

細胞-基材接着界面における高分子の役割に着目した 細胞接着制御とその応用

政池, 彩雅

<https://hdl.handle.net/2324/6787564>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

細胞-基材接着界面における高分子の役割に着目した
細胞接着制御とその応用

九州大学大学院工学府物質創造工学専攻

政池彩雅

第1章 序論

| | | |
|-------|------------------------|------|
| 1.1 | 細胞接着と細胞機能 | p. 1 |
| 1.2 | バイオマテリアル表面での細胞接着制御 | p. 1 |
| 1.2.1 | 細胞接着リガンドの表面修飾 | p. 1 |
| 1.2.2 | インテグリンのクラスター化と焦点接着斑の形成 | p. 3 |
| 1.2.3 | 表面の力学特性 | p. 4 |
| 1.2.4 | 細胞表面の酸性度 | p. 6 |
| 1.2.5 | 糖衣の圧縮効果 | p. 7 |
| 1.3 | 細胞接着制御における課題 | p. 8 |
| 1.4 | 目的と概要 | p. 9 |

第2章 疎水性凝縮層の水平変形効果

| | | |
|-------|----------------------|-------|
| 2.1 | 概要 | p. 10 |
| 2.2 | PNIPAAm グラフト基材の作製 | p. 10 |
| 2.2.1 | 試薬および材料 | p. 10 |
| 2.2.2 | 基材作製方法 | p. 11 |
| 2.3 | PNIPAAm グラフト基材の評価方法 | p. 12 |
| 2.3.1 | X線光電子分光法 | p. 12 |
| 2.3.2 | 原子間力顕微鏡法によるフォースカーブ測定 | p. 13 |
| 2.3.3 | 細胞培養 | p. 14 |
| 2.3.4 | PNIPAAm 表面上での免疫染色 | p. 14 |
| 2.3.5 | 細胞接着面積および接着斑サイズの定量 | p. 14 |
| 2.3.6 | 静的接触角測定 | p. 15 |
| 2.3.7 | フィブロネクチンの蛍光標識 | p. 15 |
| 2.3.8 | 全反射蛍光顕微鏡法 | p. 16 |
| 2.3.9 | 水平力顕微鏡法による水平変形能評価 | p. 17 |
| 2.4 | 結果 | p. 18 |
| 2.4.1 | 作製基材表面の元素分析 | p. 18 |
| 2.4.2 | PNIPAAm グラフト層の圧縮厚測定 | p. 19 |
| 2.4.3 | PNIPAAm 表面への細胞接着性評価 | p. 20 |

目次

| | | |
|-----------------------------------|------------------------------|-------|
| 2.4.4 | PNIPAAm グラフト表面へのタンパク吸着特性評価 | p. 21 |
| 2.4.5 | PNIPAAm グラフト表面の水平変形評価 | p. 22 |
| 2.5 | 考察 | p. 25 |
| 2.6 | 結言 | p. 27 |
| | | |
| 第3章 細胞-基材接着界面の局所 pH 分布の可視化 | | |
| 3.1 | 概要 | p. 29 |
| 3.2 | pH プローブ修飾基材の作製 | p. 30 |
| 3.2.1 | 試薬および材料 | p. 30 |
| 3.2.2 | 基材作製方法 | p. 30 |
| 3.3 | pH プローブ修飾基材の表面分析 | p. 31 |
| 3.3.1 | 分析方法 | p. 31 |
| 3.3.2 | APTMS 修飾ガラスの表面分析 | p. 31 |
| 3.3.3 | FITC 修飾表面の特性評価 | p. 33 |
| 3.4 | 細胞-基材接着界面での pH 評価 | p. 34 |
| 3.4.1 | 細胞培養 | p. 34 |
| 3.4.2 | 免疫染色 | p. 34 |
| 3.4.3 | 顕微鏡観察および画像解析 | p. 34 |
| 3.4.4 | 結果 | p. 35 |
| 3.5 | 考察 | p. 39 |
| 3.6 | 結言 | p. 41 |
| | | |
| 第4章 細胞接着形態制御材料の応用可能性 | | |
| 4.1 | 概要 | p. 42 |
| 4.2 | 細胞の接着形態制御による形質保持への応用 | p. 43 |
| 4.2.1 | 背景および目的 | p. 43 |
| 4.2.2 | PNIPAAm グラフト表面への細胞接着の温度依存性評価 | p. 44 |
| 4.2.3 | YAP の細胞内局在評価 | p. 46 |
| 4.2.4 | 結論 | p. 48 |
| 4.3 | 細胞の接着形態制御による細胞周期制御 | p. 49 |

目次

| | | |
|--------|---------------------------|-------|
| 4.3.1 | 背景および目的 | p. 49 |
| 4.3.2 | PNIPAAm 表面での細胞接着と細胞周期の可視化 | p. 50 |
| 4.3.3 | 考察 | p. 51 |
| 4.4 | 結語 | p. 52 |
| 第5章 総括 | | p. 54 |
| 参考文献 | | p. 57 |
| 論文目録 | | p. 63 |
| 謝辞 | | p. 64 |

略語一覽

略語一覽

AFM : atomic force microscopy

APTMS : 3-aminopropyl trimethoxysilane

BSA : bovine serum albumin

CMPS : 4-(chloromethyl)phenyltrichlorosilane

DDTC : N,N-diethyldithiocarbamate

DGP : degree of graft-polymerization

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

ECM : extracellular matrix

FA : focal adhesion

FAK : focal adhesion kinase

FBS : fetal bovine serum

FITC : fluorescein isothiocyanate

FN : fibronectin

LCST : lower critical solution temperature

LFM : lateral force microscopy

MSC : mesenchymal stem cell

NIPAAm : N-isopropylacrylamide

NHE1 : Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1

PAAm : polyacrylamide

PB : phosphate buffer

PBS : phosphate-buffered saline

PEG : polyethylene glycol

PFA : paraformaldehyde

PNIPAAm : poly(N-isopropylacrylamide)

TIRF : total internal reflection fluorescence microscopy

XPS : X-ray photoelectron spectroscopy

YAP : Yes-associated protein

第1章 序論

1.1 細胞接着と細胞機能

生体組織内の細胞の多くは細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) に囲まれており、そこへ接着することで様々な機能を発現し組織の恒常性を維持している¹。これまで、細胞の接着状態という物理的な状態が、細胞の生存や増殖、運動性など生化学的な状態に寄与すると明らかにされてきた。細胞が良好な接着性を示す場合、接着面積を増大させた伸展型形状をとり、増殖が促進され^{2,3}、細胞運動性が低下する⁴。一方、細胞の接着・伸展を抑制すると、細胞運動性は向上するが、DNA合成量が減ってアポトーシスが誘導される^{2,4}。また細胞分化も接着状態に影響を受け、接着・伸展させると骨分化系統への分化が進み⁵⁻⁷、接着を抑制すると脂肪分化系統への分化が進む^{7,8}。

1.2 バイオマテリアル表面での細胞接着制御

1.2.1 細胞接着リガンドの表面修飾

バイオマテリアルの設計において目的の細胞機能を実現し活用するには、細胞の接着制御が重要な課題のひとつとなる。細胞-基材間接着は、細胞膜上のインテグリンに代表されるレセプターと基材側の細胞接着リガンドとの結合を介して行われる。代表的な細胞接着リガンドとしてフィブロネクチンやビトロネクチンがあり⁹、これらのタンパク質は動物血清中に含まれる。そのため、血清添加培地を用いた細胞培養では、培地中のタンパク質の表面吸着量で細胞接着・伸展の程度を制御することができる。例えばタンパク質吸着は表面の水和特性によって調節可能で、親水性表面には界面の水和層のためタンパク質が吸着しにくく細胞接着が抑制されるが、疎水性表面ではエントロピー損失最小化のために水分子がタンパク質と置き換わり細胞接着に有利となる。この応用例として温度応答性高分子 poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)の修飾表面による細胞接着制御が挙げられる。PNIPAAmは約32°Cに下限臨界溶液温度 (lower critical solution temperature; LCST) を有し、LCSTより低温側では親水性、高温側では疎水性の表面状態をとる¹⁰。岡野らはPNIPAAmの温度応答的な表面水和特性の変化を利用し、37°Cで細胞培養したのちLCST以下まで温度を下げて細胞を回収する方法を提案した¹¹。この手法は従来のトリプシンなどのタンパク質分解酵素を必要とせ

ず、細胞膜に損傷を与えない。細胞-細胞間接着も維持できることから、コンフルエントまで増やした細胞をシート状に回収して移植する再生医療への展開も活発に進められている^{12,13}。

このように、表面全体に対するタンパク質吸着量を介した細胞接着制御が成果を上げている一方で、細胞接着リガンドの空間分布も重要であることがわかってきた。LehnertらはマイクロコンタクトプリンティングによってECM分子修飾領域の規則的なドットパターンを作製し、細胞接着・伸展に必要な幾何学的条件を調査した¹⁴。この研究では、細胞の接着・伸展には“5 μm 間隔で配置された 0.25 μm² 以上の細胞接着領域”が必要であり、特に“ECM分子の表面被覆率が15%を超えると最適な細胞伸展を達成する”ことを明らかにした。さらにArnoldらは分子スケールでの細胞接着要件を特定するべく、多くのECM分子に共通する細胞接着活性アミノ酸配列RGDを修飾した金ナノ粒子のナノパターンニングを行なった¹⁵。ここでは直径8 nm以下の金ナノ粒子を用いており、細胞膜上のインテグリン頭部は約10 nmである¹⁶⁻¹⁸ため、細胞接着ドットとインテグリンレセプターは一対一対応となる。細胞接着ドットが規則的に配置されている場合、ドット間隔が約60 nm以下では良好な細胞接着性を示したが、約70 nm以上では細胞接着が抑制された (Figure 1.1(左))。Huangらはこの細胞接着ドットの平均間隔が70 nm以上であっても配置が不規則、つまり部分的にドット間距離が70 nm以下の領域が存在する場合、細胞接着性が向上することを示した (Figure 1.1(中央))¹⁹。これらの知見はインテグリンが60 nm以下の間隔でクラスター化する必要性を意味してい

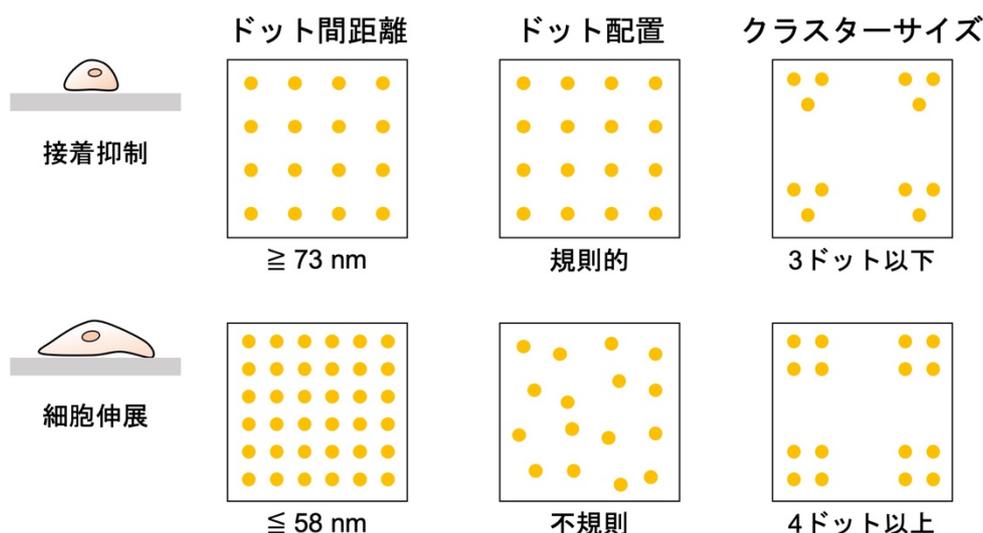


Figure 1.1 基材表面の RGD ナノドットのパターンと細胞接着. 規則配列 RGD の場合、ドット間距離が約 70 nm 以上で細胞接着が抑制される¹⁵。一方、平均ドット間距離が 100 nm であってもその配置が不規則な場合は細胞伸展が可能だった¹⁹。約 60 nm 以下の間隔で最低 4 つの RGD が配列していれば細胞伸展が可能であることが特定された²⁰。

る。そこで Schwartzman らは RGD リガンドのナノクラスターを設計し、細胞接着に必要な最小限の条件が“少なくとも 4 つのリガンドが約 60 nm 以下の間隔でクラスター化していること”であることを明らかにした (Figure 1.1(右))²⁰。

1.2.2 インテグリンのクラスター化と焦点接着斑の形成

細胞接着に必要なリガンドの空間分布の必要条件は、細胞の焦点接着斑 (以下、接着斑; focal adhesion; FA) とその内部構造からも説明可能である (Figure 1.2)。先にも述べた通り、インテグリンは細胞と細胞外部のリガンドを連結する細胞膜上の分子 (膜貫通型タンパク質) である。このインテグリンに対して細胞膜の内側ではタリンやビンキュリンなどといった複数のタンパク質が集合し、さらにこれが追加のインテグリンを動員させ、接着斑と呼ばれる数 μm 程度の複合体を形成する²¹。細胞は細胞膜全面ではなく、接着斑を介して局所的に基質へ結合しているため、この接着斑の数や大きさ、構造安定性が細胞接着の程度を決定することになる。したがって、細胞の接着・伸展には表面全体をリガンドで覆う必要はなく、しかし接着斑構成分子が互いに連結できるよう近接したインテグリン結合リガンドのクラスター化が必要といえる。実際、クライオ電子線トモグラフィーによって接着斑の内部構造の詳細が明らかにされており、接着斑中心部における接着関連粒子 (ただしクライオ電子線トモグラフィー法自体の高分子複合体の正確な同定における課題からインテグリンだと断定できない) はおよそ 40~70 nm 間隔で分布していた²²。また、この間隔はインテグリンとアクチンとをつなぐタリンの大きさともほぼ一致する^{23,24}。

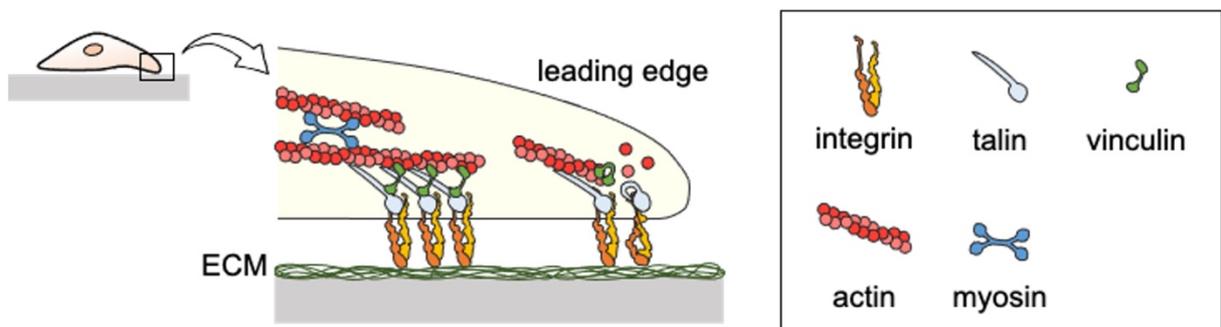


Figure 1.2 細胞接着の模式図.

