

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282118

研究課題名(和文) 細胞 材料界面と細胞膜表面の分子プロセス解析に基づく新しいバイオマテリアルの創成

研究課題名(英文) Development of biomaterials based on analysis of molecular processes at cell-material interfaces

研究代表者

林 智広 (HAYASHI, Tomohiro)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：30401574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞と人工材料の界面における分子プロセスを理解することで、その知見に基づいて生体適合性の物理的起源の、細胞応答が決定されるメカニズムの解明を目指した。その結果、抗タンパク吸着特性・抗細胞接着特性の発現にはバルクとは異なる構造、ダイナミクスをもつ界面の水分子が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、界面の水分子の影響が材料表面に形成されるタンパク質の層内のタンパク質の組成などを決定する主要要因である事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：By understanding the molecular process at the interface between cell and artificial material, we aimed to elucidate the mechanism underlying bioinertness and biocompatibility of materials. We found that the water molecules at the interface with the structure and dynamics different from bulk water are playing an important role in the expression of the anti-protein adsorption property and the anti-cell adhesion property.

研究分野：表面科学

キーワード：バイオインターフェース

1. 研究開始当初の背景

人工臓器、再生医療が今後の医療において重要な位置を占めることは確実である。血中細胞の変性・活性化を抑える、幹細胞のがん化を抑えつつ増殖を促進するなど、細胞と適切に相互作用し、細胞の挙動を精密に制御する機能が足場材料に求められている。細胞が材料に接触すると、細胞膜内の受容体タンパク質は足場材料(足場となるタンパク質も含む)、培養液中のイオン、タンパク質(サイトカイン、成長因子)等と相互作用し、細胞の挙動を決定するシグナル伝達が行われる。それ故、細胞と材料の相互作用・細胞の挙動の精密制御のために、細胞膜における分子プロセスの理解の深化が求められていた。

2. 研究の目的

細胞接着斑における足場タンパク質の量・構造変化の時間発展と細胞接着後の細胞の挙動との相関の解析

接着性細胞(血管内皮細胞、繊維芽細胞など)が材料表面に吸着した際に、プリコンディショニングによる材料表面への血清タンパク質吸着から細胞接着後の細胞自身による足場タンパク質の生成の一連のプロセスにおいて、これらの細胞-材料界面のタンパク質の量・2次構造の変化を追跡し、細胞の接着密度・接着後の挙動との相関を明確にする。

細胞接着後の細胞膜上(培養液との界面)における膜タンパク質の分布の解析と局所的力学特性の解析

細胞膜中での脂質分子、膜タンパク質(イオンチャネル、接着タンパク質)の分布、膜の力学特性(硬さ、柔軟性)を20 nm以下の空間分解能で分析する。これらの局所物性・分布と細胞の接着形態との相関、さらに培養液中のサイトカイン(成長因子、分化誘導剤など)などに対する感受性との相関について調べる。ここでは得られる知見と組み合わせ、足場材料、培養液という2つの環境因子により、細胞の挙動がどのように決定されるかを精密に議論するための知見を得る。

がん細胞と通常細胞の違いについて、得られる知見から議論し、がん細胞を識別・選別するための足場材料の設計指針を提示

及びの解析をがん細胞に対して行い、従来に無いナノスケールの多次元パラメータから、通常細胞とがん細胞の相違点について明らかにする。特にがん細胞の細胞膜内の受容体タンパク質をターゲットとしたペプチド、タンパク質、糖などを用いたラベリングに頼らない、がん細胞の特性を積極的に利用した、がん細胞の効率的な選別・除去を可能とする足場材料を提案する。

3. 研究の方法

平成26年度 材料-細胞及び細胞膜-培養液界面という2つの界面における分子プロセス、ナノスケールの分解能での細胞膜上の膜タンパク質の分布、局所的力学特性、水和構造を同時に解析する手法の開発を行った。

平成27年度 モデル有機物表面と接着性細胞(血管内皮細胞、繊維芽細胞)を用いた材料-細胞及び細胞膜-培養液界面の分子プロセスの解析を行った。平成28年度 界面の分子プロセス、細胞膜の局所的力学特性・水和構造という視点から、通常細胞とがん細胞の相違点について検討し、再生医療における、がん化した細胞の識別・選別可能な足場材料の設計指針について提案した。

