

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02010

研究課題名(和文)細胞メカノバイオロジーのためのアクティブ分析科学の基盤構築

研究課題名(英文)Building Infrastructure for Active Analysis of Cell Mechanobiology

研究代表者

中西 淳(NAKANISHI, Jun)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・グループリーダー

研究者番号：60360608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外基質の弾性率などの力学的特徴に対する「細胞力覚」のダイナミクスを理解するには、力学的特徴をその場で変化させる方法が有用である。本研究では、UV/VIS光照射に対して光異性化するアゾベンゼンを側鎖にもつ高分子からなるハイドロゲルを開発し、高分子の相分離現象を介したゲルの膨潤・収縮を誘発し、基質弾性率の動的変化を実現した。本手法を用い、乳がん細胞に動的な力学刺激を付与することで上皮間葉転換(EMT)現象を対象に適用することで、同材料に基づく細胞力覚のアクティブウォッチングの方法論を確立することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した光応答材料は、近年注目されている細胞メカノバイオロジーの動的プロセスの探究に好適で、それを用いたアクティブウォッチング手法は分析科学的な意義も高い。さまざまな生命現象や病態に物理的な力が明らかになる今日において、メカノバイオロジーのための新しい方法論やそれを用いた生命現象・病態の発生原理の理解は、物理的な「力」を利用した新しい治療技術や力の作用を代替する薬剤の探索などの開発にもつながり、社会的な意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Cells sense the mechanical properties of their extracellular matrices (ECMs). To understand the dynamics of the processes, it is crucial to develop methods to manipulate the mechanics of the ECMS in situ. In this research, we have developed hydrogel based on a polymer grafting the photoisomerizable azobenzene molecule and succeeded in controlling the substrate elasticity through the photo-induced phase separation behavior of the polymer. We applied the method to investigate epithelial-mesenchymal transition of a breast cancer cell line and established the methodology for the active watching of the cellular mechanosensing.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：メカノバイオロジー 上皮間葉転換 がん 光異性化 相分離

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな生命現象や病態への物理的な「力」の関与が明らかになり、メカノバイオロジー分野が脚光を浴びている。たとえば、がんや肝硬変などの疾患では、組織が硬くなることで病態が悪化する。これらは、細胞が組織の硬さという力学的特徴を感知し、自らの表現型へと還元させていることを示している。ただそのメカニズムについては不明な点が多い。というのも、これまでの研究では、予め硬さが規定された基板を用意し、そこに細胞が馴染んでいく様子を見守る「受動的」な研究戦略が取られてきたからである。これに対して、細胞「力覚」のダイナミクスに迫るためには、ちょうどストフトフロー法や時間分解スペクトル分析と同じように、基質の硬さをその場で変化させ、それに対する細胞応答を分析するのが理想的だが、そのための材料開発は道半である。

### 2. 研究の目的

本研究では申請者グループがこれまでに進めてきた光照射に応じて界面の細胞接着性が変化する動的基板や、光照射に応じて可逆的にゾル-ゲル転移するゲル材料に関する研究などを足掛かりに、細胞に対して時空間制御された力学刺激を暴露し、その応答の時間分解分析を行うアクティブ分析という方法論を開発する。そのために、本手法のキーとなる材料の設計として、UV/VIS 光照射に応じて光異性化するアゾベンゼンを側鎖にもつ高分子からなるハイドロゲルを開発する。このゲルに対して光照射を行い、高分子の相分離現象を介したゲルの膨潤/収縮を誘発することで、基質の弾性率を動的に変化させることで研究のねらいである。本科研費研究では、まずは上述の光応答性高分子の合成、相分離挙動の解析を行った上で、三次元架橋したハイドロゲルを調節し、その光応答的な力学特性の変化ならびにその上で培養した細胞の応答を顕微鏡観察や遺伝子解析技術などで評価する。その際、癌細胞の悪性化の指標となる上皮間葉転換 (EMT) 現象に適用することで、本手法の有用性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) アゾベンゼン含有高分子・ハイドロゲルの開発と評価