1.2.3 表面の力学特性

ここまで、基材表面に提示されるリガンドの量やその空間分布が細胞接着に影響することを述べた。これに加えて表面の力学特性も細胞接着を操作し得ることが数多く報告されている。初期の研究は Pelham と Wang によるもので、硬さが異なる polyacrylamide (PAAm) ゲル上での細胞の運動性と接着状態の変化が報告された²⁵。ゲルの硬さは架橋剤濃度のみで調節され、表面は I 型コラーゲンで化学修飾された。この研究では細胞接着界面の化学的条件が同じであるにもかかわらず表面弾性率が高いほど細胞接着面積が増大し、接着斑タンパク質である FAK (focal adhesion kinase) やパキシリンのリン酸化レベルも増大することを示した。さらに細胞は硬さの異なる 2 領域の境界に到達するとより硬い領域へと移動する現象も見出された²⁶。以上の現象は、細胞が周辺の硬さを的確に認識し、自身のふるまいを適応させているようである。

通常、硬さは外部から力を加えた際に発生する抵抗の大きさから知覚される。細胞も周辺環境との接触部位において負荷をかけ、それに対する抵抗から力学環境を認識していると考えられる。ここで細胞-基材間を連結しているのは接着斑であり、さらに接着斑は細胞内部でアクチン繊維と接続している。アクチン繊維は常に細胞辺縁から中心に向かって流動するため、この引張力が力の発生源である²⁷。では、アクチンの引張力に対する抵抗の感知であるが、これは基材側の変形速度と接着斑の結合安定性が重要な役割を担う (Figure 1.3)^{28,29}。基材が硬いと表面は変形しづらく、アクチンの引張力が負荷されても接着リガンド-インテグリンレセプター対は移動しにくい。このとき、アクチンとインテグリンをつなぐ接着斑分子であるタリンは両端を引っ張られることになり、コンフォメーション変化を生じる (Figure 1.3(a))。そうするとほかの接着斑分子との結合サイトが露出してビンキュリンなどのタンパク質が結合する (Figure 1.3(b))^{30,31}。これに伴い周辺の接着斑タンパク質やアクチンとの結合が増強されるため接着斑が成熟し、細胞の接着・伸張が促進される (Figure 1.3(c))。また、インテグリンも約 30 pN 以下の力が負荷されると結合寿命が伸びるため、アクチンの引張力由来の適度な負荷はインテグリンのクラスター化も促進する³²。一方、基材が軟らかく変形しやすいとアクチンの後退流とともに接着リガンド-インテグリンレセプター対が水平移動してしまうため、タリンの構造変化が起きず、接着斑分子が集合する前にインテグリンの結合寿命が切れ、細胞接着が不安定化する (Figure 1.3(d-f))³³。

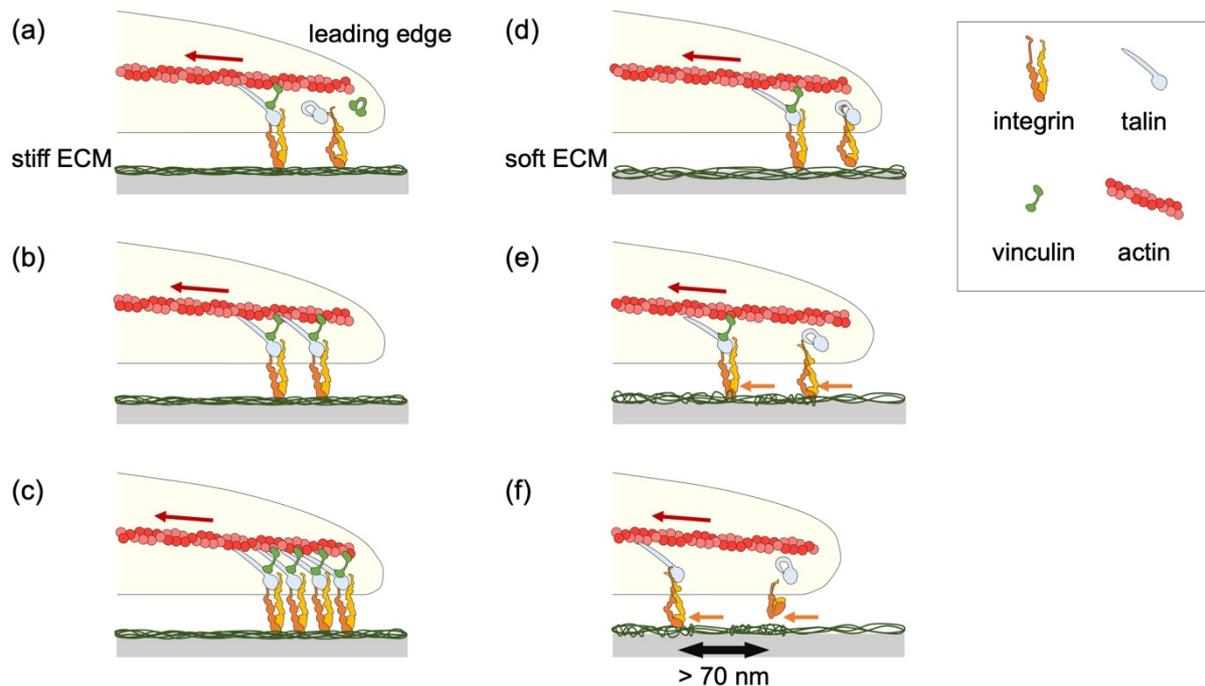


Figure 1.3 表面の力学特性と細胞接着. (a-c)硬い ECM 上. タリンの構造変化やビンキュリンの結合が速やかに行われ、接着斑が成熟し、細胞が伸展する. (d-f)軟らかい ECM 上. タリンへの適度な負荷がかからず、接着斑の形成前にインテグリンの結合寿命が切れ、細胞の接着と伸展が抑制される.

以上の理論は分子クラッチモデルと呼ばれ、PAAm や polyethylene glycol (PEG)、アルギン酸などの膨潤したハイドロゲルを用いて整理されてきた。そのほか、水溶性グラフトポリマーを応用した固体表面でも接着リガンド-インテグリンレセプター対の水平移動効果が示されている。高分子鎖の一端が固体表面に固定され、もう一端に細胞接着リガンドが修飾された系では、リガンドの可動域が高分子鎖長に制限される。Kuhlman らは 6.5 nm および 14.3 nm の高分子鎖長を有する PEG のグラフト表面を作製し、平均間隔 20 nm となるよう PEG 末端に RGD 修飾を施した³⁴。最終的な細胞接着面積はどちらも同じであったが、14.3 nm-PEG 表面の方がより速く細胞伸展を開始した。このとき平均 RGD 間距離が 14.3 nm-PEG 表面では 15.6 ± 1.4 nm、6.5 nm-PEG 表面では 17.5 ± 1.3 nm にシフトしており、接着リガンドの可動性の差が細胞接着速度に影響することを明らかにした。Attwood らは 9.5 nm、38.2 nm、318 nm の PEG グラフト表面を用いて細胞接着への効果を調査した³⁵。Kuhlman らよりも可動域の大きな Attwood らの系では、高分子鎖長が長いほど細胞接着数と伸展面積の減少が確認された。彼らはこの結果をもとに、これまでゲルの硬さで議論されてきた表面変形性の効果をより単純な高分子鎖の引き伸ばし効果でモデル化できると提案している。

1.2.4 細胞表面の酸性度

その他、周辺環境のプロトン濃度も細胞の接着性に関与する。細胞内外の pH 調整を担う Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 は接着細胞の辺縁に局在しており、接着斑タンパク質との共局在が確認されている (Figure 1.4(a))³⁶。そして、インテグリンが接着リガンドを認識しクラスター化すると NHE1 が活性化し³⁷、NHE1 の活性化は接着斑タンパク質のリン酸化レベルを増大させて接着斑の成熟と細胞の接着・伸展を誘導する³⁸。メラノーマを用いた実験では細胞外 pH が細胞接着とその運動性を調節³⁹し、NHE1 の活性が細胞の進行方向に沿って pH 勾配を生じる⁴⁰ことが実証された。さらに細胞外 pH の低下はインテグリンを接着リガンドに対して高親和性のコンフォメーションへ変化させるという分子動力学シミュレーションモデルも提案された⁴¹。αvβ3 インテグリン発現 CHO-B2 細胞や微小血管内皮細胞を用いた実験では細胞外液に pH 勾配があると酸性側で優先的にインテグリンが活性化し、酸性度の高い方へ向かう指向性運動が示された⁴²。

細胞膜を覆う糖衣もインテグリンへのプロトンの供給源となり得る(Figure 1.4(b))。多数のカルボキシ基や硫酸基を有する糖鎖は生理的条件下で負電荷を帯びており、周辺に対イオンを纏う。そのため糖衣の内部にはバルクと比べて大量のプロトンが蓄えられている。このプロトンは熱運動のために拡散構造をとり、糖鎖に近いほど多く分布し、細胞膜近傍ほど高濃度である⁴³。

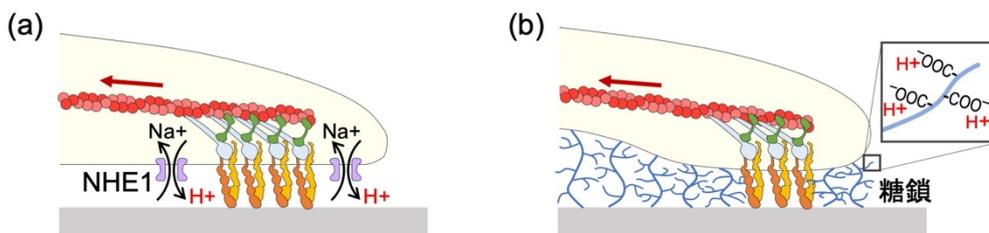


Figure 1.4 細胞前縁部と細胞外の酸性化. (a)NHE1 は接着斑近傍に局在し、プロトンを放出する. (b)ポリアニオンである糖鎖はプロトンを静電的に引き寄せる. 豊富に集められたプロトンは周辺 pH を局所的に低下させる.

1.2.5 糖衣の圧縮効果

細胞膜上のインテグリンの大きさは ~ 20 nm 程度¹⁶⁻¹⁸ しかなく、これに対して糖衣は数十～数百 nm の厚みを有する⁴⁴⁻⁴⁶。したがって、インテグリン-基質間結合形成のためには周辺の糖衣を圧縮する必要が生じる(Figure 1.5)。高密度化したポリアニオンの負電荷を遮蔽するにはより多くの対イオンを要し、プロトン濃度の局所的な増大につながる。インテグリンは周辺のプロトン濃度上昇によって活性化・リガンドとの高親和性を示す⁴¹ ことから、糖衣の圧縮率も細胞接着に影響する可能性が高い。

近年の研究では、糖衣の圧縮は力学的な観点でも細胞接着に寄与することが明らかになってきた。インテグリン-基質間結合が形成される際、インテグリンが糖衣を超えて表面に到達する必要から、周辺の糖衣を圧縮すると同時に細胞膜を変形させる(Figure 1.5)。このとき糖衣に対する圧縮力と高密度化した糖鎖間での立体反発により、嵩高い糖タンパク質は細胞膜が圧縮変形を受けていない領域へ逃げようと水平移動を開始する。細胞膜上を拡散していた非結合のインテグリンがこの領域に差し掛かると、嵩高い糖タンパク質と入れ替わって次第にクラスター化していく^{47,48}。この領域では細胞膜が局所的に表面へ接近していることからインテグリン-基質間の結合確率が増大しており、接着斑の形成と成熟が促進される。また、一度結合が解離しても周辺を取り囲む嵩高い糖鎖から領域外への拡散が制限される。このような空間的拘束は糖衣が厚いほどその効果を強く発揮することが計算モデルから予測され⁴⁷、実際に糖衣の厚さを調節した細胞の接着実験にてインテグリンのクラスター化とそれに続く接着斑の成熟の促進が確認された^{49,50}。

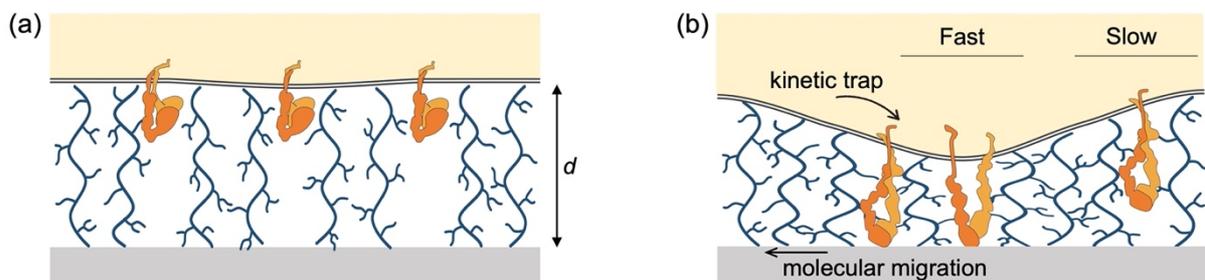


Figure 1.5 糖衣とインテグリンの kinetic trap モデル. (a) d が数十 nm 以上の嵩高い糖衣に覆われている場合、インテグリンの表面への到達が阻害される. (b) インテグリン-基質間結合の周辺では糖衣の圧縮と細胞膜の変形が生じる. 糖鎖の高密度化とそれに伴う立体反発により嵩高い糖タンパク質とインテグリンの位置が入れ替わる. 細胞膜-基材表面間距離 d の縮小はインテグリンの結合確率を高め、インテグリンのクラスター化を促す.