4. 研究成果

以下に2つの主な成果について述べる。

細胞・生体組織の初期応答には吸着タンパク質層が重要な役割を果たしており、巨視的な生体適合性にも深く関わっている。しかし、タンパク質層を形成するタンパク質の構造、組成などを包括的に解析した研究はない。我々は独自の組成分析手法を用いて、血清中から人工材料表面に吸着したタンパク質の組成を定量的に分析した。さらに、血清タンパク質の吸着後の構造変化の分析と組み合わせ、接着細胞の初期応答との相関を見出した。

物体間のナノメートルスケール空間に挟み込まれた水は、生体物質の付着、物体同士の摩擦などの現象に影響を与える特異的な性質を持つことが知られている。本研究では、独自に開発した光熱励振機構を組み込んだ振幅変調型原子間力顕微鏡を用い、水中で探針を振動させながら試料表面に接近させた時の振幅・位相変化を観察した。発表では、探針・試料表面の物理化学的性質を変化させた時の、水の動力学的応答の違いについて議論した。

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14件)

1. Sekine, T., Asatyas, S., Sato, C., Morita, S., Tanaka, M., Hayashi, T.: "Surface force and vibrational spectroscopic analyses of interfacial water molecules in the vicinity of methoxy-tri(ethylene glycol)-terminated monolayers: mechanisms underlying the

effect of lateral packing density on bioinertness", *J Biomater Sci Polym Ed*, 1-13, (2017) (査読あり)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28278040>

2. Hara, K., Yano, T., Suzuki, K., Hirayama, M., Hayashi, T., Kanno, R., Hara, M.: "Raman imaging analysis of local crystal structures in LiCoO₂ thin films calcined at different temperature", *Anal. Sci.*, (2017) (査読あり)

3. Han, M.-S., Ku, K., Kang, H., Ohashi, R., Hayashi, T., Hara, M., Noh, J.: "Formation and Structural Changes of 4-Fluorobenzenethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111)", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17: 5597-5600, (2017) (査読あり)

4. Han, M.-S., Ku, K., Kang, H., Ohashi, R., Hayashi, T., Hara, M., Noh, J.: "Standing-Up Phase of Hexanedithiol Self-Assembled Monolayers on Au(111) Induced by Displacement Reaction", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17: 5780-5783, (2017) (査読あり)

5. Yano, T.-a., Tsuchimoto, Y., Mochizuki, M., Hayashi, T., Hara, M.: "Laser-scanning-assisted tip-enhanced optical microscopy for robust optical nano-spectroscopy", *Appl. Spectrosc.*, 70: 1239-1243, (2016) (査読あり)

6. Tsuchimoto, Y., Yano, T. A., Hayashi, T., Hara, M.: "Fano resonant all-dielectric core/shell nanoparticles with ultrahigh scattering directionality in the visible region", *Opt Express*, 24: 14451-14462, (2016) (査読あり)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27410598>

7. Mochizuki, M., Asatyas, S., Suthiwanich, K., Hayashi, T.: "Thiol Molecules as Temperature Sensors for Surface-enhanced Raman Scattering Measurements of Heat-sensitive Materials", *Chem. Lett.*, 45: 1207-1209, (2016) (査読あり)
<Go to ISI>://WOS:000384945500021

8. Kim, Y., Kang, H., Tsunoi, A., Hayashi, T., Hara, M., Noh, J.: "Striped Phase of 3-Hexylthiophene Self-Assembled Monolayers on Au(111) from Vapor Phase Deposition", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 16: 2792-2795, (2016) (査読あり)

9. Kim, S. O., Jackman, J. A., Mochizuki, M., Yoon, B. K., Hayashi, T., Cho, N. J.: "Correlating single-molecule and

ensemble-average measurements of peptide adsorption onto different inorganic materials", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18: 14454-14459, (2016) (査読あり)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174015>

10. Kang, H., Ito, E., Hayashi, T., Hara, M., Noh, J.: "Effect of Solution Concentration on the Formation of Ordered Domains in Pentachlorobenzenethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111)", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 16: 6360-6363, (2016) (査読あり)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27427718>

