 接着の時空間パターンの定量

この手法では単色直線偏光を入射し、基板近くにおける各界面での反射光の干渉に伴う光強度から、界面の高さプロファイルをラベルフリーで非侵襲的に検出することができる。界面の高さを 10nm 程度の分解能で取得することができるだけでなく、その時間変化も通常の顕鏡法同様にビデオレートで記録することができる。さらに本研究では、Supported membrane とよばれるカバーガラス上に展開した脂質二分子膜を基板として用いる[Tanaka and Sackmann, *Nature* (2005)]。膜表面を糖鎖で修飾することにより多分化能細胞のモデル膜表面を作成する。この基板上に細胞を播種し、糖鎖に修飾された Supported membrane との相互作用を細胞間接着のモデルとし、糖

鎖の種類および平面密度が細胞の接着に及ぼす影響に着目した。

4. 研究成果

(1) 中性子非鏡面散乱法：力学パラメーターの解明

本実験はラウエ・ランジェバン研究所 (ILL：フランス・グルノーブル) のビームライン D16 で行った。糖脂質 SSEA3 および SSEA4 を DPPC に対して 2, 10, 25 mol% の割合で混入し、シリコン基板上に多層膜を作成した。脂質膜を L_α 相に保つため、サンプルは温湿度制御チャンパーの中で 60°C に保たれた状態で実験を行った。また、サンプルは 50%、95% の相対湿度または水相中で浸透圧を制御された中で少なくとも 2 時間静置し、その構造が平衡状態に達したことを確認してから測定を行った。

50%、95% の相対湿度条件ではいずれも強力な非鏡面散乱成分が得られた一方、水相中の多層膜からは脂質混合比によっては十分な散乱プロファイルが得られなかった。これは脂質の混合比によっては膜間相互作用が弱くなり多層膜構造が安定に保持されなかったことを示唆する。しかし、このような場合も含め全条件でブラッグピークの位置は明確に表れ、これにより膜間距離を決定することができた。これにより、浸透圧が小さくなるほど膜間距離が大きくなる一方、2mM Ca^{2+} イオンの存在下では小さくなることが明らかになった (図 2)。これらの結果はいずれも膜の垂直方向の相互作用である圧縮剛性率 B の変調を示唆している。散乱プロファイル $S(q_z, q_{||})$ は膜間相関関数 $g_k(r)$ を用いて

$$S(q_z, q_{||}) \propto \frac{1}{q_z^2} \left[N \int \exp\left(\frac{-q_z^2 g_0(r)}{2}\right) \exp(-iq_{||}r) dr \right. \\ \left. + 2 \sum_{k=1}^N (N-k) \cos(kq_z d) \int \exp\left(\frac{-q_z^2 g_k(r)}{2}\right) \exp(-iq_{||}r) dr \right]$$

と表される。膜の曲げ剛性率 κ および圧縮剛性率 B という 2 つの力学的パラメーターにより $S(q_z, q_{||})$ を計算し、実験データとの比較から糖脂質膜の力学的特性を決定するための解析を進めている。これにより、SSEA 糖脂質の糖鎖の膜間および膜内での相互作用の強さとカルシウムイオンの効果をさらに解明する。