1.3 細胞接着制御における課題

ここまでに挙げた細胞接着制御のメカニズムとその概要を以下にまとめる。

- (i) 細胞接着・伸展には細胞接着リガンド-レセプター対の形成が必要である。代表的なリガンドは細胞接着活性配列 RGD やそれを含む ECM タンパク質、レセプターは主にインテグリンである。
- (ii) 細胞接着リガンド-レセプター対には最適なクラスター密度が存在する。その密度はリガンド-レセプター対の変位が生じない静的環境下で調査された。
- (iii) 材料表面の変形性が接着斑形成と細胞接着に影響する。主に硬さの定義された水溶性高分子表面を用いて議論されている。
- (iv) 細胞表面の酸性化がインテグリンの活性化とクラスター化を促進する。酸性度の調節因子としてイオン輸送体 NHE1 や細胞膜上の糖鎖が調べられている。
- (v) インテグリン結合近傍では細胞膜上の糖衣の圧縮と細胞膜の変形が生じ、これがインテグリンに空間的な拘束を与えてクラスター化を促進する。

細胞接着リガンドの有無で細胞接着の ON/OFF のみを調節する設計は最もシンプルである。PNIPAAm グラフト表面の温度応答性を利用して細胞接着の ON/OFF を切り替える系は臨床現場にまで広く適用され、成功を収めている¹¹⁻¹³。しかし、PNIPAAm の分子量が大きく高密度の場合には LCST 以上で表面に十分な吸着タンパク質が存在していても細胞接着が抑制され⁵¹⁻⁵³、細胞接着リガンドの量のみでは説明ができない。PNIPAAm グラフト表面における細胞接着は、従来議論されてきたタンパク質の吸着量 (上記 i, ii) とは別の操作変数が機能していると考えられる。そこでタンパク質の吸着量とは独立して表面力学特性の効果 (iii) を調べる必要がある。

細胞の力学感知を利用した表面設計は細胞の硬さ指向性運動や幹細胞の分化制御などを達成しているがそのほとんどが水溶性膨潤層を用いており、疎水性凝縮層における表面力学と細胞接着の関係は明らかとされていない。実用的なバイオマテリアルの設計において含水材料は長期保管安定性の課題があり、また親水性表面は細胞接着のために細胞接着性配列の修飾を要することからこれも長期保管の課題となる。したがって、疎水性凝縮表面の力学と細胞接着の関係を解明し、表面水和特性によらず一般化された細胞力学感知モデルを提供することは、バイオマテリアルの設計自由度を向上させる。37°C での PNIPAAm グラフト表面の力学特性調査は、このような観点でも意義深い課題である。

細胞外環境の酸性度も細胞接着に影響するが、細胞-基材接着界面における正確な局所 pH 分布は未だわかっていない。これまでに細胞膜や糖鎖への pH プローブの導入が検討された⁴⁰が、細胞膜は不均一なドメイン構造を有する⁵⁴ため、細胞表面を均一に標識し pH の空間情報を得るのは困難である。また、細胞膜近傍へのプローブの導入はプローブ自体の立体障害を考慮する必要のほか、細胞膜上での拡散運動の変化など、目的とする現象への影響が懸念される。特にインテグリン-基材間結合領域近傍ではプロトン濃度の上昇が予想されるためその可視化が望まれるが、インテグリンの大きさは 20 nm 以下であり、さらにインテグリンの集合とその密度が細胞接着の重要なパラメーターであることから、立体障害と拡散運動性の変化は無視できない。pH 可視化の課題を克服し、細胞-基材接着における pH 効果の理解が進めば、新たなバイオマテリアルの設計と細胞操作の変数として活用できるようになるかもしれない。

近年、細胞膜を覆う糖衣の厚さとその力学も接着斑形成に重要な役割を果たすことが提案されている。糖衣に CFP/YFP の FRET センサーを組み込んだ細胞実験では、接着斑形成領域でより高度な糖鎖の圧縮が確認された⁴⁹。さらに細胞膜上の特定の糖鎖を酵素処理するとインテグリン-RGD 結合形成速度とその強度が変動し、細胞接着に対する糖衣の厚さの重要性が示された⁵⁰。この理論は比較的新しいほか、ナノ界面の可視化には高度な顕微鏡技術を要することもあり、観察事例は非常に少ない。ここで、ポリアニオンから構成される糖衣は対イオンとして大量のプロトンを蓄えており、その圧縮-非圧縮領域間では電荷密度の差が生じると推察される。細胞接着界面の pH 空間分布を可視化する技術の開発は、細胞接着に対する糖衣圧縮効果への知見も提供し得る。

1.4 目的と概要

本研究では細胞-基材接着界面での高分子鎖が細胞接着に及ぼす役割の解明とその応用を目的とした。細胞-基材接着界面には生体高分子を含む様々な高分子が存在する。第2章では疎水性凝縮状態の PNIPAAm 表面が細胞接着を制御するメカニズムについて明らかにした。第3章では細胞-基材接着界面の pH 分布の可視化について検討し、pH 分布と糖鎖の立体構造を考えた。第4章では PNIPAAm 表面を用いて細胞接着制御の応用展開について議論した。第5章では以上の内容を総括した。

第2章 疎水性凝縮層の水平変形効果

2.1 概要

細胞-基材間接着は主に細胞接着リガンドとインテグリンレセプターの結合からなり、このため材料表面への細胞接着はタンパク質吸着の観点から広く研究されてきた。近年では細胞接着界面の力学特性も重要な役割を担うことが明らかにされ、水溶性膨潤層を用いた系では表面変形と細胞接着のモデル化と実証が進んでいる^{29,55}。一方、疎水性凝縮層の表面力学が細胞接着に与える影響は未だわかっていない。これは細胞接着環境下における疎水性凝縮層のミクロな変形のモデル構築とその定量の困難さが原因だろう。

本研究では疎水性凝縮層のモデル系として poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) のグラフト表面を採用した。PNIPAAm は下限臨界溶液温度 (lower critical solution temperature; LCST) 以上である 37°C において疎水性凝縮状態をとるが、分子内に親水基と疎水基を併せもち、細胞牽引力程度の負荷で変形が生じる。グラフト重合度 (degree of graft-polymerization; DGP) を厳密に制御し、DGP 依存的な表面変形と細胞接着について解析を行なった。

2.2 PNIPAAm グラフト基材の作製

2.2.1 試薬および材料

- ・カバーガラス (φ18 mm, No.1), 松浪硝子工業
- ・過酸化水素水 (30%), 富士フイルム和光純薬
- ・硫酸, 富士フイルム和光純薬
- ・アンモニア水 (28%), Sigma-Aldrich
- ・トルエン (超脱水), 富士フイルム和光純薬
- ・ヘキサン, 富士フイルム和光純薬
- ・エタノール, 富士フイルム和光純薬
- ・4-(chloromethyl)phenyltrichlorosilane; CMPS, Alfa Aesar
- ・Sodium N,N-diethyldithiocarbamate trihydrate; DDTC, Sigma-Aldrich
- ・N-isopropylacrylamide; NIPAAm, 東京化成

NIPAAm はトルエンとヘキサンの混合溶液で再結晶し、減圧乾燥後に使用した。

2.2.2 基材作製方法

PNIPAAm グラフト基材は DGP 制御のため、光イニファーター⁵⁶ を利用した表面開始グラフト重合法^{57,58} にて作製した。イニファーターはラジカル重合反応の開始剤 (initiator) と連鎖移動剤 (transfer agent)、重合停止剤 (terminator) の機能をあわせもつ。光イニファーターである N,N-diethyldithiocarbamate は分子内に弱い共有結合部位を有しており、光エネルギーが加わると開裂しキャッピング状態をとる。そこへモノマー分子が挿入されることにより重合反応が準リビングラジカル的に進行する。つまり、光イニファーター重合では光照射時間によって重合度が調節される。以下に手順の概略を示す (Figure 2.1)。

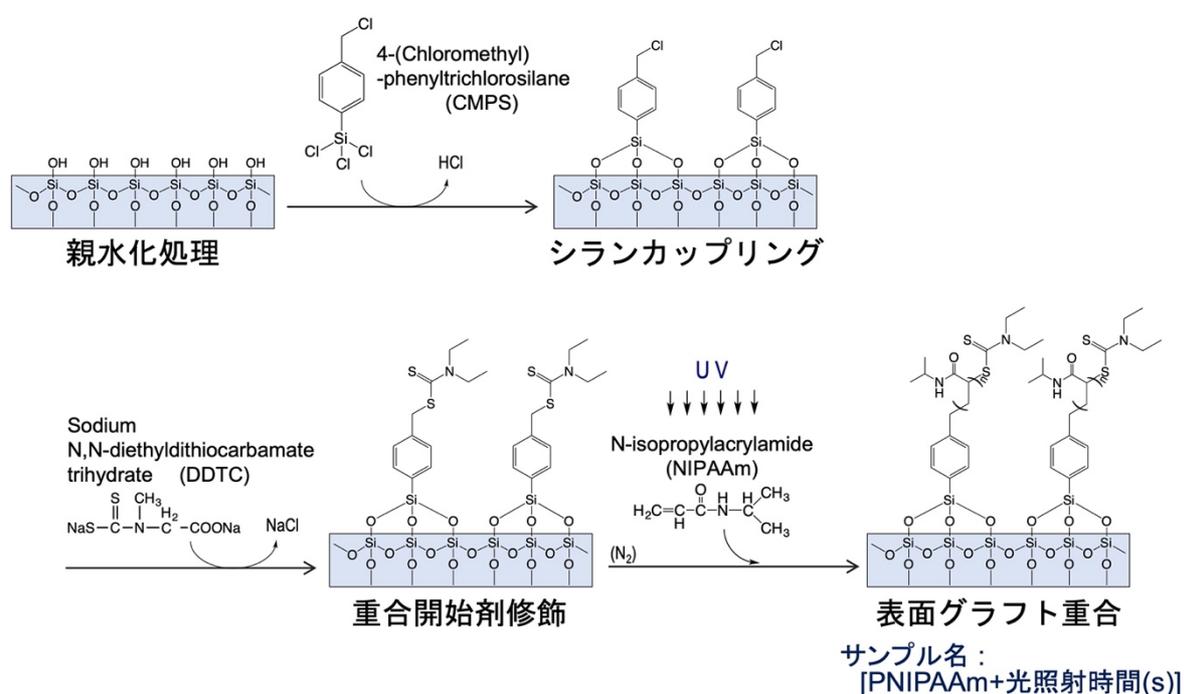


Figure 2.1 PNIPAAm グラフト基材作製の概略図^{57,58}.

ガラス表面の洗浄および親水化処理

ガラス基材を室温で一晩 H_2O_2 aq. 中に浸漬し、次いで 80°C の Piranha 溶液 (硫酸:過酸化水素水 = 7:3) で 2 時間反応させた。粘性の高い Piranha 溶液が表面に残留しないよう大量の水ですすいだガラス基材は、水中で最大 1 週間保管した。続くシランカップリング反応を行う直前にガラス基材を水中から取り出し、 80°C の SC1 溶液 (アンモニア水:過酸化水素水:水 = 1:1:5) で 15 分間反応させた。ガラス表面を大量の水ですすいだ後、 80°C 以下で十分に乾燥させた。

シランカップリング

密閉容器中に CMPS のトルエン溶液 (1%, v/v) を調製し、これに洗浄・親水化处理ガラス基材を浸漬した。溶液調製は低湿度下で行い、反応容器中は Ar ガスを充填した。遮光下、40°C で 5 時間反応させた。反応後のガラス基材はアセトン中で超音波洗浄を 10 分間行い、再度アセトンですすいだ後、110°C で 10 分間加熱した。

重合開始剤 (イニファーター) 修飾

200 mM DDTC-エタノール溶液中に CMPS 修飾ガラスを浸し、遮光下、25°C で 18 時間反応させた。副生成物として生じる NaCl はエタノールに不溶であるため、ガラス表面に NaCl が堆積しないよう、反応は恒温振盪器内で 50 rpm の水平振盪下で行なった。反応後のガラス基材はエタノールおよび水ですすぎ、室温で乾燥させた。

表面グラフト重合

0.5 M NIPAAm 水溶液を調製し、1 時間以上 N₂ bubbling を行った。このモノマー溶液と DDTC 修飾ガラスを N₂ チャンバー内に設置し、室温、N₂ 雰囲気下で UV を照射した。光源はおよそ 300 ~ 400 nm の波長領域を透過させるショートパスフィルター (SHX385; 朝日分光) を備えたキセノンランプ (MAX-301; 朝日分光) を使用し、UV 強度は 15 mW/cm² とした。作製したサンプルは「PNIPAAm+光照射時間(秒)」で命名した。

2.3 PNIPAAm グラフト基材の評価方法

2.3.1 X 線光電子分光法

各反応の進行を確認するため、X 線光電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy; XPS, ULVAC-PHI) による表面元素分析を行った。XPS は試料表面に X 線を入射し、光電効果によって放出される光電子の運動エネルギーから元素組成や化学結合状態に関する情報を得る手法である。測定用の X 線源として単色化 X 線 (Al-K α) を使用した。この軟 X 線は試料の深部まで到達するが、表面から深い領域で発生した光電子は非弾性散乱によるエネルギー消失のため試料内部で消滅する。したがって試料表面近傍 (~10 nm) で発生し真空中に放出された光電子のみが検出対象となる。また検出深さは光電子の取出角と相関するため、取出角を小さくすれば最表面の極薄膜層の分析が可能となる (Figure 2.2)。ガラス表面の CMPS や DDTC はほぼ厚みを持たないと推察されるため、光電子取出角は 15° に設定した。

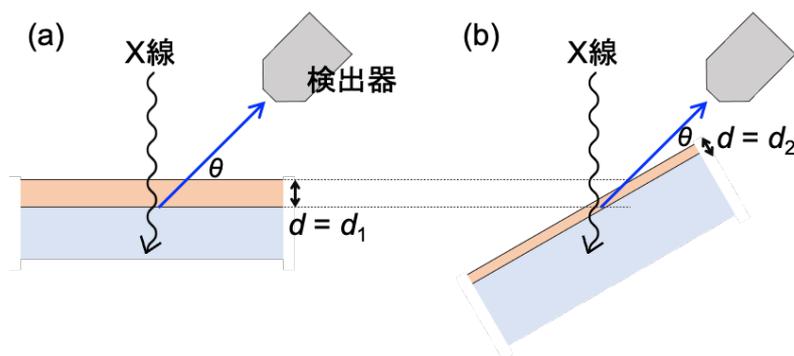


Figure 2.2 XPS 測定における光電子の取出角(θ)と検出深さ(d).
光電子の取り出し角を小さくすると検出深さが浅くなる ($d_1 > d_2$).

2.3.2 原子間力顕微鏡法によるフォースカーブ測定

PNIPAAm グラフト層の厚さの解析のため、原子間力顕微鏡法 (atomic force microscopy; AFM) によるフォースカーブ測定を行った。フォースカーブ測定では試料表面に探針を圧入し、その際に生じる垂直方向の力を計測する。厚みを有する試料に対して一定速度でカンチレバーを接近させ押し込む場合、初めに斥力が検出された地点が試料表面であり、負荷をかけても探針の z 位置が進まなくなった地点が圧縮可能な最大深さである (Figure 2.3)。この2地点間距離を圧縮厚と定義した^{58,59}。PNIPAAm は室温で親水性膨潤状態をとり、その圧縮厚はグラフト重合度 (DGP) を反映する。37°C では疎水性凝縮状態をとるが、このときの圧縮厚は凝縮状態下でも変形可能な層の厚みと考えられる。カンチレバーは PNP-TR (NanoWorld) を使用し、測定条件は PBS 中で set point 3 nN、scan velocity 2 $\mu\text{m/s}$ とした。37°C での測定はステージ上にヒーターを設置した。

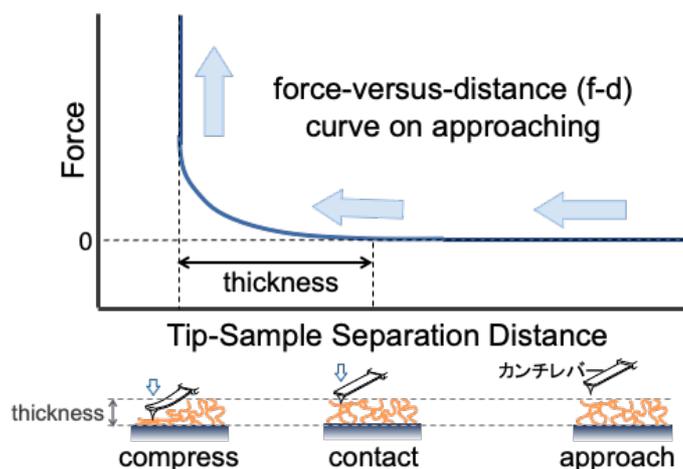


Figure 2.3 AFM によるフォースカーブ測定の模式図.