11. Kanayama, N., Sekine, T., Ozasa, K., Kishi, S., Nyu, T., Hayashi, T., Maeda, M.: "Terminal-Specific Interaction between Double-Stranded DNA Layers: Colloidal Dispersion Behavior and Surface Force", *Langmuir*, 32: 13296-13304, (2016) (査読あり)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27951695>

12. Jeong, H., Kang, H., Han, S., Park, H., Han, J., Hayashi, T., Hara, M., Noh, J.: "Comparative Study for Displacement of Cyclohexanethiolate and Cyclohexaneselenolate Self-Assembled Monolayers on Au(111) by Octanethiols", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 16: 8508-8512, (2016) (査読あり)
<Go to ISI>://WOS:000387083900111

13. Han, S., Kang, H., Park, J. B., Hayashi, T., Hara, M., Noh, J.: "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers by Adsorption of Octaneselenocyanate on Au(111)", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 16: 8610-8613, (2016) (査読あり)
<Go to ISI>://WOS:000387083900131

14. Ganbaatar, N., Matsuzaki, N., Nakazawa, Y., Afrin, R., Aono, M., Yano, T.-a., Hayashi, T., Hara, M.: "Surface Force Analysis of Pyrite (FeS₂): Its Reactivity to Amino Acid Adsorption", *Advances in Materials Physics and Chemistry*, 06: 167-176, (2016) (査読あり)

[学会発表](計9件) 全て招待講演

1. 林智広: "マテリアルズ・インフォマティクスによる生体材料表面設計", 表面科学セミナー2017 物質・材料開発の新潮流 - マテリアルズ・インフォマティクスの最前線 -, 東京理科大学 (2017年2月10日).

2. 林智広: "プローブ顕微鏡・近接場光学を用いたバイオ界面の解析", 新世代光源で切り拓く物質科学と生命科学の融合領域(短期セミナー), 東京大学 物性研究所 (2017年3

月7日).

3. 丹生隆, 前川達洋, Kasinan, S., 林智広: "振幅変調型原子間力顕微鏡を用いた分子認識サイトの高速ナノスケールイメージング", 第64回応用物理学会春期学術講演会, パシフィコ横浜 (2017年3月18日).

4. 林智広: "階層的バイオ界面における分子プロセスの解析: 細胞応答決定のメカニズムの理解から制御へ", 公益社団法人日本セラミックス協会 第3回 ナノバイオセラミクスによる細胞機能制御テクノロジー研究会, まちなかキャンパス長岡 (2016年12月8日).

5. 林智広: "生体分子・細胞の応答を決定する界面の水分子", 日本表面科学会関東支部 第5回関東支部セミナー 「表面・界面の水が拓くものづくりの未来」, 東京大学理学部化学本館 (2016年11月26日).

6. 林智広: "走査型プローブ顕微鏡を用いた表面・界面の制御・評価", 応用物理学会 有機ナノ界面制御素子(NICE)研究会, 新潟大学 駅南キャンパス「ときめいと」 (2016年9月12日).

7. Nyu, T., Maekawa, T., Suthivanich, K., Hayashi, T.: "Molecular recognition imaging at nanoscales", 12th International Conference on Nano-Molecular Electronics (ICNME 2016), 神戸国際会議場 (2016年12月14日).

8. Hayashi, T.: "On-chip proteomic analysis: investigation of scaffold proteins and correlation with cell behavior", 第26回日本MRS年次大会, 横浜文化会館 (2016年12/20).

9. Hayashi, T.: "Correlation between Physicochemical Properties of Self-Assembled Monolayers and Protein Adsorption Analyzed with Artificial Neural Network", 第26回日本MRS年次大会, 横浜文化会館 (2016年12/19).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ; <http://lab.spm.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 智広 (HAYASHI, Tomohiro)

東京工業大学 物質理工学院 材料系 准教授

研究者番号: 30401574

(2) 研究分担者

原 正彦 (HARA, Masahiko)

東京工業大学 物質理工学院 応用化学系 教授

研究者番号: 50181003

(3) 連携研究者

田中 賢 (TANAKA, Masaru)

九州大学先導物質化学研究所 教授

研究者番号: 00322850

森田 成昭 (MORITA, Shigeaki)

大阪電気通信大学 工学部 教授

研究者番号: 20388739

(4) 研究協力者

()