

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12661

研究課題名(和文) インクジェット技術を利用した細胞Durotaxis誘導基材作製の確立

研究課題名(英文) Novel method of Durotaxis using inkjet technology

研究代表者

津留 美紀子 (Mikiko, Tsudome)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生命理工学センター)・准研究員

研究者番号：60399574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：実験装置の改造などを行い、Durotaxis誘導足場基材の検討を進めた。その結果、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンハイドロゲルにおいて、インクジェットパターンニングを用いた酵素加水分解による弾性変化設計技術を適用できることを確認した。また、ゼラチン以外の生分解性足場材料としてポリ-L-乳酸ハイドロゲルの作製について検討を進めており、今後酵素加水分解特性を解析する予定である。また弾性勾配の詳細な解析を行うため、本研究手法に適した原子間力顕微鏡による弾性勾配の計測方法の検討を進めている。これらの最終的な研究成果は原著論文の投稿を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インクジェット技術を用いてDurotaxis足場材料設計を行う本研究の掲げる手法は、フォトリソグラフィーを使用した既存の方法と比べ、インクジェットパターンニングの特徴である自在な設計を可能とする。これによりプロトタイプの高精度な弾性勾配足場材料を用いた網羅的かつ高精度な解析が可能となる。再生医工学においてDurotaxis走性の解明は、細胞を足場材料の硬さで制御するための重要な知見となる。本手法は、弾性変化を生分解で行うために細胞毒性による阻害の心配もなく、また細胞種の培養条件に応じた足場材料を選択でき、解析結果の利便性も高いため、様々な細胞種および足場基材の相互作用を解析できるツールになりうると期待される。

研究成果の概要(英文)：A new method for designing scaffolds with surface stiffness gradients was developed using inkjet-patterning technology.

Due to the lack of temperature sensitivity, glutaraldehyde cross-linked gelatin hydrogels were found to be more suitable as Durotaxis scaffolds than a physically cross-linked gelatin hydrogel. When enzyme solution was deposited on the surface of the glutaraldehyde cross-linked gelatin hydrogel using an inkjet patterning device, pits were formed due to enzymatic hydrolysis of gelatin. This result shows that the glutaraldehyde cross-linked gelatin hydrogel is a suitable Durotaxis scaffold material. In order to be apply other biodegradable scaffolds to our research, we have also developed a poly(L-lactic acid) hydrogel with nanofibrous structure. Attempts are underway to measure the stiffness gradient on the patterned scaffold using atomic force microscopy.

研究分野：ソフトマテリアル

キーワード：inkjet patterning gelatin protease

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞の走化性の一つである **Durotaxis** という現象は、組織形成時の細胞の局在制御に関わる現象で、創傷治癒のメカニズムに大きく関与しており、細胞と基質の相互作用（基質の力学的な性質とそこに接着した細胞内の張力分布など）を理解する上で重要である。**Durotaxis** を解析するには、細胞が認識できるマイクロスケールで硬さ（弾性）勾配を精密制御する足場基材設計が求められている。既存研究においては、フォトマスクを用いて足場材料を光架橋することで弾性勾配を制御する方法（図 1.A）が採用されている。しかしフォトマスクは非常に高価であることから、フォトマスクを用いて弾性制御した足場材料を作製しても弾性勾配のパターンが限られてしまい、様々な弾性勾配条件での解析が難しい。また、**Durotaxis** の解析において、足場基材表面の弾性がわずかに乱れるだけで、細胞が他の走性を誘導してしまうことも考えられる。このことから、足場基材への弾性設計は非常に難しく、これが **Durotaxis** 誘導実験の妨げになっている。このような背景から、多様な弾性勾配条件で系統解析できる **Durotaxis** 誘導足場材料の設計方法が望まれていた。

研究代表者は、これまでにインクジェットパターンニング技術を用いて極微量の酵素溶液を、水に不要な基質（セルロース、ゼラチン）の表面に滴下し、酵素加水分解に伴い基質表面に現れるピット（凹み）の体積を基質の加水分解量に換算することで、超高感度に酵素活性を定量する手法を開発してきた。その過程で、酵素溶液を高密度に滴下することで、酵素加水分解によるピットによってゲル表面にマイクロスケールのパターンを再現性よく造形できることを発見した。この発見を基にして、本技術を基板表面に複雑なパターンを自在に造形して表面力学特性をマイクロスケールで偏在改変し、**Durotaxis** を誘発する足場基材設計に応用できるのではないかとこの着想に至った。

