

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282142

研究課題名(和文) 分子運動性による吸着タンパク質の変性抑制・配向制御に基づいた細胞生育環境の構築

研究課題名(英文) Construction of cell culture environment based on regulation of orientation and denaturation of adsorbed proteins by molecular mobility

研究代表者

由井 伸彦 (Yui, Nobuhiko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：70182665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポリロタキサン(PRX)を基盤とした分子運動性表面による細胞育成環境に適したバイオマテリアル表面の構築を目指して、PRX表面を作製し分子運動特性が与える吸着タンパク質および幹細胞分化への影響について評価した。分子運動性によって培養細胞の細胞形態制御因子の活性化を制御することが可能となり、分子運動性の低い表面上で間葉系幹細胞は骨芽細胞に分化し、分子運動性の高い表面上で脂肪細胞に分化した。さらに分子運動性の高い表面上において人工多能性幹(iPS)細胞は心筋細胞に分化した。これらの結果より、分子運動性表面は細胞骨格系シグナルによる細胞機能調節を可能とする新たな細胞生育環境としての有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：For constructing biocompatible environments using molecularly mobile surfaces based on polyrotaxane (PRX), we fabricated PRX-coated surfaces and evaluated the effect of the molecular mobility on protein adsorption and the differentiation of stem cells on PRX surfaces. By regulating Rho-family GTPases depending on molecular mobility of PRX surfaces, mesenchymal stem cells (MSCs) on PRX surface with lowly molecular mobility were introduced the differentiation into an osteoblast lineage, and those on PRX surfaces with highly mobile surfaces were introduced the differentiation into an adipocyte lineage. In addition, induced pluripotent stem (iPS) cells on PRX surface with highly molecular mobility were introduced the differentiation into a cardiomyocyte lineage. Therefore, molecularly mobile surfaces were useful as new cell culture environments for the modulation of cellular function by regulating the cytoskeleton-related signaling pathway.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：ポリロタキサン 分子運動性 細胞機能調節

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに研究代表者らは生体の動的特性に対応し得るバイオマテリアル機能の創成を目指し、ポリロタキサン (PRX) の動的特性に基づいたバイオマテリアルの構築を推進してきた。PRX の特徴は、線状高分子鎖が多数の環状分子空洞部を貫通しているインターロック構造にあり、環状分子は線状高分子鎖に沿って自由に回転・並進する運動性 (分子運動性) を有していることが期待されている。この分子運動性を制御したバイオマテリアル表面をプラットフォームとして、 $\alpha$ -シクロデキストリン ( $\alpha$ -CD) とポリエチレングリコール (PEG) とからなる PRX を一成分とするトリブロック共重合体を合成し、そのキャスト表面の水における分子運動性とタンパク質・細胞・組織レベルでの生体応答との関係を検討してきた。特に、血漿あるいは血清由来の接着性タンパク質の吸着について、細胞接着エピトープの表面露出を酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 法、吸着状態を水晶振動子微量重量-エネルギー散逸量 (QCM-D) 測定から解析し、水中において分子運動性の高い PRX 表面が吸着後のタンパク質のコンフォメーションを良好に保持していることを見いだした (*Soft matter* 2012, **8**, 5477)。この結果は、構造の異なるタンパク質の機能を水和した分子運動性によって高度に制御できる可能性を示唆している。近年、コラーゲン 3 次元ゲル等による弾性率制御に基づいた細胞保持機能や表面ナノパターン化による接着細胞の形態調節が多く報告されており、細胞の種類によって分化や増殖に適した材料の特性が異なる事実も判明しつつある。こうした研究動向のもと、表面の水和分子運動性による構造機能の異なるタンパク質の吸着制御によって、目的とする細胞群を特定の分化系統に誘導あるいは増殖を亢進する生体類似環境を有したバイオマテリアル表面の構築が期待できる。

## 2. 研究の目的

分子運動性を有したバイオマテリアル表面でのタンパク質の吸着状態を水中で解析し、目的とする細胞・組織の培養に適した細胞の生育環境としてのバイオマテリアル表面を創製する指針を確立する。具体的には、分子運動性を広範囲に制御した表面を PRX トリブロック共重合体から作製し、その表面に対するタンパク質吸着挙動を和周波発生分光法解析により明らかにする。最終的には、表面分子運動性による吸着タンパク質の変性抑制・配向制御に基づいて、軟組織や硬組織の再生に適用できる細胞の育成環境としてのバイオマテリアル表面を創製する。