4-Phenylazophenyl acrylate (AzoAA)と *N,N*-dimethylacrylamide (DMA)を適当比で混合し、ランダム共重合体をフリーラジカル重合により合成した(図1)。合成したポリマーをリン酸緩衝水溶液(PBS)に溶解し、昇温操作に伴う高分子水溶液の透過率変化を紫外可視分光光度計(UV-VIS)で求め、UV/VIS 照射による各組成の線形高分子の相分離挙動を評価した。さらに、ethylene glycol dimethacrylate によって三次元架橋した poly(AzoAA-*r*-DMA)キャピラリーゲルを調製し、その膨潤度測定を透過光観察によって行った。一方、細胞培養用に Poly(AzoAA-*r*-DMA)シートゲルを別途調製し、レオメーターによる粘弾性測定から温度・光応答性を求めた。

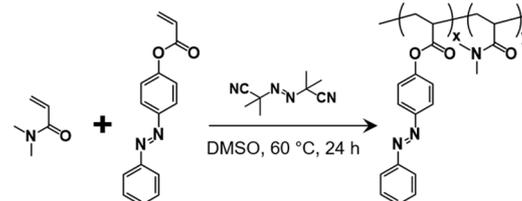


図1. フリーラジカル重合によるpoly(AzoAA-*r*-DMA)の合成

#### (2) 動的弾性率変化に対する細胞応答の解析

上述の薄層ゲルを、UV 架橋性の Sulfo-SANPAH を介してコラーゲンで修飾したのち、あらかじめ UV 照射によりゲルを軟らかくしておき、その上に乳癌細胞(MCF-7)細胞を播種した。その後、任意のタイミングでハイドロゲルに VIS 光を照射することで基質を硬化させ、それに伴う細胞の形状変化を評価した。同時に、細胞から mRNA を抽出し、EMT 関連遺伝子としての E-cadherin (上皮系のマーカー) の発現量の変化を求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) アゾベンゼン含有高分子・ハイドロゲルの開発と評価

Poly(AzoAA-*r*-DMA)をPBSに溶解した高分子水溶液の透過率測定結果を図2に示す。trans/cis 型両条件において、温度上昇に伴いポリマー同士が凝集することで透過率が減少する下限臨界溶液温度型の相分離挙動が得られた。cis 型における相分離温度は trans 型のそれよりもおよそ 7 °C 高く、これは cis 型への異性化に伴いアゾベンゼンの極性が高くなった結果、親水性が向上したためと考えられる。このように異性型に応じて異なる相分離温度をとるため、一定温度(37 °C)にお

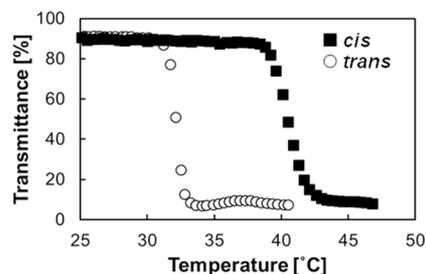


図2. PBS中でのpoly(AzoAA-*r*-DMA)の透過率測定。暗条件下でアゾベンゼンをtrans状態を維持、あるいはUV(365 nm)光照射でcis転位させたサンプルにおける結果。

いて光照射のみで相分離を誘起することが可能となった。

次に、poly(AzoAA-*r*-DMA)を架橋したキャピラリーゲルを作製し(図3)、PBS中で膨潤度測定を行った。暗条件下静置あるいはUV照射により、より予め *trans/cis* 状態

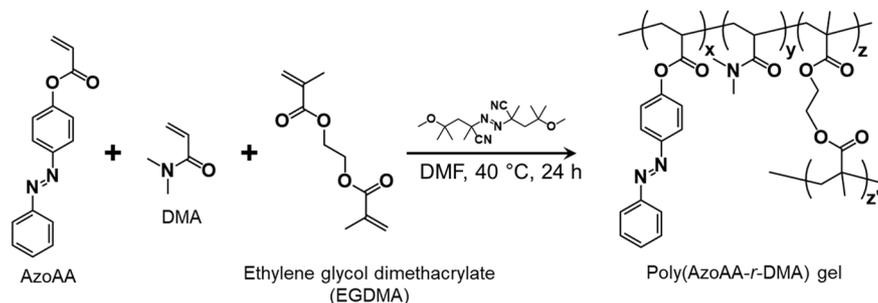


図3. アゾベンゼン含有ハイドロゲルの合成スキーム

にしたハイドロゲルに対して、UV/VIS 光を照射すると、光照射量依存的に膨潤/収縮する様子が観察できた(図4a)。また、UV/VIS を交互に照射することで可逆的な膨潤収縮が実現された(図4b)。さらに、照射するUV光の強度を10 mW/cm<sup>2</sup>および25 mW/cm<sup>2</sup>と変化させたところ、膨潤速度は照射強度依存的に変化することも確認できた(図4c)。

