

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19946

研究課題名（和文）新奇多階層細胞伸縮デバイスの開発

研究課題名（英文）Development of multi-layer cell stretching devices

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・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：さまざまな細胞が普段の生命活動の中で、自身が伸縮する力学刺激を受けており、その生理的役割が注目されている。本研究では、光照射に応じて膨潤・収縮するハイドロゲルを開発し、細胞に対して自在な伸縮刺激を付与する方法の開発に取り組んだ。研究期間中に所望のゲルの開発と、その上での細胞培養に成功した。このデバイスを利用すれば、今後、様々なスケールの力学刺激に対する細胞応答の解析が可能となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

管腔組織を構成する細胞は、普段の活動で伸縮刺激を受けて機能調節を受けているが、その詳細な理解は、高血圧や頻尿などの加齢とともに増加する疾患への治療戦略に指針を与える。本研究で開発した光応答デバイスでは、細胞内に存在する様々なスケールの生体分子装置の伸展刺激に対する影響を調べることができるようになる。それ故、基礎的な側面での機構解明に加え、薬剤スクリーニングなどの応用面でも期待される。

研究成果の概要（英文）：In our living body, many cells are exposed to stretching stimuli, whose physiological functions are yet-to-be determined. In this study, we have developed a functional hydrogel, which can be swollen and shrunk in response to photoirradiation, in order to apply arbitrary stretching stimuli to cells. During this research period, we have successfully developed such functional hydrogel and succeeded culturing cells thereon. This device will be useful to investigate cellular responses against mechanical stretching of various scales.

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 細胞伸展 アゾベンゼン ハイドロゲル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内壁や尿管などを構成する細胞は、脈拍や畜尿に伴い細胞体が伸縮する力学刺激を受けて、その機能を調節されている (J. Roy. Soc. Interf. 2011, 8: 1379; Vasc. Cell 2015, 7: 8)。これら伸縮刺激に対する細胞力覚を理解することは加齢とともに増加する管腔臓器特有の疾患の治療戦略に指針を与える。

細胞への伸縮刺激を模倣する実験系として、ポリジメチルシロキサン (PDMS) の表面に付着させた細胞を基材諸共にストレッチャーで伸長・収縮させる方法が汎用されている。ただこの方法は、PDMS の力学特性が非生理的である上に、力覚中心が μm スケールの細胞骨格なのか、それとも $\text{sub } \mu\text{m}$ スケールの接着斑なのか見分けがつかない。従来の分子生物学と異なり、力学作用は生命体の各種階層に直接作用することを考慮すると、この既往手法には方法論的な問題を抱えていた。

2. 研究の目的

本研究では、伸縮刺激に対する細胞の力覚階層性を探究するために、上述の既往技術の課題解決しうる新規デバイスの開発をめざした。具体的には、光照射に応じて可逆的に膨潤・収縮するハイドロゲルを開発し、このゲルに対する光照射位置を局所 or 全体と変化させることによって、階層性の異なる伸縮刺激を細胞に付与するという寸法である。本研究では、ゲルにおける可逆的な膨潤・収縮を実現するために、UV/可視光照射に応じて光異性化するアゾベンゼンに注目し、この分子を有するハイドロゲルの体積相転移現象に基づく膨潤・収縮挙動を利用することにした。ゲル組成に対する光応答挙動の解析、ならびに細胞培養実験への応用などに着手し、本戦略の妥当性を検証した。

3. 研究の方法

4-Phenylazophenyl acrylate (AzoAA) および N,N-dimethylacrylamide (DMA) から成る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。この際、AzoAA の導入率が相転移温度に与える影響を検討するため AzoAA の割合は系統的に変化させた。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で評価した。Poly(AzoAA-*r*-DMA) を三次元架橋したキャピラリーゲルをラジカル重合により調製した。ゲルの PBS 中での刺激応答性は平衡膨潤度測定により評価した。ゲル上での細胞培養のため poly(AzoAA-*r*-DMA) の薄層ゲルをカバーガラス上に調製し、その表面に光架橋剤 Sulfo-SANPAH を用いて collagen-I を固定化して細胞接着性を付与した。それと同時に細胞応答の観察用に F-actin に結合するペプチド (Lifeact) の GFP 融合タンパク質 and/or 接着斑タンパク質の Paxillin の mcherry 融合タンパク質を恒常発現させたイヌ尿細管上皮組織由来の MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を樹立した。作製した細胞株のゲル基板への接着の様子は位相差顕微鏡及び蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

合成した poly(AzoAA-*r*-DMA) の高分子水溶液は昇温に伴って透過率が減少した。これは下限臨界溶液温度以上で poly(AzoAA-*r*-DMA) が相分離したためと考えられる。AzoAA が *cis* 型の時は極性が上昇するため、UV 照射後の相分離温度は *trans* 型の時よりも高温側にシフトした (Fig. 1a)。AzoAA の導入率を変えることで相分離温度は調整可能であり、特に双安定温度を細胞培養温度 (37 °C) に調節することでその温度において光のみで可逆的に透過率が可変であった (Fig. 1b)。

次に、poly(AzoAA-*r*-DMA) を三次元架橋したゲルの温度応答性を平衡膨潤度測定により評価した。ゲルネットワークを形成している poly(AzoAA-*r*-DMA) が昇温に伴い収縮するため、膨潤度が温度に対して連続的に低下した。さらに、UV 照射により 25-50 °C の範囲で膨潤度が上昇したため、可逆的な膨潤収縮 (15% 程度) を光によって引き起こすことに成功した (Fig. 2)。

