

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24241042

研究課題名(和文) タンパク質の精密ナノ凝集制御界面での細胞の接着と機能

研究課題名(英文) Function of cell adhesion on protein-adsorbed well-defined nanostructured interface

研究代表者

高井 まどか (Takai, Madoka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：40287975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,500,000円

研究成果の概要(和文)：再生医工学において、材料への細胞接着を制御することは必須である。本研究ではナノレベルで構造が制御されたナノ相分離構造を作製し、このパターンの違いにより、異なるタンパク質の吸着状態を作り、その上での細胞接着挙動の解明を目的とした。親水性部位と疎水性部位を有する両親媒性ブロックコポリマーを合成し、ナノレベルで構造が制御されたパターン表面を作製することが可能となった。親・疎水性の相が反転したナノ相分離構造界面で、細胞接着を誘導するタンパク質は、疎水性ドット状ドメインサイズに依存して凝集体を形成し吸着した。タンパク質の凝集体構造と、分布状態により細胞接着が制御されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to create suitable biocompatible materials for various tissue engineering applications, it is important to be able to understand protein adsorption and cell adhesion behaviours on the material surfaces. It is known that the nanoscale distribution of adhesive ligands affects cell adhesion behaviours. However, how nanoscale distribution of adsorbed proteins affect cell adhesion behaviours is still unclear. Therefore, in this study, we investigate the effect of the distribution of adsorbed proteins by the phase reversal of amphiphilic block copolymers composed of protein-adsorptive and non-adsorptive on cell adhesion behaviors. The difference of cell adhesion behaviours between opposite nano phase structures may be caused by the distributions of adsorbed proteins. It was concluded that in addition to the density of adsorbed proteins, the distribution also greatly affects cell adhesion.

研究分野：界面工学

キーワード：ナノ相分離 ブロックコポリマー タンパク質 細胞 界面

1. 研究開始当初の背景

体の組織や臓器は、細胞が周囲の細胞と接着分子やタンパク質を介して接着することで形成されている。細胞接着には、細胞-細胞間接着と、細胞-細胞外基質 (ECM) 接着とがある。細胞-細胞間接着は、アドヘレンスジャンクション (AJ)、タイトジャンクション (TJ) と呼ばれる 2 種類があり、AJ では、カドヘリンやネクチンが、TJ ではクローディンが接着分子タンパク質として知られている。また ECM に含まれる接着分子のファイブロネクチンは、細胞膜インテグリンと結合している。それぞれの接合の発現異常や分解などが、接着異常をもたらし、がんなど多くの疾患の原因となることが知られている。よって、細胞間、細胞-ECM 間の接着を知ることが現在の生物学・医学上の重要な課題の一つである。特に、再生医療、組織工学の分野において、細胞の組織や臓器の形成には、この接着を制御できなければ組織構築ができない。生体外での人工臓器の構築は、細胞-ECM 間の接着の制御が重要となるが、現在の ECM 構築は、コラーゲンやエラスチンなどの繊維成分と、プロテオグリカン、グルコサミノグリカンなどの非繊維成分と、ファイブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの接着分子やタンパク質を単に混合し、細胞が接着すればよい、という判断での使用がほとんどで、タンパク質の構造や性質を理解して利用しているとは言えない。このような中、最近、接着タンパク質を制御して細胞接着を議論する研究例がはじめている [1, 2]。申請者らの研究において、接着分子タンパク質の凝集状態をナノスケールで変えるだけで、細胞の接着・非接着という細胞接着挙動が変化することが見出された [2]。また、再生医療分野だけでなく、アルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイドβが、線維状の凝集体ではあまり細胞毒性が強くないのに対して、10nm 程度の球状ナノ構造を形成すると著しく毒性が強くなることが報告されている。さらにこのアミロイドβの凝集状態が、硫酸化糖のクラスター状態により変わることが報告されている。つまり、細胞毒性の発現にタンパク質の凝集状態が関わっていることが見出されている。

2. 研究の目的

これらの背景より、本研究では、細胞接着に関わるタンパク質のナノスケールでの集合体構造と機能を制御するバ

イオマテリアル界面を創製し、細胞接着に及ぼす影響、さらに細胞の機能との相関を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