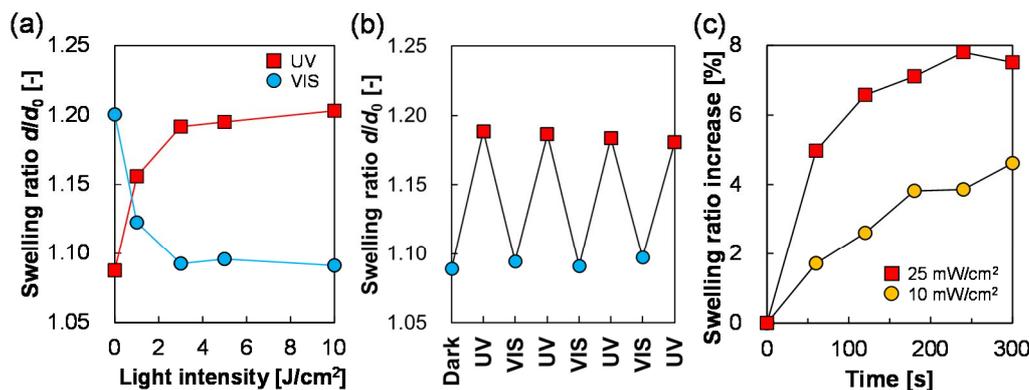


図4. 光照射によるキャピラリーゲル膨潤度変化。(a) *trans/cis*状態のハイドロゲルのUV/VIS光照射量依存的な膨潤/収縮挙動。(b) UV/VIS光交互照射による膨潤度の反復変化。(c) VIS光照射強度に対する膨潤速度の比較。

以上の検討から、光誘起膨潤収縮が確認されたため、つづいてシート状に作製したpoly(AzoAA-*r*-DMA)ゲルの力学特性を粘弾性測定により評価した。温度分散測定の結果、昇温に伴って貯蔵弾性率  $G'$ が增大する傾向が得られた。また、UV照射によってアゾベンゼンを *cis*型に異性化すると、 $G'$ は低下した(図5)。膨潤したことで架橋点密度が減少した結果と推察される。以上より、本研究で調製したpoly(AzoAA-*r*-DMA)ゲルは光によって可逆的に力学特性が制御可能なメカノバイオロジカル材料としての展開が可能であることが結論づけられた。

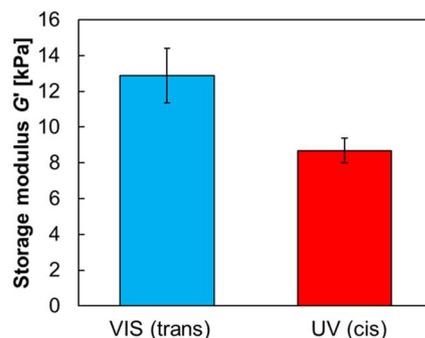


図5. シート状態のアゾベンゼン含有ゲルのUV/VIS光照射による貯蔵弾性率( $G'$ )の変化。

## (2) 動的弾性率変化に対する細胞応答の解析

つづいて、作製したシートゲルを細胞メカノバイオロジー応答のアクティブ分析科学への応用を行った。対象にヒト乳がん細胞 MCF-7 (Michigan Foundation Cancer-7) を選び、動的な力学刺激に対する E-cadherin の発現量変化を調べた。コラーゲン I 修飾した後に予め UV 照射によって軟化させたゲル上において、MCF-7 細胞は球状の形態で接着し、Day 1 から Day 2 へと時間が経過するとともに複数の細胞よりなる集合体が形成される様子が観察された(図6a,b)。この結果に呼応するように上皮性をあらかず E-cadherin の発現量の増大も観察された(図6e)。すなわち、このゲルは MCF-7 細胞にとっては軟らかいため十分に伸展することができず、結果として上皮性が高まっていることを示している。これに対し、ゲルを12時間および36時間のタイミングで VIS 光照射して硬化させた上で、再び48時間 (Day 2) の時点の細胞形状を観察したところ、早い時点 (12時間) で硬化したゲル上の細胞がより大きな凝集塊を形成することが分かった(図6c,d)。これらの細胞における E-cadherin の発現量も同様の結果を示し、12時間で硬化したゲル上の方が、36時間で硬化したものよりも高い E-cadherin 発現量が確認できた。本来早い時点で硬化した方がより長い時間、硬い基質に滞在することになるので、より EMT が進行するものと想定していたが、結果はそれとは正反対であった。この結果が意味するところは、VIS 光