## 3. 研究の方法

(1) PRX トリブロック共重合体の合成および PRX 表面の作製

材料表面上に PRX を安定固定するために、

両末端にアンカーリング鎖を有した PRX トリブロック共重合体を合成した。具体的には、可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 剤を両末端に導入した PRX マクロ連鎖移動剤を用いて *n*-ブチルメタクリレート (BMA) と 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) の共重合を行った。さらに分子運動性を制御するため、 $\alpha$ -CD の貫通率およびメトキシ化率の異なる PRX トリブロック共重合体を合成した。これらの PRX トリブロック共重合体を水/エタノール混合溶液に溶解させ、キャスト法によって PRX 表面を作製した。

(2) 和周波発生分光法によるフィブリノーゲン吸着挙動解析

励起光源としてパルス幅 120 fs の Ti:Sapphire (800 nm) を用いて和周波発生 (SFG) 分光測定を行った。SFG シグナルは、分光器が取り付けられた CCD によって検出した。測定は内部全反射モードで行い、赤外ビームおよび可視光ビームの入射角はそれぞれ順に 50 度と 70 度とした。ポリマーとフィブリノーゲンの界面の解析は、*ppp* と *spp* の偏光組み合わせを用いて行った。

(3) 細胞培養実験

ラット大腿骨および脛骨から採取した間葉系幹細胞 (MSC) は、 $1.2 \times 10^5$  cells/well の細胞濃度になるようにそれぞれの表面に播種した。培養 4 時間後に MSC の接着を確認し、骨芽細胞もしくは脂肪細胞分化誘導培地に交換する。各表面上における MSC について細胞形態・ROCK 活性測定・RT-PCR による *ranx2* および *pparg* 遺伝子発現の定量・RUNX2 および PPAR $\gamma$  の染色・ALP 活性評価・Oil Red 染色について評価を行った。

また、マウス iPS 細胞を  $3.2 \times 10^4$  cells/well の濃度で各表面に播種し、7 日間培養後に 10 ng/mL のトリコスタチン A を含む培地に交換し、心筋細胞に分化誘導した。

## 4. 研究成果

(1) 和周波発生分光法を用いたフィブリノーゲンの吸着状態

作製した PRX 表面と数種類のランダム共重合体を被覆した表面上のフィブリノーゲンの吸着オリエンテーションについて SFG 分光法によって評価した。メトキシ化した  $\alpha$ -CD を有した PRX 表面は、その他の PRX 表面やランダム共重合体表面と比較して、水中環境下においてメトキシ化  $\alpha$ -CD のメトキシ基とアンカー部位の BMA のメチル基間の疎水性相互作用によって表面構造を再構築することが明らかになった。この表面上におけるフィブリノーゲンのオリエンテーションは、他の表面上のフィブリノーゲンとは全く異なり、動的な PRX 表面によってそのオリエンテーションを制御し得ることを示された。

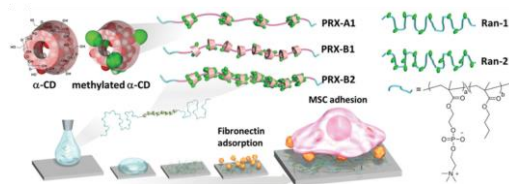


図1 PRXの分子構造および実験の概念

(2) 動的ポリロタキサン表面におけるMSCの接着挙動解析

ラット大腿骨および脛骨から採取したMSCをPRX表面に接着させ、その接着形態の観察を行った。用いたポリマーの分子構造および実験手順を図1に示す。PRX-A1(分子運動性の最も高いPRXブロック共重合体であり、 $\alpha$ -CDの貫通数12、 $\alpha$ -CDへのメトキシ基導入率90%)、PRX-B1(分子運動性が低いPRXブロック共重合体であり、 $\alpha$ -CD貫通数123、 $\alpha$ -CDへのメトキシ基導入率43%)、PRX-B2(分子運動性が低いPRXブロック共重合体であり、 $\alpha$ -CD貫通数104、 $\alpha$ -CDへのメトキシ基導入率61%)、そして2種のRandom(非PRX構造の汎用性メタクリレートポリマーであり、メトキシ基導入率が7mol%(Ran-1)および11mol%(Ran-2)であって、PRX-A1とPRX-B2と同様なメトキシ基を有する)の5種類のポリマー被覆表面を用いた。図2は、接着したMSCの4日目の接着形態を示している。未処理のガラス表面に接着したMSCでは明確なアクチン繊維の発達および円形放射状の接着形態が見られているのに対し、動的PRX表面上の細胞では細長い紡錘状の接着形態を示す特徴があった。一方で、ランダム共重合のような分子運動性の低いポリマー表面上では、未処理のガラス表面上のように円形放射状の接着形態を示した。この結果は、MSCが材料表面の分子運動性を認識していることを示唆している。