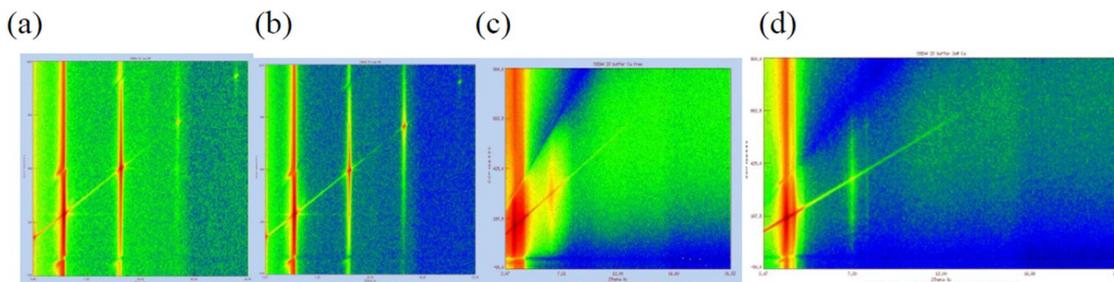


図 2：SSEA4/DPPC = 10:90 mol% 多層膜から得られた非鏡面散乱プロファイル。(a) 相対湿度 50%、(b) 相対湿度 95%、(c) $[Ca^{2+}] = 0$ mM パルク水相、(d) $[Ca^{2+}] = 2$ mM パルク水相。ブラッグピーク位置から膜間距離 d を求め、浸透圧により (a) 51.1 Å, (b) 65.1 Å, (c) 81.5 Å, (d) 72.4 Å と変化することが分かった。

(2) RICM：接着の時空間パターンの定量

DOPC 分子中に 2 mol% の biotin-DOPE を混合し、ガラス基板の上に支持された脂質二分子膜を作成し、neutravidin を介して SSEA 分子を修飾することで、糖脂質の分子間距離を $\langle d \rangle = 6$ nm に精密制御した基板を開発した。連携研究者・長谷川氏 (京都大) により品質管理・継代培養されたヒト iPS 細胞をこの基板の上に播種し、その接着の時間発展を RICM で観察した。その結果、SSEA3 および SSEA4 で修飾された基板の上では、その他の糖鎖で修飾された基板の上と比べ、細胞接着面積が大きくなり、より強固な接着を生じることが分かった。一方で、糖鎖だけでは細胞接着を長時間安定に保つことができず、細胞内のリン酸化酵素の 1 つである ROCK に対する阻害剤を添加することで細胞接着面積を増大し、安定化することも明らかにした (図 3)。この結果は、糖鎖分子は細胞同士を接着する引力を生み出すものの、細胞を安定に生存させるには糖鎖分子を介した引力相互作用のみでは不十分であることを示唆する。実際に担持脂質膜を SSEA3 に加え、別の細胞接着分子であり同種分子同士で結合し細胞接着を担う分子である E-

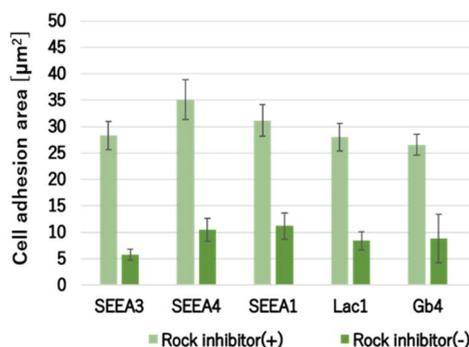


図 3：糖鎖で修飾された脂質膜表面におけるヒト iPS 細胞の播種後 12 時間後の接着面積。ROCK 阻害剤存在下で細胞接着面積が非存在時に比べ 4~5 倍に増大した。

cadherin を用いて修飾した表面に同じヒト iPS 細胞を播種すると、細胞接着面積がさらに数倍増大した(図4)。ここで得られた RICM 画像においてコントラストの揺らぎから、細胞膜と脂質膜の間のポテンシャルを計算し、平均距離及びその揺らぎを解析するための解析を進めている。これにより、SSEA 糖脂質の糖鎖がヒト iPS 細胞膜上でつくる弱い相互作用を定量的に解明する。

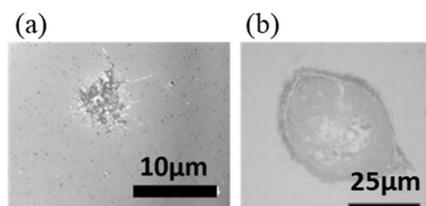


図4：担持脂質膜に接着するヒト iPS 細胞の RICM 画像。(a) SSEA3 のみ 2 mol%、(b) SSEA3 と E-cadherin とともに 1 mol%ずつで修飾された脂質膜上では、E-cadherin 存在時に細胞接着が安定化する。