2.3.3 細胞培養

本研究ではヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells; hMSCs, Lonza) を用いた。細胞は MSC 専用増殖培地 (MSCGM, Lonza) を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で維持培養した。実験には継代数 6 の細胞を使用し、PNIPAAm グラフト基材上に 2000 cells/cm² の密度で播種した。基材上の細胞は MSCGM 中、37°C、5% CO₂ 条件下で 5 時間培養した。

2.3.4 PNIPAAm 表面上での免疫染色

PNIPAAm は LCST 以下まで温度が低下すると急速に相転移し、意図しない細胞剥離を生じる。そのため、細胞固定が完了するまでに使用する器具や溶液は事前に 37°C に加温し、操作中の温度維持に留意した。細胞固定完了後は特に記載のない限り室温で操作を行なった。

5 時間培養された細胞培養皿を 37°C のウォームプレート上に設置し、培地を PBS で洗浄、除去した後、1% パラホルムアルデヒド (富士フィルム和光純薬) および 0.1% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) を含む PBS を加え、37°C で 5 分間反応させた。これにより細胞が固定され、以降、サンプルを室温で扱っても細胞が剥離あるいは形態変化することはなかった。

サンプルを PBS で十分に洗浄した後、1% ウシ血清アルブミン (BSA, 富士フィルム和光純薬) と 10% ロバ血清を含む PBS を用いて 1 時間ブロッキングを行なった。ブロッキング液除去後、0.1% BSA を含む PBS で 1 µg/mL に希釈した vinculin の一次抗体 (mouse monoclonal anti-vinculin, Santa Cruz Biotechnology) 中、4°C、遮光下で一晩反応させ、続いて 0.1% BSA を含む PBS で 1 µg/mL に希釈した Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) 中、遮光下で 1 時間反応させた。さらに 100 nM DAPI (富士フィルム和光純薬) と 100 nM rhodamine-phalloidin (Cytoskeleton) を添加し、30 分間インキュベートした。

2.3.5 細胞接着面積および接着斑サイズの定量

細胞の接着面積および接着斑サイズの定量のための顕微鏡観察は蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-X710, KEYENCE) を用いて行い、それぞれ 10 倍および 40 倍の対物レンズを使用した。画像解析には MATLAB (Mathworks) を使用し、下記の操作を行なった。

細胞接着面積は 10 倍の対物レンズで撮影した位相差画像から算出した。まず、edge 関数と sobel 演算子を使用し、背景に対してコントラスト差を有する領域 (細胞接着領域) を検出した。次に検出された輪郭線のギャップを膨張処理 (imdilate) で埋め、さらに関数 infill でオブジェクト内部の空洞を埋めた。画像から見切れている細胞は正確な面積の定量ができない

ため、関数 `imclearborder` で除去した。最後にオブジェクトの平滑化のため収縮操作 (`imerode`) を行った。セグメント化された個々の細胞オブジェクトについてピクセル数を計測し、 μm^2 に換算して細胞接着面積を得た。

接着斑 (focal adhesion; FA) の大きさは 40 倍の対物レンズで撮影した vinculin の蛍光画像から算出した。まず膨張収縮処理により背景のピクセルノイズを低減させ、メジアンフィルターとトップハット処理を組み合わせることで個々の FA を強調した。その後、画像を二値化して背景より有意に明るいオブジェクトを検出し、それぞれのピクセル数を μm^2 に換算して FA サイズを得た。

2.3.6 静的接触角測定

PNIPAAm グラフト表面の接触角は、室温もしくは約 37°C に保たれた保温箱内に接触角計 (Drop Master, DMe-211, 協和界面科学) を設置して測定した。3 μL の水を静かに表面へ着液させ、1 秒間隔で 30 秒間計測した。すべてのサンプルで着液後 10 秒以内で表面のぬれが平衡に達したため、着液 10 秒後の角度を静的接触角と定義した。

2.3.7 フィブロネクチンの蛍光標識

タンパク質の吸着評価には、代表的な細胞接着性分子であり、かつ培地の血清中に含まれるフィブロネクチン (FN; human, natural, Corning) を用いた。pH9.0 の炭酸-重炭酸緩衝液中に FN と fluorescein isothiocyanate (FITC, 東京化成) をモル比 50:1 で混合し、 4°C 、遮光下で一晩反応させた。未反応の FITC は 50 kDa Amicon Ultra-0.5 device (Merck) で除去した。得られた FITC 標識 FN 溶液を UV/Vis 分光光度計 (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BIO-RAD) で計測し、下記の計算式にしたがって FITC 標識率を算出した⁶⁰。

$$\frac{FITC}{FN} = \frac{A_{495} \times \epsilon_{280, FN}^{0.1\%} \times M_{FN}}{M_{FITC} \times \epsilon_{495, FITC}^{0.1\%} \times (A_{280} - [0.35 \times A_{495}])}$$

ここで、 $M_{FN} = 440,000$ 、 $M_{FITC} = 389$ 、 $\epsilon_{280, FN}^{0.1\%} = 1.28$ 、 $\epsilon_{495, FITC}^{0.1\%} = 195$ 、 $A_{280} = 0.108$ (280 nm での吸光度, 実測値)、 $A_{495} = 0.062$ (495 nm での吸光度, 実測値)、 $0.35 \times A_{495}$ は A_{280} に対する FITC の吸光度の補正である。FN の分子量は販売元のデータを使用した。以上より、FN 1 分子に対する FITC の平均結合数 5.4 を得た。

2.3.8 全反射蛍光顕微鏡法

PNIPAAm 表面への FN 吸着量は、全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscopy; TIRFM; TIRF on TE2000-U, Nikon) を用いて計測した。TIRF は光の全反射面に浸み込んだエバネッセント光を蛍光の励起光源とする (Figure 2.4(a))。エバネッセント光の浸み込み深さはレーザーの入射角で調節可能であり、界面のおよそ 100 nm 程度に存在する試料を観察対象とする。光源として Ar イオンレーザー ($\lambda = 488 \text{ nm}$; 出力 10 mW を ND フィルターで 1/64 倍に減光) を使用し、レーザーの入射角は 68° に設定した (Figure 2.4(b))。実験はすべてレンズヒーター、ステージヒーター、保温箱を使用して測定環境温度を 37°C に保ち、100 倍の対物レンズ (NA1.49, Nikon) と EM-CCD カメラ (Evolve-s; Roper Scientific) を用いて画像を取得した。

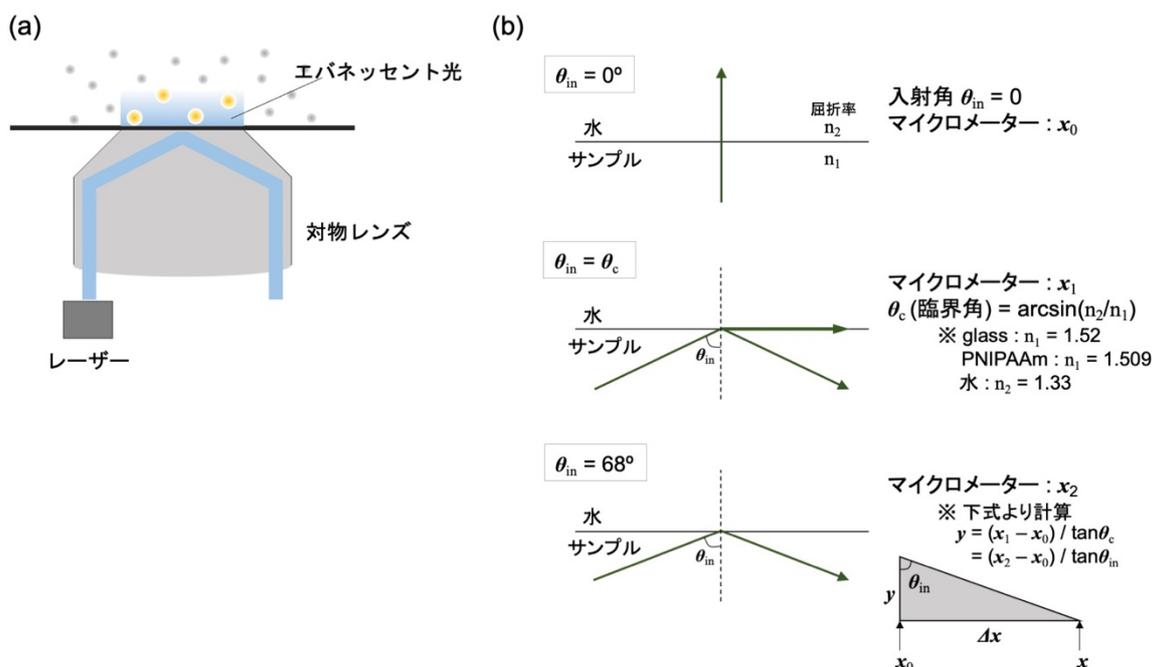


Figure 2.4 TIRF での界面観察. (a)エバネッセント領域内の分子のみが観察される. (b)レーザーの入射角の調整. 設定は環境温度が平衡に到達した後に行なった.

まず、吸着平衡に到達する時間を計測した。20 nM FITC-FN in PBS を PNIPAAm グラフト基材上に滴下し、30 秒間隔のタイムラプス観察を行なった。取得した画像の輝度分布から CCD カメラなど装置由来のガウシアンノイズを除去し、FITC-FN 由来のシグナルを得た。FN の表面吸着率は画像を占める FITC-FN シグナルを有するピクセル数の割合で定義した。以上の画像解析は MATLAB を使用した。

タイムラプス観察の結果から 20 nM FITC-FN は PNIPAAm 表面に対して 15 分以内に平衡吸着に達することがわかったため、平衡吸着量測定のための画像取得は 20 nM FITC-FN in PBS を表面に滴下して 15 分経過後に開始し、各サンプルに対して少なくとも 45 箇所ずつ撮影・解析した。データは Kruskal-Wallis 検定と多重比較を行い、有意水準は $p < 0.01$ とした。

2.3.9 水平力顕微鏡法による水平変形能評価

PNIPAAm 表面の水平変形能評価は lateral force microscopy (LFM; NanoWizard 4, JPK) により 37°C の PBS 中で行なった。測定はすべて長さ 485 μm の短冊型シリコンカンチレバー (HQ-13-Au, Oxford Instruments Asylum Research) を使用し、set point 5 nN、scan velocity 1 $\mu\text{m}/\text{s}$ の条件で 1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ の領域をスキャンした。得られた Height 像と LFM 像をもとに、次の2つの指標で表面の水平変形能を評価した。

(1) 探針の往復により生じる PNIPAAm の凝縮構造の水平移動度

37°C の PBS 中では PNIPAAm は粒状の凝縮構造を形成している。この構造は探針の走査で変形可能であった。そこで表面走査中の往路と復路で検出される凝縮構造物の位置の差を水平移動度として定義した。PNIPAAm の凝縮構造の水平移動度は trace scan の height プロファイルと retrace scan の height プロファイルとの相互相関関数より算出した。

(2) 表面走査中でのカンチレバーのねじれの持続長

探針に対して水平力がかかるとカンチレバーがねじれる (Figure 2.5)。この水平力には探針-PNIPAAm グラフト鎖間の相互作用力も含まれる。探針の水平走査に伴い PNIPAAm 凝縮構造内部から高分子鎖の引き伸ばしが開始されると次第にカンチレバーがねじれ、相互作用の解除とともにカンチレバーのねじれも解除される。つまり、カンチレバーのねじれの持続長は高分子鎖の引き伸ばし可能な距離を反映する。カンチレバーのねじれの持続長は trace scan の lateral torsion プロファイルの自己相関関数より算出した。

LFM 測定およびその解析から得られたデータは One-way ANOVA と Tukey 法による post-hoc test を行い、有意水準は $p < 0.01$ とした。

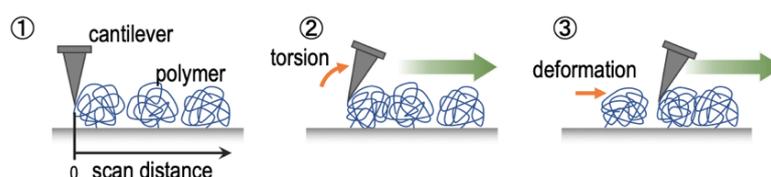


Figure 2.5 LFM 測定の概略図.

2.4 結果

2.4.1 作製基材表面の元素分析

基材作製課程の各段階ごとに XPS 測定を行い、反応の進行を確認した。代表的な XPS スペクトル (Figure 2.6) と得られた表面元素比 (Table 2.1) を示す。CMPS 修飾ガラスは Cl2p シグナルを示し、DDTC 修飾ガラスでは Cl2p シグナルが S2s シグナルに置き換わっていた。Cl および S はそれぞれ CMPS と DDTC に特徴的な元素であり (Figure 2.1)、この結果はシランカップリング反応とそれに続く重合開始剤修飾の反応進行を示している。また、CMPS および DDTC 表面ではガラス由来の Si2p のピークが検出された。一方、光重合操作を行った試料

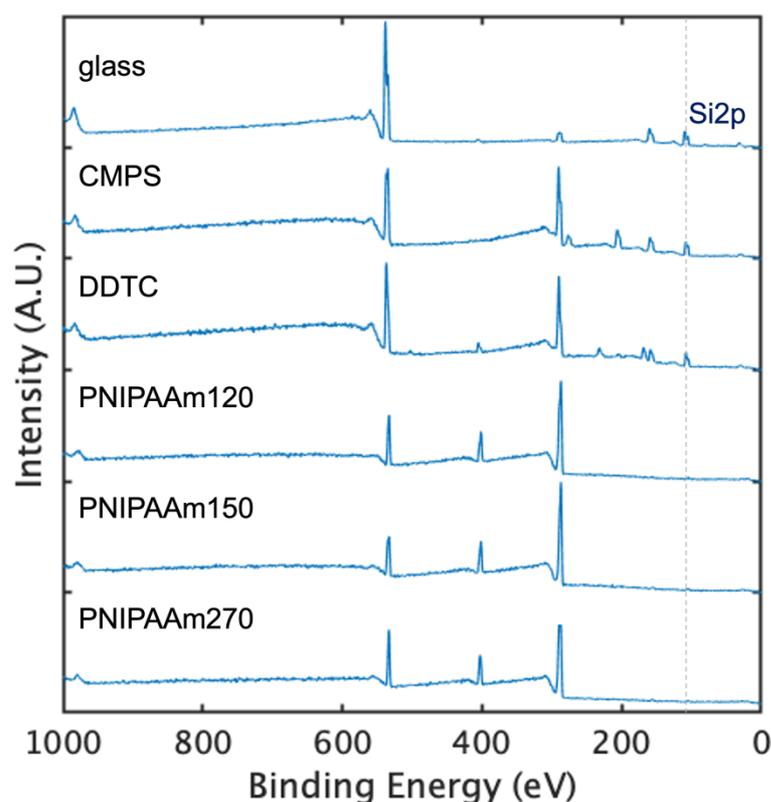


Figure 2.6 ガラス基材表面の XPS スペクトル. PNIPAAm の後ろの数は光イニフィーター重合における UV 照射時間(秒)を表す.