親疎水性ブロックコポリマーのナノ相分離構造表面、ブロックポリマーブラシを用いてナノ構造を作り、種々のタンパク質を、ナノメートルスケールで分布、集合状態、配向、機能を制御する手法を確立する。タンパク質の分布、集合状態、さらには配向や機能の違いが、細胞の接着挙動、接着状態、細胞活性、細胞周期、さらには増殖、分化にどのような影響を与えるのかを系統的に評価する。細胞の接着異常は、様々な疾患と関連することが知られているため、タンパク質のナノスケールの集合体構造と細胞接着との関係を知ることによって、例えばがん化のメカニズムの解明につながると期待する。

4. 研究成果

【実験】

1) ポリマー合成

親水性部位に 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (PMPC)、疎水性部位に poly(3-(methacryloyloxy)propyltris(trimethylsilyloxy)silane) (PMPTSSi) を、ほぼ等しい組成比 (PMPC/PMPTSSi = 7/3) で有する両親媒性ブロックコポリマー poly(MPTSSi-block-MPC)、poly(MPTSSi-block-MPC-block-MPTSSi) をそれぞれ可逆的付加開裂連鎖移動重合によって合成した。また、組成比がほぼ同じランダムコポリマー poly(MPTSSi-random-MPC) をフリーラジカル重合により合成した。相分離構造のサイズを変えるため鎖長の異なる poly(MPTSSi-block-MPC-block-MPTSSi) を 4 種類作製した。

以下、poly(MPTSSi-block-MPC) を BP1、poly(MPTSSi-block-MPC-block-MPTSSi) の鎖長の短いポリマーから順に BP2、BP3、BP4、BP5、poly(MPTSSi-random-MPC) を RP と表す。ポリマーをキャストした TEM グリッドを 2% 四酸化オスミウム水溶液で染色した後、相分離構造を TEM で観察した。

2) QCM によるタンパク質吸着量測定

BP1、BP4 のファイブロネクチン吸着量 (10 µg/mL) を水晶振動子マイクロバランス (QCM-D) を用いて測定した。QCM-D の Au センサーに 1-dodecanethiol で CH₃-SAM を作製し、その上にスピコート (3000 rpm、20 s) によりポリマー膜を作製した。また、リファレンスとして PMPTSSi と RP、CH₃-SAM についても同様に測定を行った。

3) RGD モチーフ露出量の測定

細胞はタンパク質中に存在する RGD(R: アルギニン、G: グリシン、D: アスパラギン酸)モチーフを認識・結合することで接着する。フィブロネクチンはその分子内に RGD モチーフを有しているが、非吸着状態では RGD モチーフは内部に存在し細胞に認識されず、材料表面に吸着し構造変化を起こすことで RGD モチーフが表面に露出し、細胞が認識すると考えられている[3]。そこで enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)により各基板上の RGD 露出量を測定した。

4) 細胞接着挙動観察

ガラス基板に Au をスパッタし CH₃-SAM を 1-dodecanethiol を用いて作製した。そして各ポリマーをスピコートした基板を PBS に一晩浸漬させた後、あらかじめフィブロネクチン(10 µg/mL)を吸着させた(37 °C、1 h)。L929 マウス線維芽細胞 (3.0 × 10⁴ cells/mL)を無血清培地、または血清培地(D-MEM)で播種し、播種後 1、2、3 h と 1 day の接着形態を観察した。

【結果および考察】

1) TEM による相分離構造観察

TEM 像を Fig. 1 に示す。黒い部分が疎水性の PMPTSSi 部位、白い部分が親水性の PMPC 部位である。BP1 では親水性部位がドット状ドメインを形成していたが、BP2、BP3、BP4、BP5 では逆に疎水性部位がドット状ドメインを形成していた。また、BP2、BP3、BP4、BP5 では、疎水性ドット状ドメインのサイズが 10、19、27、52 nm と大きくなり、これは鎖長が長くなったことによる変化だと考えられる[4]。

2) QCM によるタンパク質吸着量測定結果

フィブロネクチン吸着による各表面での周波数変化を Fig. 2 に示す。親水部がマトリックスを形成している表面では、疎水部のサイズによってフィブロネクチン吸着が変化した。フィブロネクチン分子は 15.5 × 8.8 nm であることから、疎水性部位のサイズが 20 nm 以下の場合にはフィブロネクチン分子に比べて小さいため吸着せず、ドット状ドメインのサイズが 25 nm 以上の場合では、フィブロネクチン分子に比べて十分に大きかったため吸着できたと考えられる。