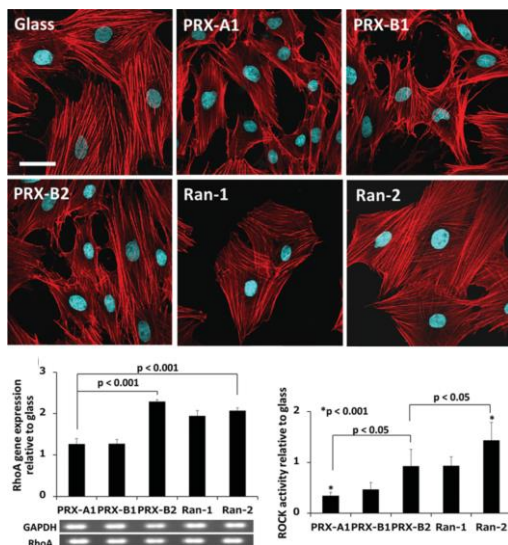


図2 MSCの形態(未分化誘導4日目、Scale bar = 50  $\mu$ m)(上)およびRhoA-ROCKの発現

それぞれの表面に接着したMSCの骨格系シグナル伝達経路であるRhoA-ROCKの発現をRT-PCRおよびELISA法によって解析した(図2)。その結果、分子運動性の高いPRX-A1表面上でRhoA-ROCKの発現が低く、分子運動性の低いPRX-B表面上ではRhoA-ROCKの発現がPRX-A1表面に比べて高く検出された。すなわちMSCのRhoA-ROCK発現は材料表面の分子運動性に大きく依存していることが確認された。さらに表面の分子運動性が最も低いRandom表面ではRhoA-ROCKが最も高く検出され、上記の考察を裏付ける結果となった。

(3) 動的ポリロタキサン表面におけるMSCの分化特性

MSCのような多能性能を有する細胞においてはRhoA-ROCKの発現程度は、接着した幹細胞の分化方向性を決定する分子スイッチとしても働いていると知られている。すなわち高いRhoA-ROCKの発現を示すMSCは骨芽細胞への分化が有利であり、低いRhoA-ROCKの発現を示すMSCは脂肪細胞への分化が有利であることが知られている。このような機序をもとにポリマー材料表面の分子運動性を調節することで、接着したMSCの分化制御が可能であるとの仮説を立て、MSCを骨芽細胞分化誘導培地および脂肪細胞分化誘導培地で培養し、その分化特性について評価を行った。その結果、骨芽細胞のマーカータンパク質であるRUNX2の遺伝子発現量は、骨芽細胞への分化の際、RhoA-ROCKの発現が最も高かったRan-2で最も高く発現され、RhoA-ROCKの発現が最も低かったPRX-A1表面において最も低い発現であった。一方で、脂肪細胞の分化マーカータンパク質であるPPAR $\gamma$ 遺伝子の発現量は、脂肪細胞への分化の際、Ran-2で最も低く発現され、PRX-A1表面において最も高い発現であった。この結果は、MSCの骨芽細胞および脂肪細胞への分化において、接着

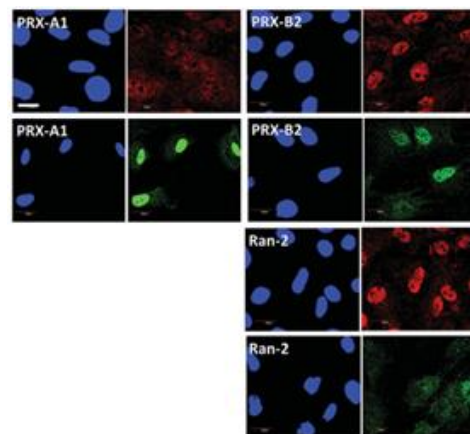


図3 骨芽細胞への分化(4日目)および脂肪細胞への分化(4日目)の分化マーカータンパク質の核内局在化(青:核、赤:骨芽細胞分化マーカーであるRUNX2、緑:脂肪細胞分化マーカーであるPPAR $\gamma$ )