Table 2.1 XPS スペクトルから得られた表面元素比.

| | Atomic Concentration(%) | | | | | |
|------------|-------------------------|-----------|----------|----------|---------|---------|
| | C1s | N1s | O1s | Si2p | S2s | Cl2p |
| CMPS | 55.3±3.0 | 0.5±0.5 | 26.2±1.9 | 11.5±1.1 | 0.0±0.1 | 6.5±0.4 |
| DDTC | 58.0±0.9 | 3.1±0.5 | 23.1±0.4 | 8.9±0.5 | 6.4±0.6 | 0.5±0.3 |
| PNIPAAm120 | 75.1±0.6 | 11.96±0.7 | 11.6±0.3 | 0.8±0.3 | 0.4±0.3 | 0.2±0.1 |
| PNIPAAm150 | 75.2±1.3 | 11.0±0.8 | 12.2±0.9 | 1.1±0.5 | 0.3±0.4 | 0.2±0.3 |
| PNIPAAm270 | 77.1±1.0 | 11.5±1.1 | 11.0±0.6 | 0.4±0.3 | 0.0±0.0 | 0.1±0.1 |

(PNIPAAm120, 150, 270) では C:N:O ~ 6:1:1 と PNIPAAm の理論値に近い値を示し、かつ Si2p のピークが消失していた。これは少なくとも 120 秒間以上の重合時間で十分な厚さをもつ PNIPAAm 層が形成されたことを示唆している。

この系は、ある閾値時間以上の照射により約 0.04 chains/nm^2 のグラフト密度を持つポリマーブラシの形成が確認されている⁵⁸。グラフト密度は低いものの PNIPAAm ブラシによる表面膜厚が厚いため、ガラス由来の Si2p シグナルが観測されなかったと考えられる。

2.4.2 PNIPAAm グラフト層の圧縮厚測定

室温および 37°C の PBS 中で PNIPAAm グラフト層のフォースカーブ測定を行なった。代表的な前進側のフォースカーブと、そこから得られた PNIPAAm 表面の圧縮厚を以下に示す (Figure 2.7)。室温での PNIPAAm グラフト層の圧縮厚は $21.6 \pm 18.8 \text{ nm}$ (PNIPAAm120) から $172.4 \pm 29.1 \text{ nm}$ (PNIPAAm240) の間で照射時間の増加とともにほぼ線形に増加した (Figure 2.7(a,c))。LCST 以下である室温では高分子鎖が水和状態をとり、その膨潤層の厚みはグラフト重合度 (DGP) を反映する。つまり照射時間と DGP が線形関係にあり、この結果は光イニシアターによる準リビングラジカル重合の特性を反映している。一方、37°C ではすべてのフォースカーブが PNIPAAm 鎖の疎水性凝縮状態を示し、圧縮変形可能な厚さは照射時間/DGP の関係によらずほぼ一定で約 10 nm であった (Figure 2.7(b,c))。この最表面の薄い層が、37°C 下において、力負荷のもとで変形可能な自由鎖の層だと特定された。

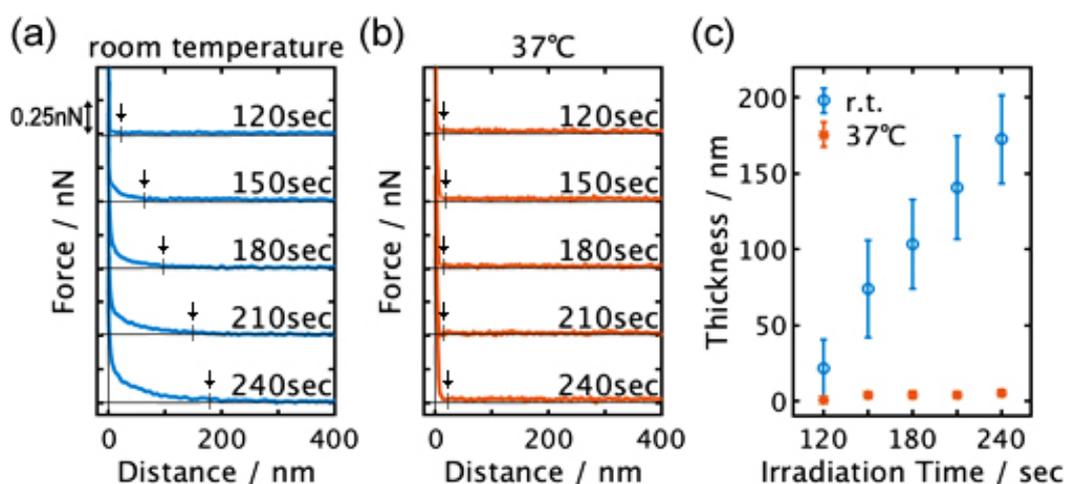


Figure 2.7 PNIPAAm グラフト層の圧縮厚. (a)室温および (b)37°C で測定された典型的な前進側のフォースカーブ. 矢印は圧縮開始点を示す. (c)DGP の異なる PNIPAAm 層の圧縮厚. 室温は $n > 256$, 37°C は $n = 16$.

2.4.3 PNIPAAm 表面への細胞接着性評価

37°C の細胞培養条件下で PNIPAAm グラフト層の DGP が細胞接着に与える効果を検討した (Figure 2.8)。コントロールガラス (PNIPAAm 修飾なし) および PNIPAAm120 上の細胞は良好な伸展状態を示し、大きく成長した FA が多数見られ、アクチン細胞骨格が発達していた。一方、PNIPAAm150-240 は DGP が大きくなるほど FA やアクチン細胞骨格の発達が見られなくなり、細胞接着と伸展が抑制された (Figure 2.8(a))。これらの画像から、DGP の増加に伴う細胞接着面積と FA サイズの減少が定量的にも確認された (Figure 2.8(b,c))。特に PNIPAAm240 上の細胞はわずかなドット状の FA が見られるのみであった。

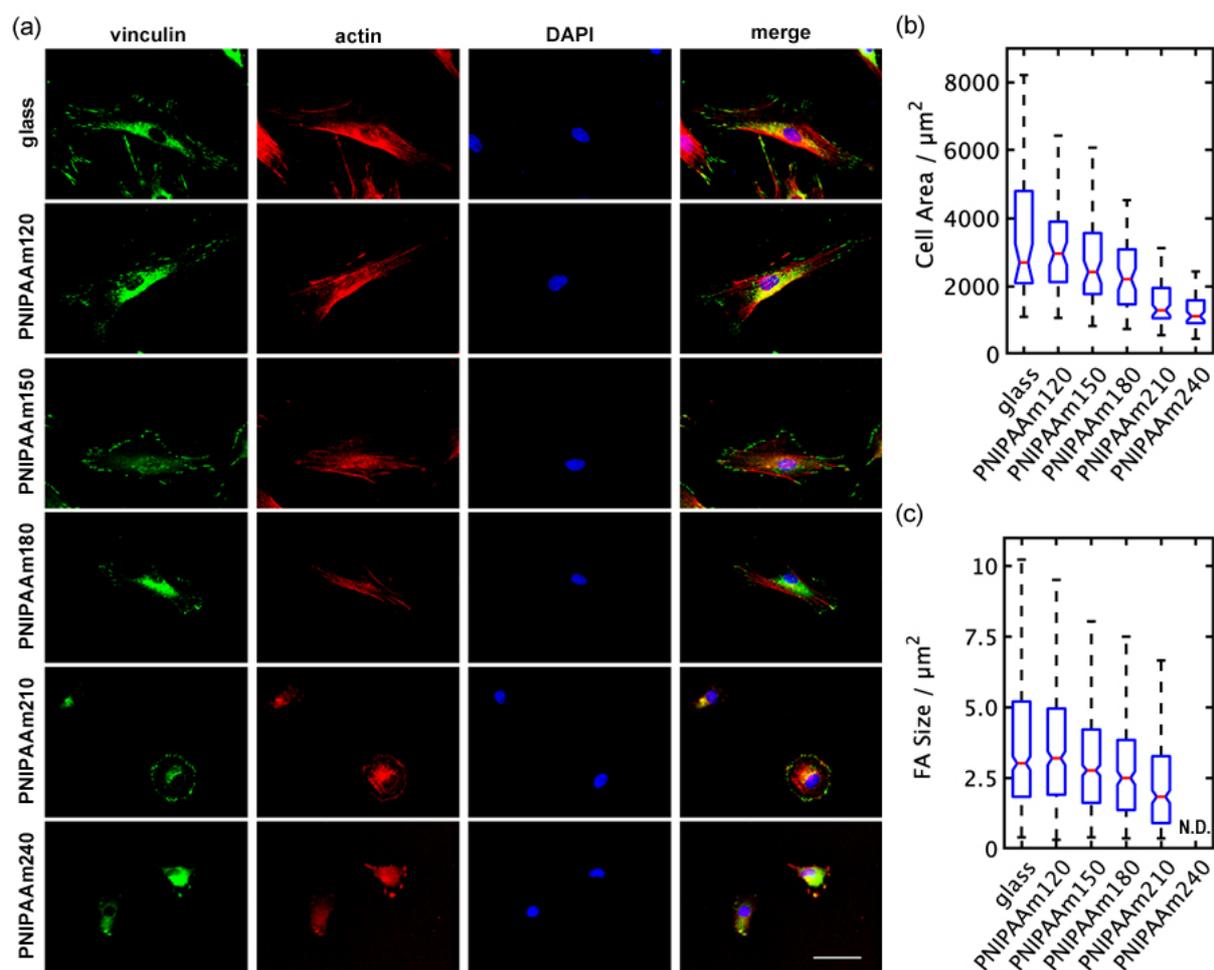


Figure 2.8 PNIPAAm グラフト基材上の細胞接着. (a)異なる DGP の PNIPAAm グラフト基材上で 5 時間培養された細胞の vinculin(緑), アクチン(赤), 核(青)の典型的な免疫染色画像. scale bar = 50 μm . (b)細胞接着面積. 細胞数 $N > 55$. (c)FA の大きさ. $N = 11$, FA 数 $n > 270$.

2.4.4 PNIPAAm グラフト表面へのタンパク吸着特性評価

DGP の異なる PNIPAAm グラフト表面で観察された細胞接着形態の変化の要因を特定するべく、表面へのタンパク質吸着について検討した。従来、PNIPAAm グラフト表面に対するタンパク質吸着は表面の水和特性で議論されてきたため、まず、室温および 37°C における表面水和特性を接触角測定にて評価した (Figure 2.9(a))。同一 DGP 条件における温度の効果について、37°C の接触角は室温での接触角より常に 5° 以上大きな値を示した。これは相転移に伴う PNIPAAm グラフト鎖のコンフォメーションの違いによる。一方、37°C の同一温度条件下での接触角は DGP によらずほぼ一定であった。つまり、最外層の PNIPAAm 表面における疎水性の程度はグラフトポリマーの長さで変化しなかった。2.4.1 項の XPS の結果においても重合時間 120 秒以上で作製された PNIPAAm 表面は DGP によらず元素組成がほぼ一致していたことから、PNIPAAm120-240 の最表面は化学的性質に差がなく、タンパク質吸着レベルは同じであると予想された。

次いで代表的な細胞接着リガンドであるフィブロネクチン (FN) を FITC で標識し、37°C 下、PNIPAAm 表面への吸着挙動を TIRF にて観察した (Figure 2.9(b))。PNIPAAm120 および

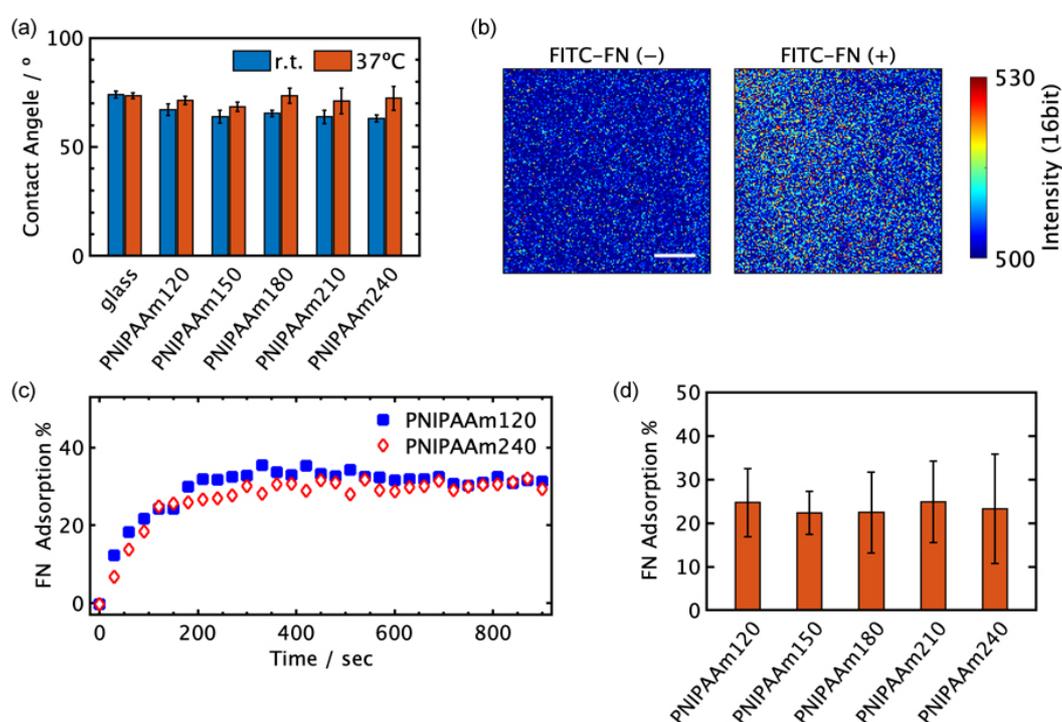


Figure 2.9 PNIPAAm グラフト表面へのタンパク質吸着評価. (a)異なる DGP の PNIPAAm 表面に対する室温および 37°C での接触角. (b)37°C における PNIPAAm 表面の TIRFM 画像. 左は PBS のみ, 右は 20 nM FITC-FN in PBS を表面に滴下し, 15 分後に撮影した. scale bar = 2 μm. (c) 37°C における PNIPAAm120 および PNIPAAm240 表面への FITC-FN 吸着の時間依存性. (d) 37°C での 20 nM FITC-FN の平衡吸着量. $n > 45$, $p > 0.42$.

