

令和元年6月17日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12868

研究課題名(和文) 培養基質の膨潤力を活用した空間自由度の高い細胞力学刺激法の開発

研究課題名(英文) Development of new methods for evaluating cell mechano-response to multidirectional and anisotropic mechanical stimuli induced by hydrogel swelling

研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50551173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光に応答して変形する細胞培養ゲル基板を開発し、様々な時空間パターンを有する力学刺激を細胞に印加できる実験システムを構築した。実際に本システムを用いて、多方向かつ異方的な力学刺激を様々な細胞に印加し、その応答を計測することに成功した。また、これら材料側のアプローチだけでなく、光源であるレーザー側からのアプローチによる物質操作技術の開発も進め、有機・バイオ材料の結晶成長を自在制御できる方法の開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究で、細胞が外部環境の伸展・収縮などの力学刺激を感知し、様々な細胞機能や形態の変化を示すことが明らかとなり、細胞機能発現と力学刺激との相関の解明に注目が集まっている。本研究では、従来までは難しかった、多方向かつ異方的な力学刺激を細胞に印加できる実験システムを開発することに成功した。これにより、生体内で起こりうる空間不均一な力学刺激を模倣することが初めて可能となり、細胞機能発現に資する力学刺激の時空間パターンの解明が進むことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed photo-responsive cell culture substrate that can generate mechanical stimuli with various spatio-temporal patterns. We succeeded in evaluating cell mechano-response to multidirectional and anisotropic mechanical stimuli by using the substrate. In addition, we also developed new optical manipulation methods for the control of growth of organic crystals.

研究分野：生物物理化学、光工学

キーワード：光分解性ゲル ゼラチン 細胞力学応答 膨潤力 レーザー操作 細胞骨格 モータータンパク質 光化学反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年の研究で、細胞が外部環境の伸展・収縮などの力学刺激を感知し、様々な細胞機能や形態の変化を示すことが明らかとなってきた。このような細胞の力学応答の解明のため、これまで、電動アクチュエータにより培養基板を力学的に伸縮させる方法が主に用いられてきた。しかし、電動アクチュエータでは、基板の伸縮の空間自由度は1軸または2軸方向の単純なものに限られ、生体内で起こりうる空間不均一な力学刺激を模倣することは難しい。また、培養基板が合成高分子（シリコンゴムまたはポリアクリルアミドゲル）に限られており、生体由来の細胞機能を計測するにあたり材料選択の幅が極めて狭かった。

2. 研究の目的

本研究の主要な目的は、光に応答するハイドロゲル基板を用いて、時空間軸で力学刺激が可能な細胞培養システムを開発することにある。さらに、本培養システムを用いて、がん細胞や間葉系幹細胞の形態変化などを誘導する力学刺激の時空間構造を明らかにする。また、ハイドロゲル以外にも、レーザーなどの力学刺激を駆使して、細胞を含む様々な物質を操作するための技術基盤を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、光に応答するハイドロゲル基板として、①光分解性ゲルと②微小管ゲルの2種類の細胞培養基板を構築した。①については、研究分担者である杉浦らが開発した光開裂性架橋剤[1]を用いて、ゼラチンなどの生体材料をベースとした光分解性ゲル基板を作製した。②については、研究協力者の川村と共同で、化学エネルギーで変形する微小管ゲル基板を構築した。また、上記の材料開発を進めると同時に、集光レーザーによる物質操作技術の開発にも取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 光応答性ゲル基板を用いた空間自由度の高い細胞力学刺激法の開発

①光分解性ゲルに関しては、紫外線を照射すると、ゲル中で蓄積した膨潤力が解放され、ゲルが大きく変形することを見出した。そこで、このゲル変形の最適条件（溶液、光照射、架橋濃度など）を検討したところ、最大でマイクロニュートンレベルの力が発生することがわかった。次に、本ゲル基板により細胞に力学刺激を加えたところ、細胞の突起構造（フィロポディアなど）に顕著な変化が表れることがわかった（図1）。そこで、本ゲルを用いて細胞に対して異方的な力学刺激を与えることを目指し、電動ステージを用いて紫外線の多点照射を試みた。その結果、4方向から、それぞれ異なる強度で力学刺激を与えることに成功し、空間自由度の高い細胞力学刺激法として応用できることが明らかとなった。また、本基板上でメラノーマや筋肉系細胞の力学応答を詳細に調べたところ、大きな力学刺激に対しては細胞は粘弾性体のように振る舞うのに対して、小さな力学刺激に対しては仮足の再構成など生化学的な応答性を示すことがわかった。以上により、本研究計画の目標であった、空間自由度の高い細胞力学刺激法の開発とその実証ができたと考えている。これらの成果の一部は学会で発表し、現在はその論文文化作業を進めている。