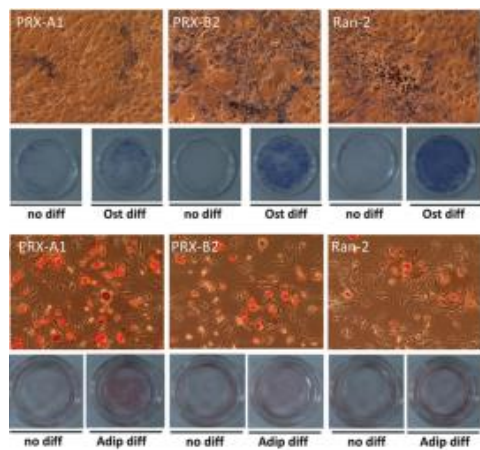


図4 骨芽細胞への分化4日目および脂肪細胞への分化4日目の分化細胞染色 (青: 骨芽細胞特異的なALP活性染色、赤: 脂肪細胞特異的なOil Red O染色)

したMSC内でのRhoA-ROCKの発現量が分化特性を制御する決定的な役割を担っていることを示唆した。分化特性をタンパク質レベルで解析するため、それぞれのマーカータンパク質の発現を免疫染色法にて確認した(図3)。その結果、遺伝子発現の傾向と同様に、Ran-2表面上で骨芽細胞のマーカータンパク質が核内に局在化し、RhoA-ROCKの発現が低いPRX-A1表面では、脂肪細胞のマーカータンパク質が顕著に核内局在化した。分化した細胞の機能を評価するため、それぞれ骨芽細胞および脂肪細胞へ分化した細胞のアルカリホスファターゼ(ALP)活性およびOil Red O染色を行った(図4)。その結果、遺伝子発現およびタンパク質発現結果と同様にRhoA-ROCKの発現の高いRan-2表面では高いALP活性度を示すとともに低いOil Red O染色性を示した。それに対し、RhoA-ROCKの発現が低いPRX-A1表面では低いALP活性度を示すとともに高いOil Red O染色性を示したことからポリマー材料表面に接着したMSCは、材料表面の分子運動性に影響を受けて分化特性を調節していることが示された。

#### (4) iPS細胞の心筋分化に与える影響

分子運動性の低いPRX表面上で培養したiPS細胞はRac1およびN-カドヘリンの遺伝子の発現が減少したが、分子運動性の高いPRX表面においてそれらは有意に上昇し、培養日数の経過に伴って拍動するコロニー数が増加した。すなわちPRX表面の分子運動性を調節することによって幹細胞の細胞骨格系シグナルを制御し得ることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

- ① J.H. Seo, M. Hirata, S. Kakinoki, T.

Yamaoka, N. Yui, Dynamic polyrotaxane-coated surface for effective differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes, RSC Adv. 6, 35668-35676, 2016, DOI: 10.1039/C6RA03967G, 査読有

- ② Ge, J.H. Seo, L. Qiao, N. Yui, S. Ye, Structural reorganization and fibrinogen adsorption behaviors on the polyrotaxane surfaces investigated by sum frequency generation spectroscopy, ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 22709-22718, 2015, DOI: 10.1021/acsami.5b07760, 査読有
- ③ J.H. Seo, Y. Tsutsumi, A. Kobari, M. Shimojo, T. Hanawa, N. Yui, Modulating friction behavior in water by changing the combination of the loop- and graft-type poly(ethylene glycol) surfaces, Soft Matter 11, 936-942, 2015, DOI: 10.1039/C4SM02082K, 査読有
- ④ J.H. Seo, S. Kakinoki, T. Yamaoka, N. Yui, Directing stem cell differentiation by changing the molecular mobility of supramolecular surfaces. Adv. Healthcare Mater. 4, 215-222, 2015, DOI: 10.1002/adhm.201400173
- ⑤ A. Tamura, H. Tanaka, N. Yui, Supramolecular flower micelle formation of polyrotaxane-containing triblock copolymers prepared from macro-chain transfer agent bearing molecular hooks. Polym. Chem. 5, 4511-4520, 2014 DOI: 10.1039/C4PY00379A

[学会発表] (計 15件)