PNIPAAm240 表面のタイムラプス観察では、どちらも 15 分以内に平衡吸着に達した (Figure 2.9(c))。そこで FITC-FN 溶液を PNIPAAm 表面に滴下して 15 分経過後に平衡吸着量の評価を行なった。事前の予測通り、DGP の異なる基材間でのタンパク質吸着レベルの差は見られなかった (Figure 2.9(d))。

2.4.5 PNIPAAm グラフト表面の水平変形評価

37°C において PNIPAAm グラフト基材は DGP によらず表面元素組成や疎水化レベル、界面へのタンパク質吸着レベルがほぼ同程度であった。そこで、PNIPAAm の疎水性凝縮層に対する DGP 依存的な細胞接着の要因の候補として表面の力学特性を考えた。二次元平面上の細胞は接着界面に対して水平方向に牽引力を負荷するため、表面の水平変形能は細胞の接着状態に関与すると予測される。PNIPAAm 表面の水平変形能評価は水平力顕微鏡法 (LFM) にて評価した。LFM では表面に対して垂直方向に一定の負荷を維持しながら探針を走査し、その際に生じるカンチレバーのねじれを検出する。このとき得られた Height 像から PNIPAAm の凝縮構造の水平移動度、LFM 像からカンチレバーのねじれの持続長を計測した。

PNIPAAm の凝縮構造の水平移動度

PNIPAAm グラフト基材の trace scan と retrace scan における典型的な Height 像を示す (Figure 2.10(a))。PNIPAAm 表面は数十 nm 程度の粒状の凝縮構造をとっており、DGP が増大するにしたがって凝縮構造が大きくなった。表面粗さ (RMS) 値は、PNIPAAm120 が約 1 nm、PNIPAAm150-240 は 3~4 nm であり、いずれもほぼ同じレベルであった。

表面走査中、PNIPAAm 凝縮構造の位置が探針の移動とともに水平移動する様子が観察された。つまり、trace scan では右方向、retrace scan では左方向に粒状構造が移動していた。この水平移動は DGP の大きな PNIPAAm 表面でより顕著に現れた。PNIPAAm グラフト鎖の片末端はガラス基材に化学的に固定されているため、この水平移動は高分子構造の変形によるものである。探針の走査に伴う PNIPAAm 凝縮構造の水平移動度の定量化のため、各走査過程の波形を分析した。その結果、trace scan と retrace scan で波の形状は保ったまま位相のずれを生じていた (Figure 2.10(b))。そこでこれらの相互相関関数から PNIPAAm 凝縮構造の水平移動距離の計算を検討した (Figure 2.10(c,d))。相互相関関数の最初の大きなピークは trace scan と retrace scan の波形の相関が最も強く現れる距離を示しており、PNIPAAm 凝縮構造の水平移動の指標となる。この値は 5.3 ± 1.2 nm (PNIPAAm120) から 34.0 ± 5.0 nm (PNIPAAm240)

まで DGP と連動して増加した (Figure 2.10(d)).

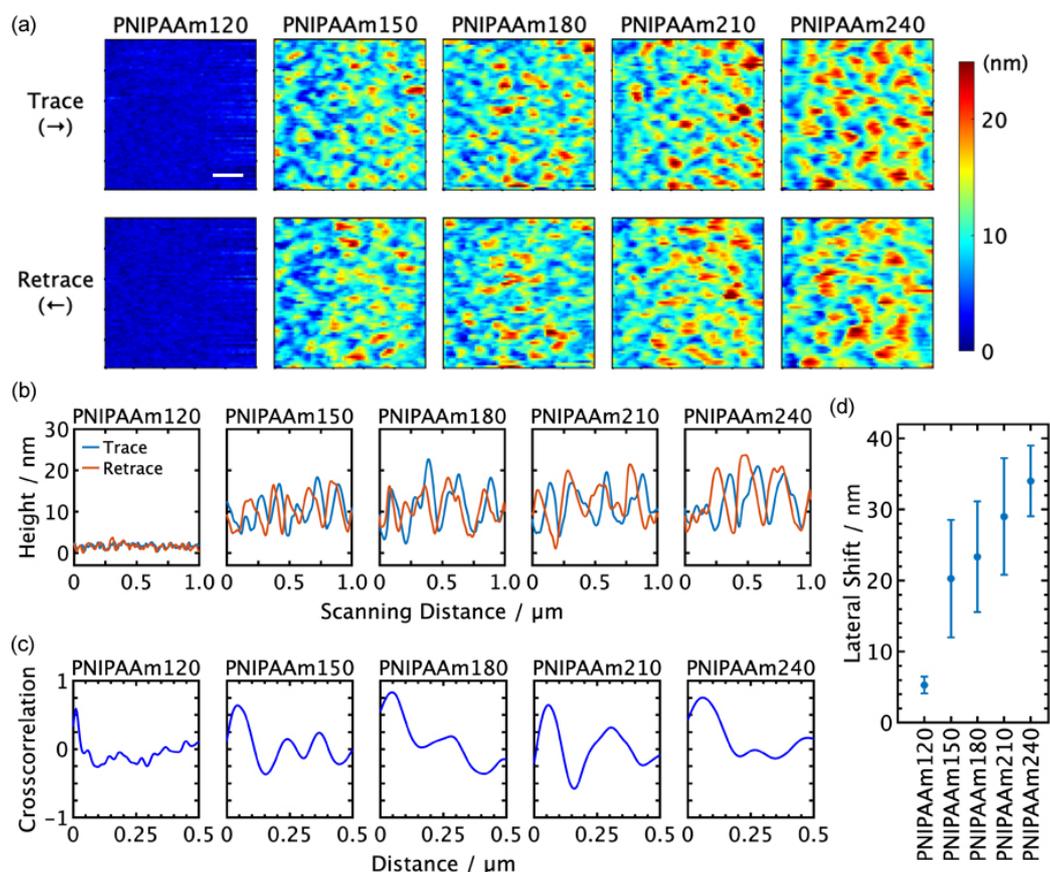


Figure 2.10 PNIPAAm グラフト基材の表面形状および水平移動度. (a)PNIPAAm 表面の Height 像. 上段は左から右への trace scan, 下段は右から左への retrace scan による. scale bar = 200 nm. $n = 5$. (b)代表的な trace と retrace の height プロファイル. (c) trace と retrace の height プロファイルの相互相関関数. (d) 探針での表面走査に伴う PNIPAAm 凝縮構造の水平移動度. DGP の異なるすべての組み合わせで有意差が認められた ($p < 0.01$, $n = 320$).

カンチレバーのねじれの持続長

上記のような高分子凝集構造の水平移動度は、水平負荷が PNIPAAm 表面のトポグラフィーに及ぼす影響を単純に確認するには有用である。一方、高分子の微細な構造変化を検出するには限界がある。水平負荷に対する PNIPAAm グラフト鎖の局所的な引き伸ばしを評価するために、カンチレバーのねじれの持続性について調査した。次に典型的な LFM 像と friction loop を示す (Figure 2.11(a,b))。いずれの DGP においても LFM 像は右側に進むほどシグナル強度が増大し、PNIPAAm 表面の走査過程でカンチレバーのねじれが徐々に蓄積する様子が観察された (Figure 2.11(a))。しかし friction loop には細かいピークが多数現れており、これはカンチレバーのねじれの蓄積と解除が部分的に何度も繰り返されたことを示唆する (Figure

2.11(b))。カンチレバーのねじれは表面の局所変形や高分子鎖の引き伸ばし、ねじれの解除は表面の応力緩和や引き伸ばされた高分子鎖の脱離に由来すると考えられる。DGP の小さな PNIPAAm120-180 では friction loop 上のピークが小さくより高頻度で出現するが、DGP の大きな PNIPAAm210 および PNIPAAm240 では friction loop 上のピークが比較的大きく低頻度であった。

これらの傾向を定量的に評価するため trace scan の lateral torsion プロファイルの自己相関関数を計算し、カンチレバーのねじれの持続性を分析した (Figure 2.11(c,d))。自己相関関数の最初のピークをねじれの持続長として定義した。この値は PNIPAAm120 ではわずか 36.8 ± 12.3 nm であったが、DGP と連動して増大し、PNIPAAm240 では 226.3 ± 95.6 nm に達した (Figure 2.11(d))。以上より DGP の大きな PNIPAAm 表面は水平負荷に対して変形しやすく、長距離の引き伸ばしが生じることがわかった。

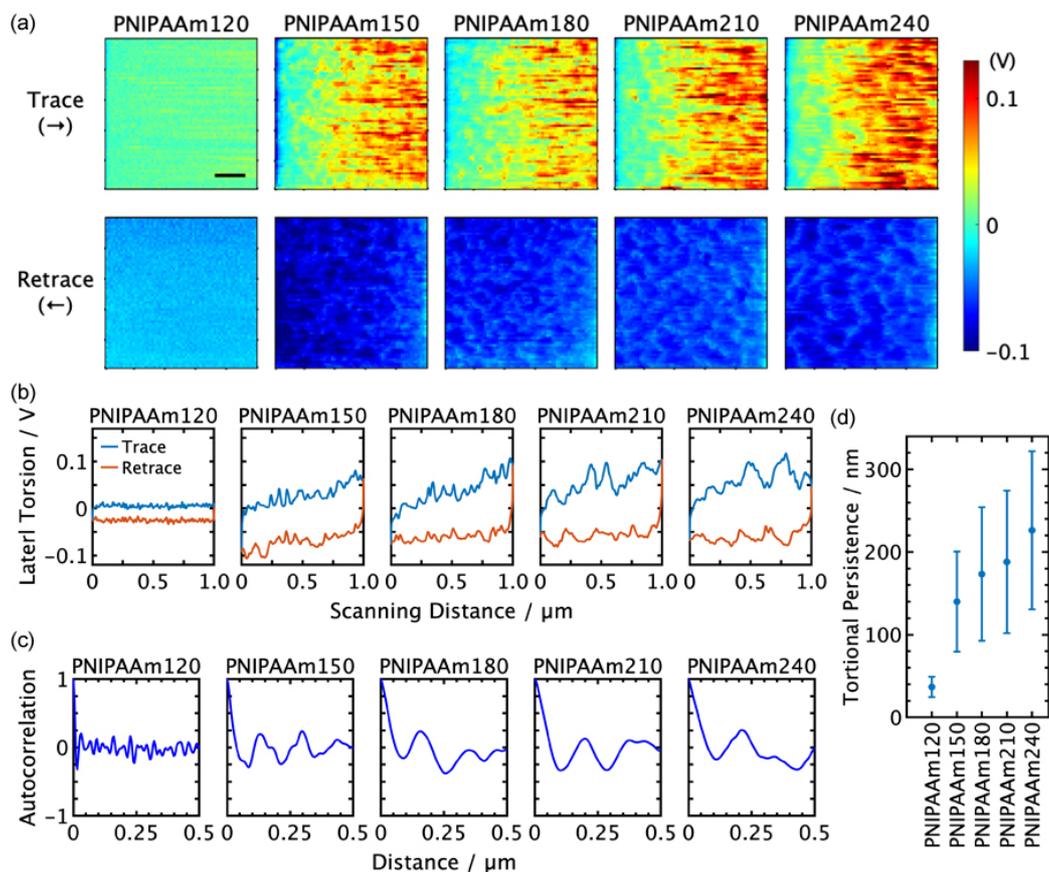


Figure 2.11 PNIPAAm グラフト表面の水平変形能. (a)PNIPAAm 表面の LFM 像. 上段は左から右への trace scan, 下段は右から左への retrace scan による. scale bar = 200 nm. $n = 5$. (b)代表的な trace-retrace の friction loop. (c) trace scan の lateral torsion プロファイルの自己相関関数. (d) trace scan 中におけるカンチレバーのねじれの持続性. PNIPAAm180 vs. PNIPAAm210 を除くすべての組み合わせで有意差が認められた ($p < 0.01$, $n = 320$).

2.5 考察

近年、細胞外微小環境の力学特性が細胞の生化学的なふるまいと関連し、ECMの硬さや粘弾性が細胞の接着状態に大きな役割を果たすことが明らかにされてきた^{29,55}。本章では疎水性凝縮状態のPNIPAAm表面に対する細胞接着が、細胞接着性タンパク質FNの表面吸着量に依存せず、表面の水平変形能によって制御されることを示した。表面の水平変形能は準リビングラジカル的に進行する光イニフィーター重合によって調節し、高分子鎖長と表面の水平変形能が相関することを見出した。

一般に、PNIPAAm表面に対する細胞接着は表面へのタンパク質吸着で議論され、表面が疎水化する37°Cでは表面に吸着したタンパク質を介して細胞接着が可能であり、LCST以下の温度ではタンパク質が表面から脱着するため細胞接着が抑制されると理解されてきた。しかし実際には37°Cであっても高分子量のPNIPAAm表面では細胞接着が阻害され⁵¹⁻⁵³、上記の説明と矛盾する。いくつかの研究では蛍光や放射性同位元素アッセイ、エリプソメトリー、水晶振動子マイクロバランス (quartz crystal microbalance; QCM) 等での測定を行い、この37°CでのPNIPAAmの分子量依存的な細胞接着抑制もタンパク質の表面吸着の観点から説明が試みられている^{53,61,62}が、通常の測定手法ではPNIPAAm表面に平衡吸着したタンパク質量を厳密に定量することは困難である。例えば表面吸着せずバルクに存在するタンパク質を除去する工程では、リンス中にバルクが希釈されると平衡吸着量の変動し、あるいは温度差が生じると脱着するため、表面吸着量が過小評価される可能性がある。また、QCMでは吸着タンパク質の質量がin situで観測可能であるが、大きな分子量を有するPNIPAAm層は振動で変形する場合があります、タンパク質吸着由来でない共振周波数シフトの正確な較正が難しい。そこで、本研究ではバルクの洗浄が不要かつ界面のみをin situで観測可能なTIRFを用いて、表面に吸着するタンパク質を直接観察した。TIRFでのタンパク質吸着試験では、ウシ胎児血清(FBS)を含む一般的な細胞培養液中に含まれるFN濃度と同等の20 nMのFITC標識FNを使用した。吸着平衡に達した後の吸着FNによる表面被覆率は、PNIPAAmの重合度DGPによらず、すべてのPNIPAAm表面で20%以上であった。LehnertらによるとFNの表面被覆率が15%以上に達していれば細胞接着・伸展に十分であり、したがって高分子量PNIPAAm表面で観察された細胞接着抑制はタンパク質の表面吸着量で説明することができない¹⁴。

そこで細胞接着抑制の要因の候補として表面の水平変形性を考えた。PNIPAAm表面に細胞が接着する際、細胞-基材間の接着装置であるインテグリンを介して細胞収縮力が負荷され、表面の水平変形が引き起こされる。細胞収縮力の大きさは接着斑の成熟度に依存し、さらに

細胞外微小環境の力学特性からも制御されている^{29,55}。

37°Cにおける疎水性凝縮状態のPNIPAAm表面をLFM測定にて評価し、高分子量PNIPAAm表面では低分子量PNIPAAm表面と比べて長距離変形が起きやすく水平変形能が増大していることを明らかにした。このLFM測定における水平変形能と細胞接着との関係をひもづけるためには、LFMの水平負荷を電圧値から力に変換する必要がある。そこで梁の力学の弾性理論⁶³に基づいて水平方向の力変換係数 K_c を以下のように算出した。

$$K_c = \frac{Ewt^3}{6l^2(h + t/2)} S_n$$

ここで E はシリコンのヤング率 (1.69×10^{11} N/m²)、 w はカンチレバーの幅 (33 μm)、 t はカンチレバーの厚さ (2.65 μm)、 l はカンチレバーの長さ (485 μm)、 h は探針の高さ (14 μm)である。 S_n はnormal sensitivityの実測値 (63.07 nm/V)を使用した。これらから算出された K_c をもとにlateral torsion値を力へ変換すると、Figure 2.11 (b)に示したすべてのピークにおいてカンチレバーのねじれ持続に要した水平負荷は30 nN以下であった。この水平力の大きさはFAを介して基質に負荷される典型的な細胞牽引力⁶⁴の範囲内であった。したがってLFM測定で計測された40 nm (PNIPAAm120)~230 nm (PNIPAAm240)の水平変形は、細胞-基材接着界面で実際に生じ得る。