②微小管ゲルに関しては、モータータンパク質（キネシン）と化学エネルギー（ATP）とを組み合わせ、細胞培養条件下で動的な刺激を与えられる基板を構築した。この時、化学エネルギーとしてCaged ATPを用いることで、光照射をトリガーとしてゲル基板の変形を誘導し、様々な時空間構造の力学刺激を細胞に引火できることを実証した（ACS Biomaterials & Engineering 2016）。

①と②の手法では、発生可能な力学刺激の大きさや時空間パターンに大きな違いがあり、それぞれを相補的に使用することで、様々な細胞力学応答を詳細に調べることができると期待される。

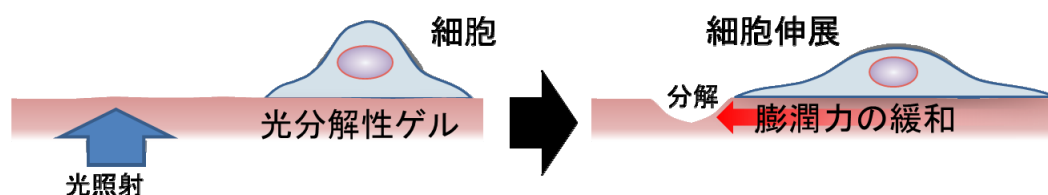


図1：光分解性ゲルを用いた細胞への力学刺激印加のスキーム

(2) 集光レーザーによる物質操作技術の開発

本研究では、(1)で述べたような材料側のアプローチだけでなく、光源であるレーザー側からのアプローチによる物質操作技術の開発も進めた。ここでは特に、フェムト秒レーザーによ

る多光子励起の高い空間分解能を利用して、有機・バイオ材料の結晶成長を自在制御したり、生細胞膜の局所的な流動性を計測することに成功した。これらの成果の一部はすでに学会及び論文にて発表しており (Nature Photonics 2016 など)、今度さらなる技術発展と汎用化を目指して研究を進める予定である。

<引用文献>

[1] F. Yanagawa, S. Sugiura, T. Takagi, K. Sumaru, G. Camci-Unal, A. Patel, A. Khademhosseini, T. Kanamori, *Advanced Healthcare Materials*, 4 (2015) 246-354.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① D. Suzuki, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, “Control of Organic Crystal Shape by Femtosecond Laser Ablation”, *Crystal Growth & Design*, 18 (2018) 4829-4833, DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.08.010. 査読有
- ② T. Matsuzaki Takahisa, S. Matsumoto, T. Kasai, E. Yoshizawa, S. Okamoto, H. Y. Yoshikawa, H. Taniguchi, T. Takebe, “Defining Lineage-Specific Membrane Fluidity Signatures that Regulate Adhesion Kinetics”, *Stem Cell Reports*, 11 (2018) 852-860, DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00697. 査読有
- ③ 丸山 美帆子, 吉川 洋史, “フェムト秒レーザーで制御する核発生と成長モード”, *光化学*, 49 (2018) 71-77. 査読有
- ④ H. Y. Yoshikawa, D. A. Pink, N. C. Acevedo, F. Peyronel, A. G. Marangoni, M. Tanaka, “Mechanical Response of Single Triacylglycerol Spherulites by Using Microcolloidal Probes”, *Chemistry Letters*, 46 (2017) 599-601, DOI: <https://doi.org/10.1246/cl.170014>. 査読有
- ⑤ K. Iida, R. Sakai, S. Yokoyama, N. Kobayashi, S. Togo, H. Y. Yoshikawa, A. Rawangkanm K. Namiki, M. Suganuma, “Cell softening in malignant progression of human lung cancer cells by activation of receptor tyrosine kinase AXL”, *Scientific Reports*, 7 (2017) 17770-17780, DOI: 10.1038/s41598-017-18120-4. 査読有
- ⑥ T. Matsuzaki, H. Ito, V. Chevyreva, A. Makky, S. Kaufmann, K. Okano, N. Kobayashi, M. Suganuma, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, M. Tanaka, “Adsorption of galloyl catechin aggregates significantly modulates membrane mechanics in the absence of biochemical cues”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19 (2017) 19937-19947, DOI: 10.1039/C7CP02771K. 査読有
- ⑦ 吉川洋史, 松崎賢寿, “反射干渉顕微法～ソフト界面の非侵襲ナノイメージング～”, *生物物理*, 57 (2017) 318-322, DOI: 10.2142/biophys.57.318, 査読有
- ⑧ Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H. Y. Yoshikawa, Y. Mori, “Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation”, *Nature Photonics*, 10 (2016) 723-726, DOI: <https://doi.org/10.1038/nphoton.2016.202>. 査読有
- ⑨ R. Kawamura, D. Uehara, N. Kobayashi, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, “Kinesin-driven active substrate giving stochastic mechanical stimuli to cells for characterization”, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2 (2016) 2333-2338, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00538>. 査読有