(3) その他の成果

本研究では、その手法の一般性から糖脂質のみならず様々な自己組織化構造について、その構造を定量することに成功した(3-1~3-3)。また RICM を用いて、防汚性の高いポリマーブラシ表面とヒト赤血球の相互作用ポテンシャルを評価することに成功した(3-4)。さらに、上皮細胞の2次元配列秩序から細胞品質評価および再生組織予後予測を評価するバイオマーカーの開発(3-5)、筋芽細胞の接着する基板の硬さを動的に制御した時の細胞応答の解明(3-6)など、研究内容をダイナミックに発展させて幅広い成果を得ることができた。

[3-1] 微小角 X 線散乱法を用いた、フッ化炭素鎖ディブロックが気液界面において自発形成する半球状ドメイン構造のサイズと形状およびその長距離相関構造の評価

Mariam Veschgini, Wasim Abuillan, Shigeto Inoue, [Akihisa Yamamoto](#), Salomé Mielke, Xianhe Liu, Oleg Kononov, Marie Pierre Krafft, and Motomu Tanaka, "Size, Shape, and Lateral Correlation of Highly Uniform, Mesoscopic, Self-Assembled Domains of Fluorocarbon-Hydrocarbon Diblocks at the Air/Water Interface: A GISAXS Study", *ChemPhysChem*, 18, 1-9 (2017)

[3-2] 微小角 X 線散乱法を用いた、フッ化炭素鎖テトラブロックが気液界面において自発形成する数十ナノメートルスケールの半球状ドメイン構造の長距離相関構造の解明

Wasim Abuillan, Mariam Veschgini, Salome Mielke, [Akihisa Yamamoto](#), Xianhe Liu, Oleg Kononov, Marie Pierre Krafft, and Motomu Tanaka, "Long-Range Lateral Correlation between Self-Assembled Domains of Fluorocarbon-Hydrocarbon Tetrablocks by Quantitative GISAXS" *ChemPhysChem*, 20, 898-904 (2019).

[3-3] コヒーレント X 線回折法を用いたマラリア感染赤血球の表面直下構造のトモグラフィイメージング

Viktoria Frank, Yuriy Chushkin, Benjamin Fröhlich, Wasim Abuillan, Harden Rieger, Alexandra S. Becker, [Akihisa Yamamoto](#), Fernanda Rossetti, Stefan Kaufmann, Michael Lanzer, Federico Zontone, and Motomu Tanaka, "Lensless Tomographic Imaging of Near Surface Structures of Frozen Hydrated Malaria-Infected Human Erythrocytes by Coherent X-Ray Diffraction Microscopy", *Scientific Report*, 7, 14081/1-9 (2017).

[3-4] 超親水的双性イオン性ポリマーブラシとモデル細胞膜間の相互作用ポテンシャルの定量とそのイオン特異的変調

Yuji Higaki, Benjamin Fröhlich, [Akihisa Yamamoto](#), Ryo Murakami, Makoto Kaneko, Atsushi Takahara, and Motomu Tanaka, "Ion Specific Modulation of Interfacial Interaction Potentials Between Solid Substrates and Model Cells Mediated via Zwitterionic, Super-Hydrophilic Poly(sulfobetaine) Brushes", *J. Phys. Chem B.*, 121, 6, 1396-1404 (2017).

[3-5] ヒト角膜内皮細胞の品質評価と再生角膜の早期予後予測のためのバイオマーカーの開発

[Akihisa Yamamoto](#), Hiroshi Tanaka, Munetoyo Toda, Chie Sotozono, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita, Morio Ueno, and Motomu Tanaka, "A Physical Biomarker of the Quality of Cultured Corneal Endothelial Cells and of the Long-Term Prognosis of Corneal Restoration in Patients", *Nature Biomedical Engineering*, 3, 953-960 (2019)