これまでに、細胞接着界面におけるナノスケールの局所的な細胞接着リガンド密度が細胞接着形態を制御することが報告されている。Arnoldらは、隣接するRGDリガンドが60 nm以上離れると細胞接着が阻害されることを報告し¹⁵、Schvartzmanらは少なくとも4つの局在するRGDリガンドクラスターが細胞の接着と伸展に必要であることを示した²⁰。これらは固相表面に人為的にRGDリガンドを配置して調べた結果であるが、クライオ電子トモグラフィで観察されたFA内部の接着関連粒子の分布²²ともよく一致していた。さらにインテグリンとアクチンをつなぐタリンのサイズとも良い一致を示す。

本研究ではPNIPAAm表面に対して細胞接着・伸展に十分なFN吸着が確かめられた。PNIPAAm表面に対するFNの相互作用は比較的強く、PNIPAAm表面から細胞が脱離してもFNはPNIPAAm上に残留する様子が確認されている⁶⁵。そのため細胞牽引力の負荷によってPNIPAAm表面に水平変形が生じる際、FNはPNIPAAmとともに水平移動すると予想される。

LFM測定の結果より、PNIPAAm150では約140 nmの引伸変形が生じ得る(Figure 2.11(d))が細胞は中程度以上の接着性を示し(Figure 2.8)、細胞が伸展できず球形形状をとる

PNIPAAm240 では表面の水平変形量が $226.3 \pm 95.6 \text{ nm}$ に達していた。これらの値は前述の、インテグリンが約 60 nm 以下の間隔で集合するという接着斑の安定形成の条件より大幅に大きい。これに対して PNIPAAm-FN の相互作用が比較的強くて FN が表面から脱離しにくく、PNIPAAm の引伸変形が生じる際には同時に PNIPAAm がかき集められる領域が発生することを考えれば説明が可能である。単一の接着斑を考えると接着斑の前方が後方よりもその牽引力が大きいので、接着斑の前方で PNIPAAm の引伸変形とそれに伴う FN の低密度化が生じる。このときリガンド間隔が 60 nm を超えるとインテグリンクラスターは崩壊に向かう。一方で接着斑後方では前方から引き伸ばされた PNIPAAm と FN がかき集められるため、後方側のインテグリン結合は比較的安定に保たれる。

接着斑の安定形成にはリガンド密度だけでなく、分子クラッチモデルで説明されるタリンの力に応答した構造変化も必要である。上記の PNIPAAm と FN のかき集めの効果があれば PNIPAAm240 でも細胞伸展して良さそうだが、実際には細胞は球型の形状をとり、接着斑の形成も確認されなかった(Figure 2.8(c))。変形性が高い PNIPAAm 上ではインテグリンとアクチンとの間をつなぐタリンの構造変化が生じる前にインテグリン-FN の結合対が水平移動してしまい、接着リガンドが一定の密度を保てず、接着斑の成長が阻害されると推察される(Figure 2.12)。

2.6 結言

本研究は系統的にグラフト重合度の制御された PNIPAAm グラフト修飾基材を作製し、 37°C において高分子鎖の長さや細胞接着性との間に負の相関関係があることを確認した。ここで、疎水性凝縮ポリマーの水平変形特性が細胞接着状態に重要な役割を果たしていることを明らかにした。細胞接着界面における局所的な高分子層の歪みが、表面に存在する接着リガンドの分布を変化させ、接着斑の活性と安定性に影響していると考えられる。

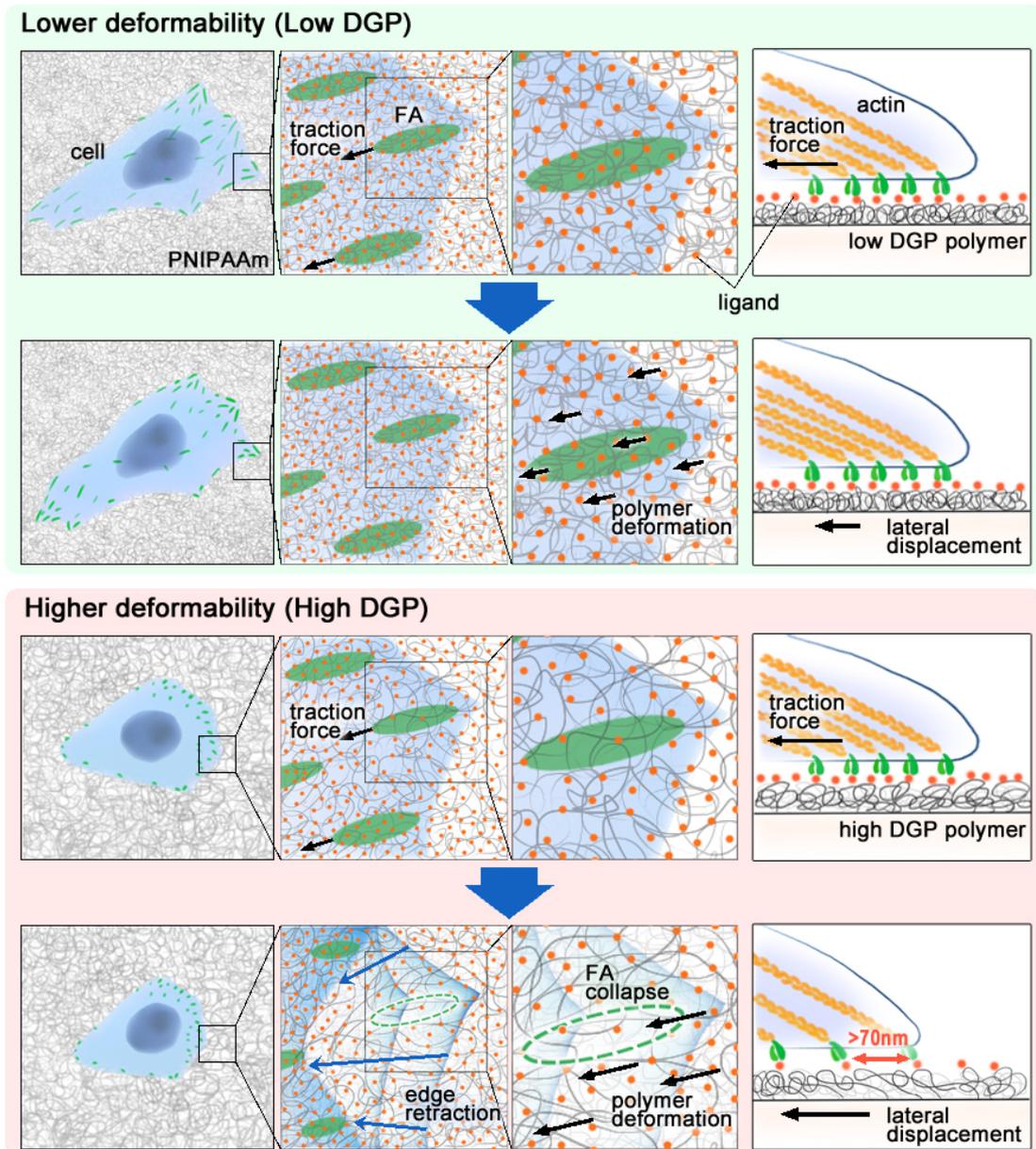


Figure 2.12 ポリマー凝縮層の水平変形によって生じる FA の不安定化の模式図. PNIPAAm 凝縮面上の細胞の前縁を上および側面から見た図を示した. DGP が低い表面では, 細胞牽引力に伴う高分子凝集層の水平変形が小さく, インテグリン-リガンド対の密度は保持される. DGP が高い表面では細胞牽引力によって高分子凝集層が大きく水平変形し, インテグリン-リガンド対の間隔が広がる. このときインテグリン間隔が 70 nm 以上に引き離されると FA の不安定化とそれに伴う細胞伸展阻害が生じる.

第3章 細胞-基材接着界面の局所 pH 分布の可視化

3.1 概要

細胞-基材間接着で主要な役割を担うインテグリンの近傍では Na⁺/H⁺交換輸送体 NHE1 の局在と活性化³⁶⁻³⁸、および細胞膜上の糖鎖の圧縮が生じる^{49,50}。NHE1 の活性化は細胞外にプロトンを供給し、ポリアニオンである糖鎖の圧縮は局所的に電荷密度を上昇させるため対イオンとしてのプロトン濃度が高くなり、インテグリン周辺では酸性化していると考えられる。インテグリンは弱酸性条件下で活性化および接着リガンドへの高親和性を示す⁴¹ことから、細胞-基材接着界面の pH 情報は細胞接着状態を知る手がかりとなる。しかし細胞-基材接着界面のミクロな pH 分布は未だ分かっていない。モデル脂質分子、レクチンを利用した細胞へ pH 応答性色素の導入も検討されている⁴⁰が、細胞膜の不均一性から表面全体の情報を得るのは難しく、またプローブの立体障害などが細胞膜の流動性とインテグリンのクラスター化に影響する懸念もある。そこで本研究では細胞側ではなく基材表面に pH プローブを導入し、ナノ界面における pH 空間分布の可視化を検討した。pH プローブには生理的条件下で pH 応答性を示す FITC を採用した (Figure 3.1)。

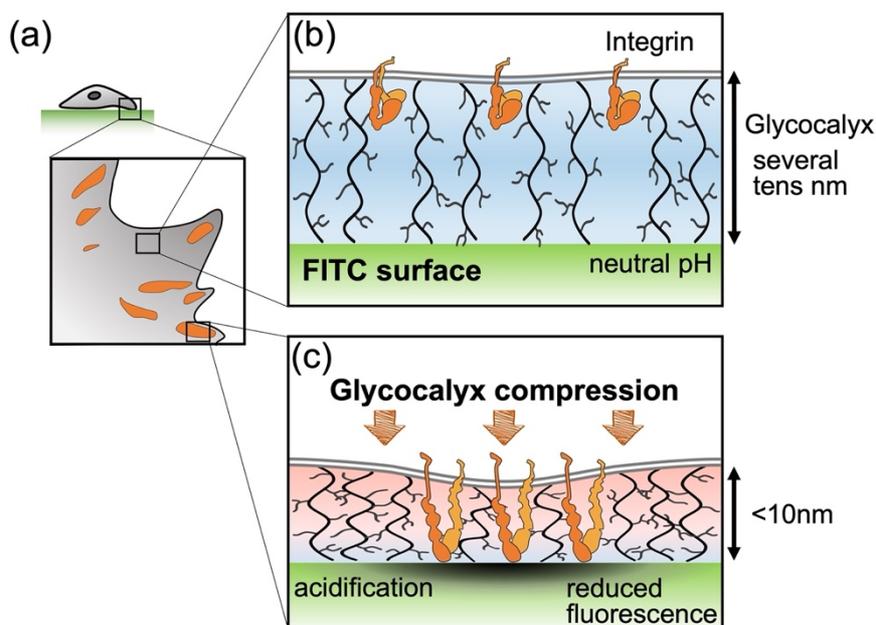


Figure 3.1 糖鎖の圧縮に伴う細胞-基材接着界面の局所的な pH 低下の概念図. (a)細胞の葉状仮足. 橙色の領域はインテグリン等からなる接着斑である. (b)糖衣の非圧縮領域. 中性の pH を示す. (c)接着斑周辺の糖衣の圧縮領域. 弱酸性の pH を示す.

pH プローブ修飾基材上での生細胞の観察においてはイオンチャネル、ポンプ、トランスポーター由来の H⁺濃度変化と、細胞膜上の糖鎖の混み具合に連動した H⁺分布変化の複合的な効果の観察が期待される。細胞を固定すると NHE1 の活動は停止し、一方で糖衣の圧縮/非圧縮の立体構造は維持されるため、細胞固定操作により糖鎖の効果のみを反映した観察が可能となる。

3.2 pH プローブ修飾基材の作製

3.2.1 試薬および材料

- ・カバーガラス (φ18 mm, No.1), 松浪硝子工業
- ・過酸化水素水 (30%), 富士フイルム和光純薬
- ・硫酸, 富士フイルム和光純薬
- ・アンモニア水 (28%), Sigma-Aldrich
- ・3-aminopropyl trimethoxysilane; APTMS, 富士フイルム和光純薬
- ・fluorescein isothiocyanate; FITC, 東京化成
- ・dimethyl sulfoxide; DMSO (超脱水), 富士フイルム和光純薬

3.2.2 基材作製方法

ガラス表面の洗浄および親水化処理

ガラス基材を 80°C の Piranha 溶液 (硫酸 : 過酸化水素水 = 7:3) で 2 時間反応させた。粘性の高い Piranha 溶液が表面に残留しないよう大量の水ですすいだガラス基材は、水中で最大 1 週間保管した。続くシランカップリング反応を行う直前にガラス基材を水中から取り出し、80°C の SC1 溶液 (アンモニア水 : 過酸化水素水 : 水 = 1:1:5) で 15 分間反応させた。ガラス表面を大量の水ですすいだ後、80°C 以下で十分に乾燥させた。

シランカップリング

1% (v/v) の APTMS 水溶液を調製し、これに洗浄・親水化処理ガラス基材を浸漬して 40°C で 1 時間反応させた。反応後のガラス基材は表面を水とエタノールで洗浄し、110°C で 30 分間加熱した。

FITC 修飾

低湿度下で 5 mg/mL FITC-DMSO 溶液を調製し、分注して -20°C で保管した。アリコートは使用直前に解凍し、水で 0.01 ~ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈して使用した。これを APTMS 表面に与えて遮光下、4°C で 30 分間反応させた。反応終了後は pH8.0 の Tris 緩衝液でクエンチした。FITC 修飾基材は数時間かけて水での振盪洗浄を行い、この間、何度も洗浄用の水を交換して水溶性の未反応 FITC を除去した。さらに疎水性相互作用によって表面に残留している未反応 FITC の除去のため、エタノール中での振盪洗浄も行なった。

3.3 pH プロブ修飾基材の表面分析

3.3.1 分析方法

ガラス表面への APTMS 修飾は接触角計 (Drop Master, DMe-211, 協和界面科学) による静的接触角測定と X 線光電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy; XPS, ULVAC-PHI) による表面元素分析から確認された。XPS の X 線源には単色化 X 線 (Al-K α) を使用し、光電子取出角は 10° とした。また、基板の表面形状は原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy; AFM) のコンタクトモードで観察した。AFM 測定のカンチレバーは qp-CONT (NANOSENCERS) を使用し、測定条件は室温、PBS 中で set point 100 pN、scan velocity 500 nm/s とした。

APTMS ガラス表面への FITC 修飾の確認およびその pH 応答性の評価にはマルチチャンネル分光測光装置 (PMA-11, 浜松ホトニクス) を用いた。すべての測定で 60 倍の対物レンズ (NA 1.45, Olympus) と WIB フィルターを使用し、ND フィルターにて 1/1000 倍に減光、露光時間 5000 ms、high amp gain の条件を適用した。