[学会発表] (計 30 件)

- ① 吉川 洋史, “レーザーアブレーションによる有機・バイオ材料の結晶成長制御”, レーザー学会学術講演会 第 39 回年次大会 (招待講演), 2019 年.
- ② H. Y. Yoshikawa, “Spatiotemporal Control of Growth of Organic Single Crystals by Laser Ablation”, 10th Asian Photochemistry Conference (招待講演), 2018 年.
- ③ H. Y. Yoshikawa, “Spatiotemporal Control of Crystal Growth of Biomolecules by Laser Ablation”, 19th International Symposium on Laser Precision Microfabrication (招待講演), 2018 年.
- ④ H. Y. Yoshikawa, “Impact of green tea catechin on cell membrane mechanics”, The 14th Japan - Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (基調講演), 2018 年.
- ⑤ M. Watanabe, S. Togo, R. Kawamura, N. Kobayashi, S. Nakabayashi, M. Suganuma, H. Yoshikawa, “Morphology and molecular structure of cancer cell membrane studied by interference and fluorescence microscopies”, The 14th Japan - Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2018 年.
- ⑥ 吉川 洋史, “短パルスレーザを駆使した細胞組織化・疾病メカニズムの解明”, 第 89 回レーザ加工学会 (招待講演), 2018 年.
- ⑦ 吉川 洋史, “フェムト秒レーザーアブレーションによる有機結晶の成長制御”, 第 78 回応用物理学会 秋季学術講演会 (招待講演), 2017 年.

- ⑧ 吉川 洋史, “がん細胞・幹細胞のバイオメカニクス”, 日本機械学会 2017 年度年次大会 (招待講演), 2017 年度.
- ⑨ K. Ng, K. Iketaki, R. Kawamura, S. Nakabayashi, Y. Yoneyama, F. Hakuno, S. Takahashi, S. Sugiura, H. Yoshikawa, “Actin Cytoskeleton Remodeling Dynamics of Adherent Cells Under Mechanical Strain of Gelatin Substrate”, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年.
- ⑩ 吉川 洋史, 池滝 憲太郎, 柳川 史樹, 川村 隆三, 吳 國愷, 田中 泰誠, 小嶋 勝, 新井 健生, 米山 鷹介, 伯野 史彦, 高橋 伸一郎, 高木 俊之, 金森 敏幸, 中林 誠一郎, 杉浦 慎治, “Development of a new method for evaluating cell mechano-response to multidirectional and anisotropic mechanical strain by using photodegradable hydrogel”, 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会, 2016 年
- ⑪ 吉川 洋史, 川村 隆三, “規律的な組織形成に資する細胞-外場間力学的相互作用の解明”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (招待講演), 2016 年.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 吉川 洋史, 武部 貴則, “細胞凝集塊制御技術”, 細胞社会学 (大和 雅之 編著, コロナ社) 2.3 節, 2016 年.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 杉浦 慎治

ローマ字氏名 : SUGIURA, Shinji

所属研究機関名 : 産業技術総合研究所

部局名 : 創薬基盤研究部門

職名 : 上級主任研究員

研究者番号 (8 桁) : 10399496

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 川村 隆三

ローマ字氏名 : KAWAMURA, Ryuzo

※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。