照射したゲルも依然として MCF-7 にとっては軟らかく感じられ、上皮性を促進する環境なのであるが、VIS 光照射によって硬化した直後にはその硬さの変化を感じ取り、E-cadherin の発現量を大幅に低下させているものと想定される(図 6 e, iv)。すなわち、細胞は基質の動的な力学刺激の変化に応じて EMT 関連遺伝子の発現挙動を変化させることが明らかになった。以上より、光応答ゲルの開発に成功し、細胞メカノバイオロジーのアクティブ分析の基盤を確立することができた。より詳細なメカニズムの解析や、弾性率変化のキネティクスの違い(図 4 c など)に対する細胞応答については現在検討しているところである。

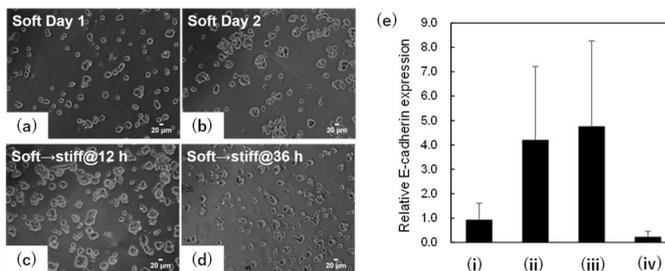


図6. アゾベンゼン含有水ドロゲル上での動的力学刺激に対する MCF7 細胞の接着および E-cadherin 遺伝子発現挙動。予め UV 光により軟化したゲル上で (a) 24 時間培養、(b) 48 時間培養、(c, d) 12 時間 (c) もしくは 36 時間 (d) の時点で VIS 光 (436 nm) 照射してゲルを硬化させる。(a-d) 位相差画像。(e) (a-d) における E-cadherin 発現量。グラフ中の (i-iv) が位相差画像の (a-d) に対応する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 S. Yamamoto, T. Miyama, T. Komoda, M. Sugawra, M. Nonomura, J. Nakanishi	4. 巻 36
2. 論文標題 A Facile Assay of Epithelial-mesenchymal Transition Based on Cooperativity Quantification of Cellular Autonomous Motions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 263-268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19P233	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 -
1. 著者名 中西淳	4. 巻 37
2. 論文標題 光応答基板を用いる細胞集団移動の探究および創薬応用に向けた検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオマテリアル	6. 最初と最後の頁 156-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 S. Yamamoto, K. Okada, N. Sasaki, A.C. Chang, K. Yamaguchi, J. Nakanishi	4. 巻 35
2. 論文標題 Photoactivatable Hydrogel Interfaces for Resolving the Interplay of Chemical, Mechanical, and Geometrical Regulation of Collective Cell Migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 7459-7468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.8b02371	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 Yamamoto Shota, Iwamaru Yoshifumi, Shimizu Yoshihisa, Ueda Yoshibumi, Sato Moritoshi, Yamaguchi Kazuo, Nakanishi Jun	4. 巻 88
2. 論文標題 Epidermal growth factor-nanoparticle conjugates change the activity from anti-apoptotic to pro-apoptotic at membrane rafts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 383 ~ 391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2019.02.026	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 Yamamoto Shota, Ikegami Hiroki, Yamaguchi Kazuo, Nakanishi Jun	4. 巻 2
2. 論文標題 A Dynamic Biomaterial Based on a 2-Nitrobenzyl Derivative with a tert-Butyl Substituent at the Benzyl Position: Rapid Response and Minimized Phototoxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 786 ~ 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptc.201800087	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 Jia Xiaofang, Minami Kosuke, Uto Koichiro, Chang Alice Chinghsuan, Hill Jonathan P., Ueki Takeshi, Nakanishi Jun, Ariga Katsuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Modulation of Mesenchymal Stem Cells Mechanosensing at Fluid Interfaces by Tailored Self Assembled Protein Monolayers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 1804640 ~ 1804640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.201804640	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 NAKANISHI Jun, SUGIYAMA Kenji, MATSUO Hiroataka, TAKAHASHI Yoko, OMURA Satoshi, NAKASHIMA Takuji	4. 巻 35
2. 論文標題 An Application of Photoactivatable Substrate for the Evaluation of Epithelial-mesenchymal Transition Inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 65 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.18SDP07	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 -