- ① 由井伸彦、生体機能調節を目指したポリロタキサンの細胞内外からのアプローチ、ポリマーフロンティア21、東京工業大学蔵前会館(東京都・目黒区)、2016年4月21日
- ② 有坂慶紀、松井七生子、田村篤志、高垣智博、田上順次、由井伸彦、ポリロタキサンを基盤とした新規仮着材の合成、第67回日本歯科理工学会学術講演会、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)、2016年4月17日
- ③ 伏見麻由、徐知勲、松井七生子、有坂慶紀、田村篤志、高垣智博、田上順次、由井伸彦、光分解性ポリロタキサン架橋剤を用いた新規歯科用接着剤の開発、第25回インテリジェント材料・システムシンポジウム、東京女子医科大学先端生命医学研究所(東京都・新宿区)、2016年1月8日

- ④ N. Yui, J.H. Seo, T. Yamaoka, S. Kakinoki, Directing cellular functions via hydrated mobility of polyrotaxane surfaces, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), Hawaii(USA), Dec. 17th, 2015
- ⑤ 伏見麻由、徐知勳、由井伸彦、歯科用材料への応用を目指した光分解性ポリロタキサン架橋剤の合成と物性評価、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(北海道・札幌市)、2015年5月28日
- ⑥ 由井伸彦、動的ソフトマテリアル表面での細胞機能調節、生体医工学ワークショップ、東京工業大学精密工学研究所(東京都・目黒区)、2014年12月12日
- ⑦ 由井伸彦、超分子材料の動的特性を活かした細胞機能の調節、近畿化学協会機能性色素・エレクトロニクス部会東京地区合同講演会、化学会館(東京都・千代田区)、2014年12月1日
- ⑧ 徐知勳、柿木佐知朗、山岡哲二、由井伸彦、動的ポリロタキサン表面におけるMSCの分化特性評価、第36回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)、2014年11月18日
- ⑨ N. Yui, Supramolecular Biomaterials Exploit New Paradigm of Modulating Cellular Functions, 2014 Annual Meeting of the Korean Society for Biomaterials, Seoul(Korea), Nov. 6th, 2014
- ⑩ 由井伸彦、ポリロタキサンの動的骨格を活かした細胞機能の調節—新たな治療法を目指して—、第15回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都・目黒区)、2014年10月28日
- ⑪ N. Yui, Directing cell fate by surface molecular mobility of supramolecular biomaterials, JSPS A3 Foresight International Symposium on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine, Shinjuku(Tokyo), Oct. 8th, 2014
- ⑫ J.H. Seo, S. Kakinoki, T. Yamaoka, N. Yui, Regulation of mesenchymal stem cell differentiation by changing the molecular structure of supramolecular surfaces, 26th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, Liverpool(United Kingdom), Aug. 31th, 2014
- ⑬ 徐知勳、柿木佐知朗、山岡哲二、由井伸彦、分子運動性の異なるポリロタキサンの表面上における間葉系幹細胞の分化特性、第43回医用高分子シンポジウム、産業技術総合研究所 臨海副都心センタ

一(東京都・江東区)、2014年7月28日

- ⑭ N. Yui, Significance of supramolecular frames of CD- based polyrotaxanes as biomaterials: extracellular and intracellular approaches, 17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrucken (Germany), May 31th, 2014
- ⑮ 徐知勳、柿木佐知朗、山岡哲二、由井伸彦、ポリロタキサンの表面キャストによる間葉系幹細胞の分化制御、第63回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)、2014年5月28日

[図書] (計 1件)

- ① 有坂慶紀、由井伸彦、エヌティーエス、表面・界面技術ハンドブック、2016、621-627

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: ポリロタキサンプロック共重合体表面を有する培養器を用いた幹細胞の培養方法  
 発明者: 由井伸彦、徐 知勳、山岡哲二、柿木佐知朗、平田みつひ  
 権利者: 東京医科歯科大学、国立循環器病研究センター  
 種類: 方法特許  
 番号: 特願2015-142025  
 出願年月日: 2015年7月16日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/org/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

由井 伸彦 (YUI NOBUHIKO)  
 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授  
 研究者番号: 70182665

### (2) 研究分担者

田村 篤志 (TAMURA ATSUSHI)  
 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教  
 研究者番号: 80631150

有坂 慶紀 (ARISAKA YOSHINORI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
助教

研究者番号：70590115

2015 年から研究分担者として本研究に従事した。

徐 知勲 (SEO JI-HUN)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
助教

研究者番号：20611544

2013 年度から 2014 年度まで研究分担者として本研究に従事した。

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：