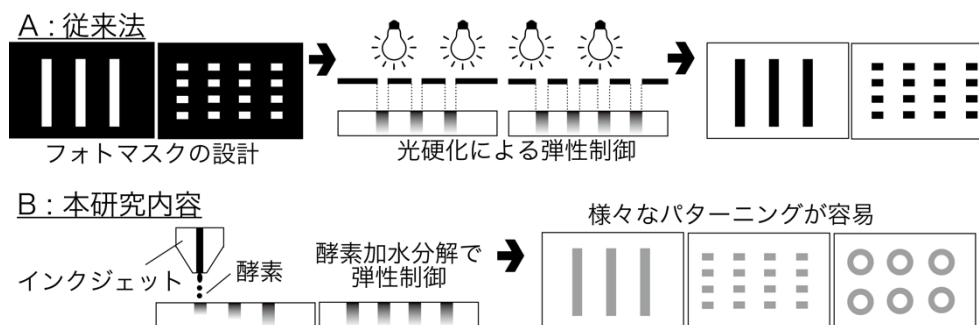


図 1. 従来法と本研究手法の比較

2. 研究の目的

Durotaxis 誘導足場基材の新しい設計方法として、研究代表者が確立した手法をもとに、ゼラチンなどの生分解性ハイドロゲル表面にインクジェット極微量分注装置を用いて加水分解酵素を数十 μl 滴下し、酵素加水分解に伴うネットワーク構造の破壊から弾性勾配を形成させる手法を確立する（図 1.B）。**Durotaxis** を誘導する弾性勾配基材を作成することを目指し、インクジェットパターンニング条件の検証、酵素加水分解で得られるハイドロゲルの弾性変化を詳細に解析することで、先行研究で行われている **Durotaxis** の誘導条件との相関を検証する。最終的には、マスクフリーでフレキシブルなパターンニングを可能にし、実験結果に応じて自在に基材設計することが可能な **Durotaxis** 誘導足場基材の技術確立と **Durotaxis** 誘導実験のシステム化を目指している。今回の研究期間では、インクジェットパターンニング設計の確立に向けて、最適な足場材料基材の検証と弾性勾配計測方法の確立を中心に進めることとした。

3. 研究の方法

(1) 化学架橋ゼラチンハイドロゲルの調製

微生物由来のトランスグルタナーゼを用いた酵素反応による架橋ゼラチンゲルは、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.5) 中でゼラチン粉末 (Type A, Sigma-aldrich 社) を加熱溶解後、トランスグルタナ

ーゼ（味の素製）を加え、37°Cで一晩静置反応することで調製した。反応条件について、ゼラチン濃度および酵素ユニット数を検討した。ゲニピンを用いた化学架橋ゼラチンゲルは、加熱溶解したゼラチン（Type A, Sigma-aldrich 社）溶液にゲニピン（和光純薬製）を添加し、室温で静置反応することで得た。

（2）グルタルアルデヒド架橋ゼラチンハイドロゲルによる足場材料設計

50%ゼラチン（Type A, Sigma-aldrich 社）水溶液を加熱溶解後、冷却によるゲル化した後、2%グルタルアルデヒド水溶液に浸漬することで、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンハイドロゲルを作製した。その後、0.1M リン酸緩衝液（pH7.5）で数回洗浄し、ゲル表面を風乾した。プロテアーゼ溶液（Trypsin または Proteinase K, どちらも Sigma-aldrich 社）をインクジェットヘッドに充填し、ピエゾインクジェット式極微量分注装置で 10pL/dot 吐出するピエゾ駆動条件を検討後、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンゲル表面に 30~120pL 滴下し、顕微鏡ステージに取り付けた加冷温プレート（TP-CHS, 株式会社東海ヒット）でグルタルアルデヒド架橋ゼラチンゲルを温度制御した。高速スキャン可能なハイブリッドカラーコンフォーカルマイクロスコープ（Optelics Hybrid C3-JH、レーザテック株式会社）を用いて表面に形成するピット形状を精密に計測した。得られた表面形状の解析は、ナノスケール 3D 画像処理ソフトウェア MountainMap Imaging Topography (Digital Surf 社・フランス)を用いて、基板の傾き補正後、体積測定など 3 次元形状解析を行った。

（3）ポリ-L-乳酸（PLLA）ハイドロゲルの作成

5~10 wt% PLLA を、テトラヒドロフランで加熱溶解後、-30°C に冷却することでゲル化させた。その後、水洗することで 5~10 wt% PLLA ハイドロゲルを得た。

（4）原子力顕微鏡を用いたハイドロゲルの弾性測定方法

原子間力顕微鏡（以下 AFM）には、JPK NanoWizard 4XP（ブルカー・ジャパン株式会社製）を用いて研究方法（2）の方法で処理したゼラチンハイドロゲル表面について、AFM 液中観察を行った。