このゲルの表面に collagen-I 修飾を施すと、別途樹立した Lifeact-GFP 恒常発現 MDCK は接着させることができるようになったが、ゲル上に付着した細胞応答を蛍光観察する上で、アゾベンゼンによる吸収が妨げとなり、通常の倒立観察ではほとんどシグナルが得られないという問題に直面した (Fig. 3a)。そこで、この観察系を正立顕微鏡に変更したところ、細胞からの蛍光シグナルが観察できた (Fig. 3b)。また、正立顕微鏡で、自在なパターン化照射を行うための治具を設計した。以上の培養・観察条件で、細胞に対して階層性の異なる力学刺激を与えるための材料・システムを構築することができた。

以上のように、細胞に対して多階層の力学刺激を与えるための材料およびそのシステム、さらに観察系の構築に成功した。

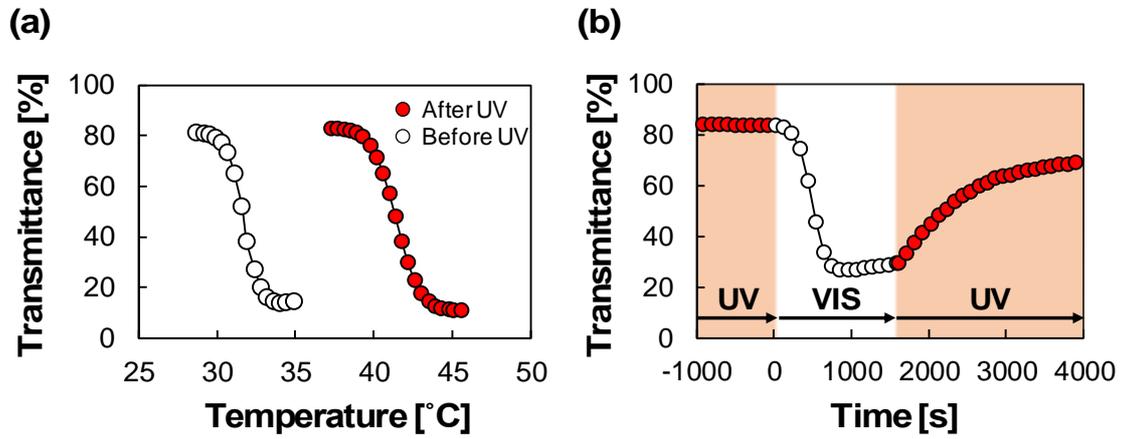


Figure 1 (a) Poly(AzoAA-r-DMA)を溶解したPBSのUV照射前後における濁度変化。(b) Poly(AzoAA-r-DMA)を溶解したPBSに対して37°CでUV/VIS照射を行った際の可逆的な濁度変化。

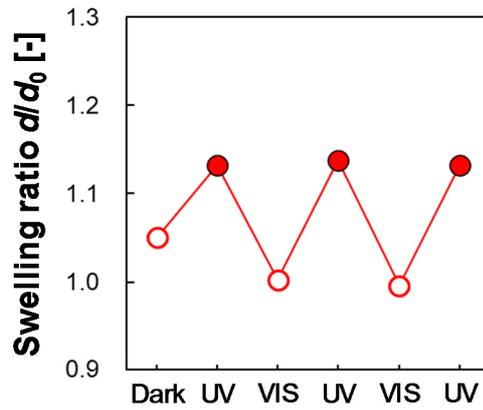


Figure 2 Poly(AzoAA-r-DMA)キャピラリーゲルに対して37°CでUV/VIS照射を行った際の可逆的な膨潤収縮。キャピラリーゲル内径 d をゲル作製に用いたガラスキャピラリーの内径 d_0 によって割った値を膨潤度とした。Darkは光照射を行っていない初期状態である。

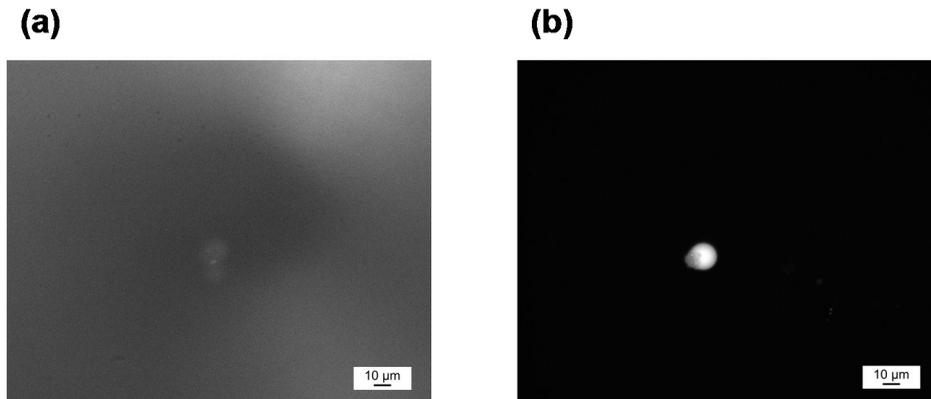


Figure 3 Lifeact-GFPを恒常発現したMDCK細胞をpoly(AzoAA-r-DMA)ゲル上に培養した際の(a)倒立顕微鏡画像および(b)正立顕微鏡画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 NAKANISHI Jun, SUGIYAMA Kenji, MATSUO Hirotaka, 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

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 Jun Nakanishi
2. 発表標題 Material-based elucidation of chemomechanical control of collective cell migration
3. 学会等名 International symposium on nanoarchitectonics for mechanobiology（国際学会）
4. 発表年 2019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
連携研究者	上木 岳士 (UEKI Takeshi) (00557415)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・主任研究員 (82108)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宇都 甲一郎 (UTO Koichiro) (30597034)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク トニクス研究拠点・独立研究者 (82108)	