[3-6] 可逆的な硬さ可変水和ゲルを用いた筋芽細胞の動的力学制御

Marcel Hörning, Masaki Nakahata, Philipp Linke, [Akihisa Yamamoto](#), Mariam Veschgini, Stefan Kaufmann, Yoshinori Takashima, Akira Harada, and Motomu Tanaka, "Dynamic Mechano-Regulation of Myoblast Cells on Supramolecular Hydrogels Cross-Linked by Reversible Host-Guest Interactions", *Scientific Reports*, 7, 7660/1-11 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akihisa Yamamoto, Hiroshi Tanaka, Munetoyo Toda, Chie Sotozono, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita, Morio Ueno, and Motomu Tanaka	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A Non-Invasive Physical Biomarker for Predictive Diagnosis of In Vitro Cell Sources and Restoring Human Corneal Endothelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） To be assigned	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 Wasim Abuillan, Mariam Veschgini, Salome Mielke, Akihisa Yamamoto, Xianhe Liu, Oleg Kononov, Marie Pierre Krafft, and Motomu Tanaka	4. 巻 20
2. 論文標題 Long-Range Lateral Correlation between Self-Assembled Domains of Fluorocarbon-Hydrocarbon Tetrablocks by Quantitative GISAXS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemPhysChem	6. 最初と最後の頁 898-904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cphc.201800967	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 該当する
1. 著者名 Frank, Viktoria; Chushkin, Yuriy; Froehlich, Benjamin; Abuillan, Wasim; Rieger, Harden; Becker, Alexandra S.; Yamamoto, Akihisa; Rossetti, Fernanda F.; Kaufmann, Stefan; Lanzer, Michael; Zontone, Federico; Tanaka, Motomu	4. 巻 7
2. 論文標題 Lensless Tomographic Imaging of Near Surface Structures of Frozen Hydrated Malaria-Infected Human Erythrocytes by Coherent X-Ray Diffraction Microscopy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14081/1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-14586-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Veschgini, Mariam; Abuillan, Wasim; Inoue, Shigeto; Yamamoto, Akihisa; Mielke, Salome; Liu, Xianhe; Kononov, Oleg; Krafft, Marie Pierre; Tanaka, Motomu	4. 巻 18
2. 論文標題 Size, Shape, and Lateral Correlation of Highly Uniform, Mesoscopic, Self-Assembled Domains of Fluorocarbon-Hydrocarbon Diblocks at the Air/Water Interface: A GISAXS Study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemPhysChem	6. 最初と最後の頁 2791-2798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cphc.201700325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hoerning, Marcel; Nakahata, Masaki; Linke, Philipp; Yamamoto, Akihisa; Veschgini, Mariam; Kaufmann, Stefan; Takashima, Yoshinori; Harada, Akira; Tanaka, Motomu	4. 巻 7
2. 論文標題 Dynamic Mechano-Regulation of Myoblast Cells on Supramolecular Hydrogels Cross-Linked by Reversible Host-Guest Interactions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7660/1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07934-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuji Higaki, Benjamin Froehlich, Akihisa Yamamoto, Ryo Murakami, Makoto Kaneko, Atsushi Takahara, and Motomu Tanaka	4. 巻 121
2. 論文標題 Ion-Specific Modulation of Interfacial Interaction Potentials between Solid Substrates and Cell-Sized Particles Mediated via Zwitterionic, Super-Hydrophilic Poly(sulfobetaine) Brushes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1396-1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.6b11540	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞評価方法、細胞評価装置、及び細胞評価プログラム	発明者 田中 (求)、山本、 上野、羽室、木下、 田中 (寛)、戸田、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02018151223A1	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

所属機関ホームページ 京都大学 高等研究院 医学物理・医工計測グローバル拠点 (Center for Integrative Medicine and Physics) https://cimphy.kuias.kyoto-u.ac.jp/
--

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
連携研究者	安藤 弘宗 (Ando Hiromune) (20372518)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	
連携研究者	長谷川 光一 (Hasegawa Koichi) (50378890)	京都大学・高等研究院・講師 (14301)	