ナノ構造体によるタンパク質吸着状態の解析を行うため、以下の実験ではフ

ィブロネクチンが吸着する BP4 を用い、BP1 と比較を行った。BP1 と BP4 表面へのフィブロネクチン吸着による Δf を比較したところ、有意な差は見られなかったため、フィブロネクチン総吸着量はほぼ等しいことがわかった。ここで、フィブロネクチンは疎水性部位

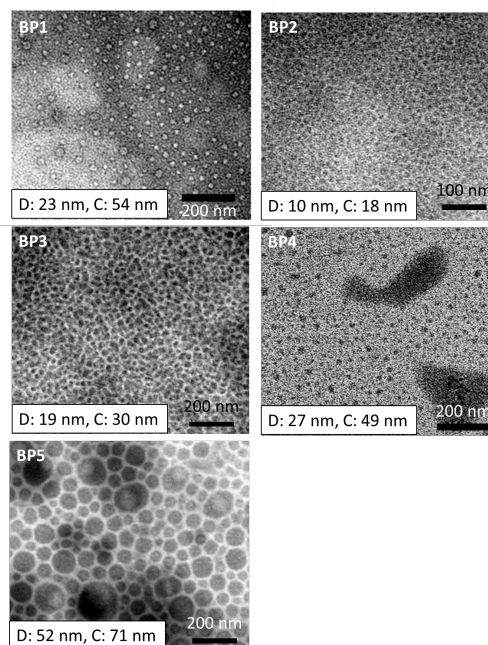


Fig. 1. TEM images of BP1, BP2, BP3, BP4, and BP5. Black areas represent hydrophobic components and white areas represent hydrophilic components. D represents the diameter of the dot-like domains and C represents the center-to-center distance between the dot-like domains.

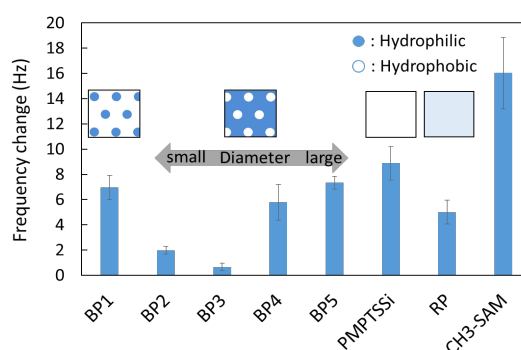


Fig. 2. The amount of adsorbed fibronectins

TEM 像から算出した疎水性部位の面積比率から、フィブロネクチンの吸着密度を見積もったところ、BP1 と比較すると、BP4 ではより高密度にフィブロネクチンが吸着していることがわかった。

3) RGD モチーフ露出量の測定結果

ELISA により測定した吸光度と QCM より測定した周波数変化の関係を、タンパク質

あたりの RGD モチーフ露出量とした。吸光度は RP の値を 0、CH₃-SAM の値を 1 として規格化した。BP1、BP4、PMPTSSi の表面で RGD モチーフの露出度に有意差はなかった。しかし、TEM 像から算出した疎水性部位の面積比から、RGD モチーフの密度は BP4、BP1、PMPTSSi の順に高いことがわかった。また、RGD モチーフの露出量を QCM により測定したフィブロネクチン吸着量で割ることにより、一分子当たりの構造変化度を算出した。BP1、BP4 に比べ PMPTSSi では構造変化が小さい傾向にあり、ナノ相分離構造によってフィブロネクチンの構造変化がより誘起されたことがわかった。

4) 細胞接着挙動

播種 1~2 時間後から BP1、BP4 で細胞の接着形態に違いが観察された。BP1 では異方的な伸展が見られたが、BP2 では等方的に接着していた。各タイムポイントでの真円度を算出したところ、播種 1~3 時間の初期接着において、BP1 は TCPS と同様の傾向、BP4 は PMPTSSi と CH₃-SAM と同様の傾向を示した。以上の結果より BP4 ではインテグリンの凝集が阻害され、強い焦点接着が形成できなかったと考えられる。BP4 ではタンパク質非吸着エリアである PMPC 相が、疎水性ドット状ドメインの間に存在していることが要因で、インテグリンの凝集が遅れていたと考えられる。一方、BP1 ではナノ構造が存在することによりフィブロネクチンの構造変化が誘起され、PMPTSSi に比べて露出した RGD モチーフ密度が高かったため、伸展が早かったと考えられる。