1. 著者名 中西淳	4. 巻 44
2. 論文標題 光応答基板を用いる細胞集団移動のメカノバイオロジー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 C&I Commun	6. 最初と最後の頁 14 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kenta Homma, Alice C. Chang, Shota Yamamoto, Ryota Tamate, Takeshi Ueki, Jun Nakanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Design of azobenzene-bearing hydrogel with photoswitchable mechanics driven by photo-induced phase transition for in vitro disease modeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.03.028	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 Alice Chinghsuan Chang, Koichro Uto, Kenta Homma, Jun Nakanishi	4. 巻 274
2. 論文標題 Viscoelastically tunable substrates elucidate the interface-relaxation-dependent adhesion and assembly behaviors of epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2021.120861	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16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Jun Nakanishi
2. 発表標題 Photoreponsive materials for resolving mechanobiology in collective cell migration
3. 学会等名 2019 MRS Fall meeting & Exhibit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西淳
2. 発表標題 材料を用いる細胞移動のメカノバイオロジー
3. 学会等名 第一回メカノバイオロジー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西淳
2. 発表標題 材料を用いる細胞機能の分析と制御
3. 学会等名 第32回九州分析化学若手の会 春の講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張敬萱, 宇都甲一郎, 中西 淳
2. 発表標題 粘弾性基板における上皮細胞の接着・移動挙動
3. 学会等名 第41回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Nakanishi
2. 発表標題 Engineering material interfaces to dissect cellular machineries
3. 学会等名 CSIRO-NIMS Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Yamamoto, Yoshifumi Iwamaru, Yoshihisa Shimizu, Kazuo Yamaguchi, Jun Nakanishi
2. 発表標題 Epidermal growth factor-nanoparticle conjugates become apoptotic at membrane rafts.
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (ISNM) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 A.C. Chang, K. Uto, and Jun Nakanishi
2 . 発表標題 Investigation of cell mechanobiology regulated by photo-crosslinking fluidic substrates
3 . 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (ISNM) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 S. Sakakibara, S. Yamamoto, M. Kamimura, and J. Nakanishi
2 . 発表標題 Research on the gravity dependence of collective cell migration by using a photoactivatable substrate
3 . 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (ISNM) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 T. Hanzawa, T. Miyama, M. Nonomura, J. Nakanishi, M. Sugawara
2 . 発表標題 Analysis of collective cell migration on geometrically constrained circular region using Particle Image Velocimetry
3 . 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (ISNM) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shota Yamamoto, Yoshifumi Iwamaru, Yoshihisa Shimizu, Kazuo Yamaguchi, Jun Nakanishi
2 . 発表標題 Epidermal growth factor-nanoparticle conjugates become apoptotic at membrane rafts.
3 . 学会等名 MANA International Symposium 2019 jointly with ICYS (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Yamamoto, Kazuo Yamaguchi, Jun Nakanishi
2. 発表標題 Photoactivatable gel interface: a platform for collective cell migration study
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本翔太、岩丸祥史、清水善久、山口和夫、中西淳
2. 発表標題 上皮成長因子固定化金ナノ粒子のアポトーシス誘導活性における細胞内応答機構の探究
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本翔太、岩丸祥史、清水善久、山口和夫、中西淳
2. 発表標題 脂質ラフトによる上皮成長因子担持金ナノ粒子が誘起するアポトーシス活性の制御
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本翔太、岩丸祥史、中西淳
2. 発表標題 シグナル凝縮ナノ粒子のアポトーシス誘導活性
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本翔太、岩丸祥史、清水善久、山口和夫、中西淳
2. 発表標題 脂質ラフトが媒介する上皮成長因子-金ナノ粒子コンジュゲートの特異なアポトーシス誘導活性
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本翔太、池上皓稀、山口和夫、中西淳
2. 発表標題 新規光分解性分子による光応答細胞培養基板の高感度・低光毒性化の実現
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018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
研究分担者	上木 岳士  (UEKI Takeshi)  (00557415)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主任研究員    (82108)	

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