4. 研究成果

（1）架橋ゼラチンハイドロゲルを用いた検証

申請当初予定していたゼラチンハイドロゲルは、温度によって物性が変化するため、細胞培養実験に対応できないという問題が発生した。そこで、物性が温度に依存しないハイドロゲルとして、ゼラチンを化学架橋したハイドロゲルを用いることとし、複数の化学架橋ゼラチンゲルについて最適な架橋条件を検討した。グルタルアルデヒド、ゲニピン、トランスグルタナーゼによる、ゼラチンの化学架橋ハイドロゲルを作成し検討した。トランスグルタナーゼによる酵素架橋したゼラチンハイドロゲルおよびゲニピン架橋ハイドロゲルは、どちらも酵素滴下によってピットを形成したが、ゲル作製条件の検討が難しく、再現性のよいゲル条件を得ることができなかった。トランスグルタナーゼを用いたハイドロゲルは、酵素架橋条件によりインクジェットパターンニングによるプロテアーゼ滴下部分の形状が変化するなど、ユニークな現象もみられた。また、ゲニピン架橋ハイドロゲルの場合、光に弱く、顕微鏡観察時の光源照射で表面が変形したことから、本研究には適さないことが明らかとなった。一方、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンハイドロゲルは、再現性よくピットを形成した（図 2）ことから、本研究においてグルタルアルデヒド架橋ゲルを用いた検討を進めることとした。

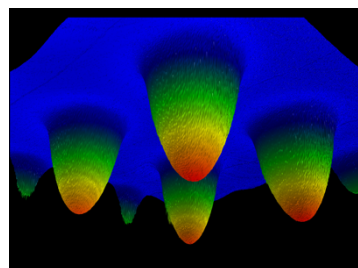


図 2. グルタルアルデヒド架橋ゼラチンゲル表面に形成したピットの 3D 像

（2）グルタルアルデヒド架橋ゼラチンハイドロゲルを用いた溶解斑形成

グルタルアルデヒド架橋ゼラチンゲル表面でインクジェットパターンニングを用いた Trypsin の酵素溶液を滴下したところ、従来のゼラチン物理ゲルと同様に、反応時間と共に成長するピットの

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsudome Mikiko, Tachioka Mikako, Miyazaki Masayuki, Uchimura Kohsuke, Tsuda Miwako, Takaki Yoshihiro, Deguchi Shigeru	4. 巻 25
2. 論文標題 An ultrasensitive nanofiber-based assay for enzymatic hydrolysis and deep-sea microbial degradation of cellulose	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	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.isci.2022.104732	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 Tachioka Mikako, Tsudome Mikiko, Deguchi Shigeru	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol for analyzing enzymatic hydrolysis of cellulose using surface pitting observation technology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	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.xpro.2023.102066	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 Tsudome Mikiko, Tachioka Mikako, Miyazaki Masayuki, Tsuda Miwako, Takaki Yoshihiro, Deguchi Shigeru	4. 巻 73
2. 論文標題 Marinagarivorans cellulolyticus sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the deep-sea off Noma-misaki, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	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） 10.1099/ijsem.0.005748	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mikiko Tsudome, Shigeru Deguchi
2. 発表標題 インクジェット技術を用いたバクテリアのパターン化植菌方法
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shigeru Deguchi, Mikako Tachioka, Mikiko Tsudome
2. 発表標題 Ultrasensitive Assay for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose
3. 学会等名 The 51st Conference of the German Colloid Society for Celebrating the 100th Anniversary of the Kolloid-Gesellschaft (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立岡美夏子、津留美紀子、出口茂
2. 発表標題 分離培養とゲノム解析から明らかになる深海セルロース分解菌の新奇性
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 15.0
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津留 美紀子, 出口 茂
2. 発表標題 3Dコンフォーカル顕微鏡を用いた大腸菌コロニー形成過程のタイムラプス解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第78回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mikiko Tsudome, Shigeru Deguchi
2. 発表標題 寒天培地上での海洋微生物の構造色の出現と発達のタイムラプス観察
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津留 美紀子, 出口 茂
2. 発表標題 インクジェットパターンニング技術を用いた超高感度プロテアーゼ活性測定法の検討
3. 学会等名 第65回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 立岡 美夏子, 津留 美紀子, 出口 茂 (担当: 分担執筆)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 504
3. 書名 極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線(第二章, 4節)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

1. Nikon Small World Competition, Honorable Mentions https://www.nikonsmallworld.com/galleries/2022-small-world-in-motion-competition/growth-of-a-marine-bacterium-cellulophaga-lytica-on-agar 2. Microscopy Today Micrograph Awards https://microscopy.org/post/Bacterial-colony

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

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