この現象を、親疎水パターンが相反したナノ相分離構造上で、タンパク質吸着量と密度が同程度に制御された表面で、タンパク質疎水性部位がマトリックスを形成している表面では細胞は接着したが、逆パターンの表面では細胞は接着しなかった(Fig.3) [4]結果に基づいて考察した。ナノ相分離構造のパターンは、吸着タンパク質間の距離と、吸着タンパク質の構造を変化させる因子となり、タンパク質間の距離遠く、さらに吸着タンパク質の構造変性が少ない表面では細胞接着が抑制されると考察した。

【結論】

ナノ相分離構造のパターンの違いによってタンパク質の吸着状態の違いを

より詳細に解析し、それによる細胞接着挙動の違いを観察した。親水性部位である PMPC と疎水性部位である PMPTSSi を有する両親媒性ブロックコポリマーを合成し、このポリマー可溶性溶媒を変えることで、相が反転したナノ相分離構造表面の作製が可能であった[5]。

細胞接着を誘導するタンパク質、フィブロネクチンは、疎水性ドット状ドメインのサイズにより吸着が制御された。また、RGD モチーフの露出量はナノ構造体のサイズに依存することがわかった。細胞接着は吸着したタンパク質の構造、つまり RGD モチーフ露出量と、ナノレベルでのタンパク質分布状態に強く依存することが明らかとなった。

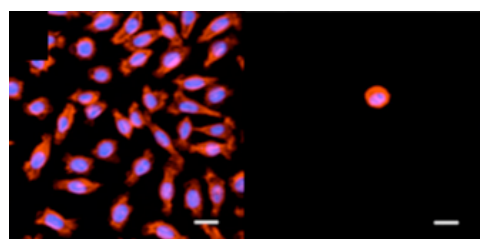


Fig. 3. Fluorescence microscope images of L-929 mouse fibroblasts on BP1(left) and opposite nanostructured surface(right) after 2 days of cultivation on copolymer surfaces in D-MEM (10% FBS). Scale bar = 20 um

参考文献)

- [1] M. Arnold, et al., Induction of cell polarization and migration by a gradient of nanoscale variations in adhesive ligand spacing, *Nano Lett.*, **8**, 2063(2008)
- [2] J.-H. Seo, R. Matsuno, M. Takai and K. Ishihara, Cell adhesion on phase separated surface of block copolymer composed of poly-(2-methacryloyloxyethyl phospholcholine) and poly(dimethylsilixane), *Biomaterials*, **30**, 5530-5340(2009)
- [3] T Hoshiba, M. Nikaido, et al., Characterization of the Attachment Mechanisms of Tissue-Derived Cell Lines to Blood-Compatible Polymers, *Adv. Healthcare Mater.*, **3**, 775-784(2014)
- [4] Y. Hiraguchi, K. Nagahashi et al., Effect of the distribution of adsorbed proteins on cellular adhesion behaviors using surfaces of nanoscale phase-reversed amphiphilic block copolymers, *Acta Biomaterialia*, **10**, 2988-2995(2014)
- [5] Y. Hiraguchi, K. Kushiro et al., Formation of reversed nanoscale phase-separated structures using poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-based amphiphilic block copolymers, *Polymer*, **99**, 166-172 (2016)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Y. Hiraguchi, K. Kushiro, M. Takai,

- Formation of reversed nanoscale phase-separated structures using poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-based amphiphilic block copolymers, *Polymer*, **99**, 166-172, 2016
DOI: 10.1016/j.polymer.2016.06.065 査読有
2. K. Kushiro, C-H. Lee, M. Takai, Simultaneous characterization of protein-material and cell-protein interactions using dynamic QCM-D analysis on SAM surfaces, *Biomaterials Science*, **4**, 989-997, 2016
DOI: 10.1039/c5bm00613a 査読有
 3. T. Azuma, Y. Teramura, M. Takai, Cellular Response to Non-contacting Nanoscale Sublayer: Cells Sense Several Nanometer Mechanical Property, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 10710-10716, 2016
DOI: 10.1021/acsami.6b01213 査読有
 4. D. Nagasawa, T. Azuma, H. Noguchi, K. Uosaki, M. Takai, Role of Interfacial Water in Protein Adsorption onto Polymer Brushes as Studied by SFG Spectroscopy and QCM, *J. Phys. Chem. C*, **119**, 17193-17201, 2015
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b04186 査読有
 5. Stable surface coating of silicone elastomer with phosphorylcholine and organosilane copolymer with cross-linking for repelling proteins, Koji Nagahashi, Yuji Teramura, Madoka Takai, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **134**, 384-391, 2015
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.040 査読有
 6. K. Takasu, K. Kushiro, K. Hayashi, Y. Iwasaki, S. Inoue, E. Tamechika, M. Takai, Polymer brush bionterfaces for highly sensitive biosensors that preserve the structure and function of immobilized proteins, *Sensors and Actuators B, Chemical*, **216**, 428-433, 2015
DOI: 10.1016/j.snb.2015.04.056 査読有
 7. Y. Hiraguchi, K. Nagahashi, T. Shibayama, T. Hayashi, T. Yano, K. Kushiro, M. Takai, Effect of Distribution of Adsorbed Proteins on Cellular Adhesion Behaviors Using Surfaces of Nanoscale Phase-Reversed Amphiphilic Block Copolymers, *Acta Biomaterialia*, **10**, 2988-2995, 2014
DOI: 10.1016/j.actbio.2014.03.019 査読有
 8. K. Nii, K. Sueyoshi, K. Otsuka, M. Takai, Zone electrophoresis of proteins in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchip coated with physically adsorbed amphiphilic phospholipid polymer, *Microfluid Nanofluid*, **14**, 951-959, 2013

DOI 10.1007/s10404-012-1102-8 査読有

[解説総説] (計 7 件)

1. 平口侑香里、久代京一郎、高井まどか、両親媒性ブロックコポリマーによるナノ相分離構造表面上でのタンパク質吸着と細胞接着挙動解析、表面科学、**37(5)**, 207-212 (2016)
2. 高井まどか、高機能バイオセンシングマテリアルの設計と作製、*Electrochemistry*, **82(12)**, 1091-1095(2105)
3. 高井まどか、医用デバイスに用いる生体親和性材料の創成と評価、日本材料科学会誌 **52(1)**, 14-17(2015)
4. 高井まどか、長澤大樹、東倫之、野口秀典、魚崎浩平、タンパク質吸着に及ぼす材料界面の水分子構造-和周波発生分光法による解析から-、表面科学、**35(9)**, 492-497(2014)
5. 高井まどか、3次元ナノ構造体を用いた高感度・迅速バイオセンサ、応用物理、**83(6)**, 478-481(2014)
6. 高井まどか、高須健司、ソフト界面の構築によるタンパク質の高機能固定化技術、信学技報、**113(17)**, 97-101(2013)
7. 高井まどか、生体親和性高分子表面の構築による界面水の役割、化学工業、**63(4)**, 66-72(2012)

[図書] (計 2 件)

1. バイオマテリアル: その基礎と先端研究への展開、3 マテリアル生体組織との反応 3・2 材料側要素 § 3・2・3 疎水性相互作用と静電的相互作用、高井まどか、岡野光夫監修、田畑泰彦、塙隆夫編著、東京化学同人、P155-158 (2016)
2. 生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略、第2章 材料表面とバイオインターフェースにおける各種挙動の解析 第1節 高分子バイオインターフェースとQCM-Dによる細胞の接着挙動解析、高井まどか、サイエンス&テクノロジー、P259-266 (2014)

[国際学会発表] (計 8 件)

1. Madoka Takai, Biocompatible phosphorylcholine-based copolymer for biomedical devices, Taiwan-Japan Bilateral Polymer Symposium 2016, NTHU, Taiwan, 2016/9/9 (invited)
2. Yukari Hiraguchi, Keiichiro Kushiro, Madoka Takai, Investigation of cell adhesion mechanism by the distribution of adsorbed proteins on nano-scale phase-separated structures, European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2016, Uppsala, Sweden, 2016/6/28-7/1 (poster)
3. Madoka Takai, Cell adhesion behavior on the

- surface of nano-domain structure by amphiphilic block-copolymers, International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2015/7/29-30, Tsukuba, Auditorium WPI-MANA, Tsukuba (invited)
4. Yusuke Chimura, Keiichiro Kushiro, Suzuyo Inoue, Katsuyoshi Hayashi, Yuzuru Iwasaki, Madoka Takai, Surface Modification by Nano-phase Separation Using Amphiphilic Block Copolymer for the Immunoassay Using Surface Plasmon Resonance, Nagoya University, Nagoya, 2015/3/31 (poster)
 5. Tomoyuki Azuma, Hidenori Noguchi, Kohei Uosaki, Madoka Takai, Analysis of protein adsorption on polymer brush interfaces surface-selective vibrational spectroscopy, IUMRS-ICA2014, Fukuoka University, Fukuoka, 2014/8/26 (poster)
 6. Madoka Takai, Cell Adhesion Behavior on Amphiphilic Block-Copolymer with Different Phase Separation, The 1st International Conference on Cell Encapsulation, Daejeon Korea, 2014/7/7(invited)
 7. Madoka Takai, Yukari Hiraguchi, Keiichiro Kushiro, Protein adsorption and Cell adhesion behavior on nanophase-separated surface prepared by amphiphilic block-copolymer, BMMP14, Hotel Associa Takayama Resort, Takayama, 2014/1/27(invited)
 8. Madoka Takai, Yukari Hiraguchi, Keiichiro Kushiro, The effect of nanophase-separated domains prepared by amphiphilic block-copolymer on cell adhesion, ICSE2013, Buasn, Korea, 2013/11/18(invited)

〔国内学会発表〕（計 13 件）

1. 平口侑香里、久代京一郎、寺村裕治、高井まどか、両親媒性ブロックコポリマーによるナノ相分離構造のパターンによる吸着タンパク質解析、第65回高分子学会年次大会、神戸国際会議場・展示場、神戸市、2016/5/25(ポスター)
2. 高井まどか、親疎水ナノ相分離表面での細胞接着／非接着、表面技術協会第61回『ナノテク部会』研究会、東京ビックサイト、2016/1/27（招待講演）
3. 平口侑香里、久代京一郎、高井まどか、ブロックポリマーを用いたナノドメイン構造表面への細胞接着機構解析、2015年真空・表面化学合同講演会、つくば国際会議場、2015/12/1(ポスター)
4. 高井まどか、ナノ界面構造を制御した医療デバイスの開発、2015年度、第1回

CAC フォーラム、日本化学会、化学会館（神田）2015/7/10(招待講演)

5. 平口侑香里、林智広、久代京一郎、高井まどか、ナノ相分離構造を用いた吸着タンパク質の吸着形態による細胞接着挙動、第64回高分子学会年次大会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015/5/27(ポスター)
6. 高井まどか、平口侑香里、久代京一郎、細胞工学における表面処理技術、電気化学会、第82回大会、横浜国立大学、横浜、2015/3/15(招待講演)
7. 高井まどか、医用デバイスに用いる生体親和性材料の創製と評価、第2回メゾスコピック研究会、東京電機大学、東京、2015/3/2(招待講演)
8. 高井まどか、ナノ構造制御された高分子表面でのタンパク質吸着および細胞接着挙動、第32回高分子表面研究会講座、東京理科大学 森戸記念館、東京、2014/7/11(招待講演)
9. 高井まどか、ナノ構造制御された高分子表面でのタンパク質吸着および細胞接着挙動、第32回高分子表面研究会講座東京理科大学 森戸記念館、2014/7/1(招待講演)
10. 高井まどか、長澤大樹、野口秀典、魚崎浩平、ポリマーブラシの界面水分子とタンパク質吸着挙動の和周波発生分光法による解析、第63回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、名古屋、2014/5/28(口頭)
11. 平口侑香里、長橋考治、柴山崇、林智弘、矢野隆章、久代京一郎、高井まどか、ナノ相分離構造表面上での吸着タンパク質の分布状態による細胞接着挙動変化、第63回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、2014/5/30(ポスター)
12. 高井まどか、細胞接着機能を制御する新規バイオインターフェースの創製、第33回表面科学学術講演会、つくば国際会議場、つくば、2013/11/28(招待講演)
13. 平口侑香里、柴山崇、久代京一郎、高井まどか、ポリマーナノ相分離構造表面でのタンパク質吸着分布による細胞接着挙動の変化、第35回日本バイオマテリアル学会、タワーホール船堀、東京、2013/11/26(ポスター)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

6. 研究組織
(1) 研究代表者

高井まどか (Takai, Madoka)
東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授
研究者番号：40287975