3.3.2 APTMS 修飾ガラスの表面分析

シランカップリング反応前後のガラス表面に対して接触角測定を行なったところ、未反応ガラスは速やかに水が濡れ広がり 10° 以下の値を示した一方、シランカップリング反応後のガラスは $48.3 \pm 2.1^\circ$ であった (Figure 3.2(a,b))。また XPS による表面元素分析ではシランカップリング反応後に N1s のシグナル強度の増大が確認された (Figure 3.2(c-f))。この N1s シグナルは APTMS のアミノ基に由来すると考えられる。これらの結果はガラス表面への APTMS 修飾の達成を示唆している。

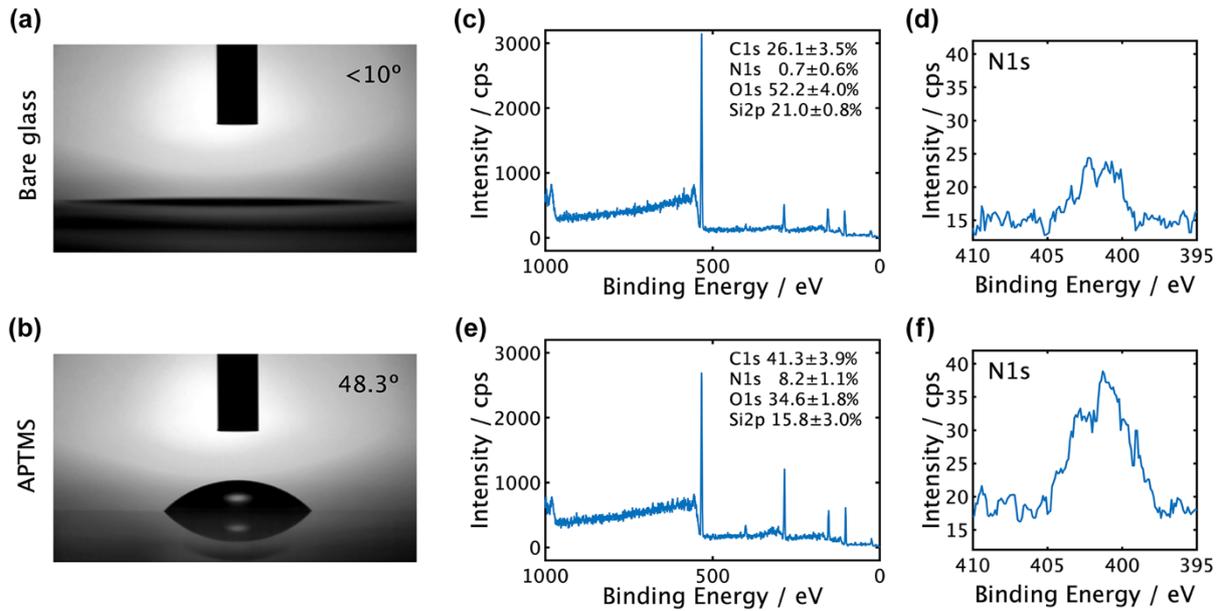


Figure 3.2 (a)未修飾ガラスおよび (b)APTMS 修飾ガラス表面の接触角測定. (c-f)XPS による表面元素分析. (c,d)未修飾ガラスおよび (e,f)APTMS 修飾ガラスそれぞれの wide スペクトルと narrow スペクトルを示した.

本研究では細胞-基材接触界面の pH 分布を正確に評価するために表面の平滑性が求められる。AFM による表面形状観察では先端径 10 nm 以下の細い探針を使用し、APTMS 表面の微細構造を検出した (Figure 3.3(a))。規則的な粒状構造が見られるもののそのサイズは小さく、通常の未修飾ガラスでも典型的に見られる構造である。表面粗さ (RMS) 値も約 450 pm であり (Figure 3.3(b))、インテグリンの結合や糖衣の圧縮に対する立体的な影響の懸念はない。測定は異なる 3 箇所で行い、表面形状と RMS 値ともに差は見られなかった

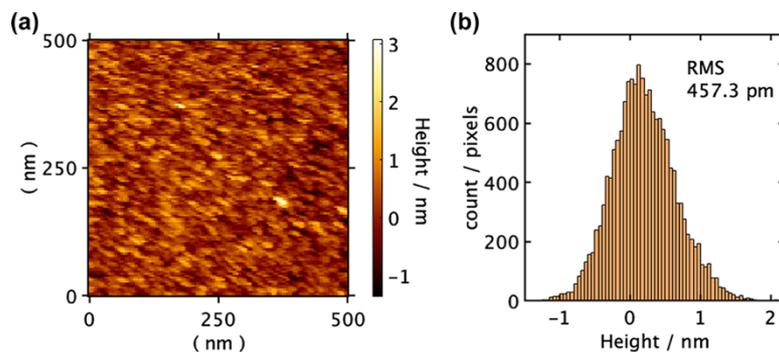


Figure 3.3 APTMS 修飾ガラスの表面形状と粗さの評価. (a)Height 像と (b)高さの分布.

3.3.3 FITC 修飾表面の特性評価

FITC の表面修飾は顕微分光測定によって評価した。APTMS のみの基材表面では蛍光のシグナルは検出されなかったが、FITC 反応後の APTMS 表面では、FITC の最大蛍光波長である 530 nm で最大値をとる蛍光スペクトルが得られた (Figure 3.4(a))。さらに pH の異なるリン酸緩衝液 (PB) を表面に滴下すると、pH が低いほど蛍光強度が低下した。これらの結果から表面への FITC 修飾反応の進行と、それによる pH 変化の検知が確認された。続いて pH 感度の最適化のため FITC 修飾条件を検討した。反応温度 4°C と反応時間 30 分間の条件は固定し、FITC 溶液の濃度を 0.01 ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で比較した (Figure 3.4(b))。FITC 修飾表面は反応時の FITC 濃度によらずいずれも pH8 で最大の蛍光強度を示し、pH7 以下では次第に蛍光強度が低下した。しかし、その pH 依存的な蛍光強度の変化は 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度条件で最も顕著だった。0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件では表面への FITC 修飾量が少ないために蛍光強度が弱く、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では表面の FITC 修飾密度が高いことで濃度消光を生じていると考えられる。そこで以降の実験は pH 変化の検出感度が最も高い 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件を採用した。

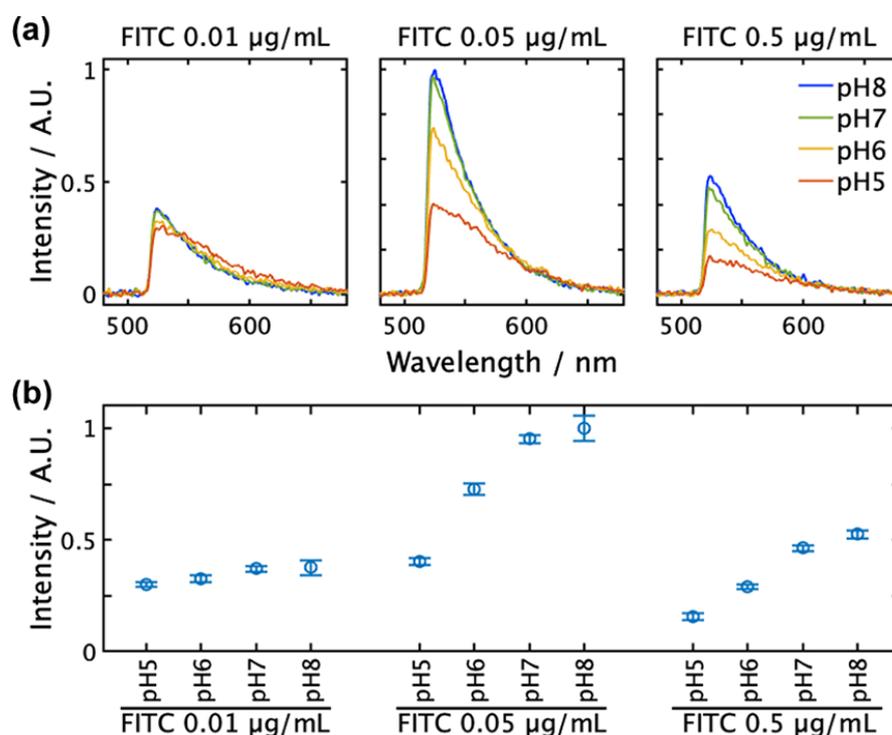


Figure 3.4 異なる FITC 濃度条件で作製した基材表面の FITC 蛍光発光の pH 依存性. (a)顕微分光測定による蛍光スペクトル. (b)530 nm における蛍光強度. データはすべて最大のシグナル強度を示す FITC 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - pH8 の 530 nm での値で規格化した。

3.4 細胞-基材接着界面での pH 評価

3.4.1 細胞培養

本研究では理研バイオリソース研究センターより入手した線維芽細胞 (NIH/3T3) およびがん細胞 (HeLa) を使用した。細胞はすべて 10% ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, low glucose, 富士フィルム和光純薬) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。FITC 修飾基材上での観察実験には、どちらの細胞も 2000 cells/cm² の密度で播種し、培養時間は 12 時間とした。

3.4.2 免疫染色

細胞接着評価のため、FA とアクチン細胞骨格を以下の手順にしたがって染色した。特に断りのない限り、各操作は室温で行った。

12 時間培養された細胞培養皿から培地を除去し、PBS で洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド (PFA; 富士フィルム和光純薬) で 10 分間の細胞固定を行なった。その後、50 mM グリシン (ナカライテクス) in PBS を加えて 30 分間静置し、PFA の反応をクエンチした。続いて 0.5% Triton X-100 (Sigma Aldrich) を含む PBS で 10 分間の透過処理を行い、1% ウシ血清アルブミン (BSA, 富士フィルム和光純薬) と 10% ロバ血清を含む PBS で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液除去後、0.1% BSA を含む PBS で 0.5 µg/mL に希釈した vinculin の一次抗体 (mouse monoclonal anti-vinculin, Santa Cruz Biotechnology) 中、4°C で一晩反応させ、さらに 0.1% BSA を含む PBS で 1 µg/mL に希釈した Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) 中、室温で 1 時間反応させた。さらに 50 nM rhodamine-phalloidin (Cytoskeleton) を添加し、30 分インキュベートした。

3.4.3 顕微鏡観察および画像解析

顕微鏡観察は蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-X710, KEYENCE) を用いて行い、60 倍の対物レンズを使用した。蛍光画像は high sensitivity モードで取得し、すべて同一の撮影条件から得た画像を用いて pH 分布の解析を行なった。

FITC 像の蛍光輝度分布を pH 分布に変換するにあたって、事前に FITC 修飾基材の pH 応答的な輝度変化を蛍光顕微鏡でも調査した。3.3.3 項の顕微分光法での試験と同様に pH の異なる PB を滴下し、蛍光強度を評価したところ、蛍光顕微鏡観察と顕微分光法の結果は良好な一致を示した。さらに、pH7.4 と pH8 では蛍光顕微鏡観察における輝度の差がなかった。実際

に FITC はおよそ pH7.4 以下で pH 依存性を示すことが知られている。そこでより定量性に優れる顕微分光法から得られた pH 依存的なシグナル強度をもとに蛍光輝度から pH への変換を行なった。

画像解析には MATLAB (Mathworks) を使用した。まず、アクチン染色像を用いて次の操作を行い、細胞接着領域の特定とセグメント化を行なった。edge 関数と sobel 演算子を使用し、背景に対してコントラスト差を有する領域を検出した。次に検出された輪郭線のギャップを膨張処理 (imdilate) で埋め、さらに関数 infill でオブジェクト内部の空洞を埋めた。画像から見切れている細胞は正確な面積の定量ができないため、関数 imclearborder で除去した。最後にオブジェクトの平滑化のため収縮操作 (imerode) を行った。

続いて FITC 像の蛍光輝度の pH 変換を行なった。まずバンドパスフィルターによってピクセルノイズと照明ムラを除去した。アクチン画像をもとに特定された細胞非接着領域の輝度値で画像全体を規格化した。細胞非接着領域は画像取得時のバルクの pH7.4 に対応し、かつ FITC は pH7.4 と pH8 で同じシグナル強度を示すことがわかっている。また顕微分光測定より得た結果は、中性 pH のシグナル強度を 1 とした場合の pH とシグナル強度の関係が

$$y = -0.058x^2 + 0.969x - 2.997 \quad (*)$$

で近似された ($R^2 \sim 1$) ため、これらの情報をもとに画像の規格化された輝度値を pH 値に変換した。

pH 分布と細胞接着の関係を調べるために、vinculin 染色像から個々の FA のセグメント化を行なった。トップハットフィルターによるバックグラウンドノイズ除去、目的とするオブジェクトが抽出可能な閾値での二値化、オープニング処理による細かい輝点除去の 3 段階の操作を実行した。

3.4.4 結果

細胞-基材界面の pH 変化と細胞接着状態との関係を評価するため、NIH/3T3 細胞を用いてライブセルイメージングを行なった。まず、FITC 修飾基材上に高さ 10 μm のスペーサーを設置し、スペーサーの内側へ細胞懸濁液を滴下した後、上からカバーガラスを押し付けた (Figure 3.5(a))。NIH/3T3 細胞の直径はおよそ 20 μm 程度だったため、高さ方向の空間を 10 μm に制限すると細胞は確実に基材表面と接触する。一定時間毎に観察を行なったところ、細胞播種および高さ制限直後では FITC の輝度変化が見られず、約 15 分経過後から細胞形状と一致した FITC の輝度低下が確認された (Figure 3.5(b))。さらにその輝度低下領域は明視野で

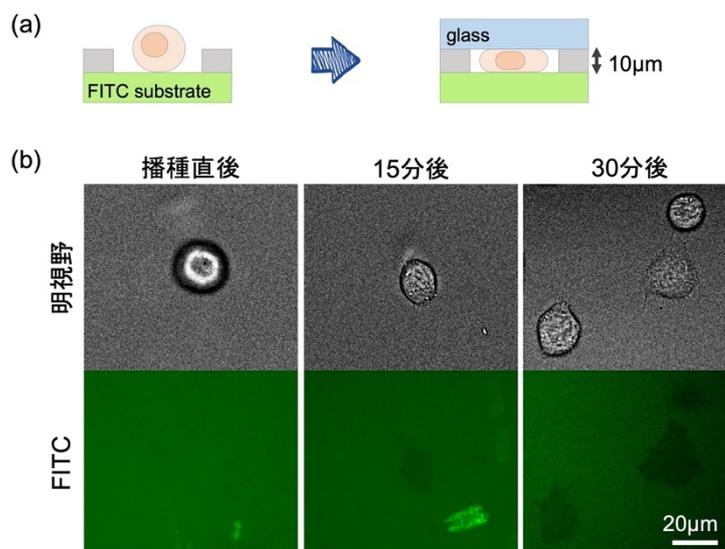


Figure 3.5 FITC 修飾基材上での NIH/3T3 細胞のライブセルイメージング. (a)実験の模式図. スペーサーを用いた高さ方向の制限により, 細胞を基材表面に接触させた. (b)細胞と基材表面の観察.

確認された細かな糸状仮足の形状も反映していた。これらの結果は FITC 修飾基材で観測可能な pH 変化にインテグリンを介した細胞接着が必要であり、単なる細胞膜の接触だけでは不十分であることを示唆している。

細胞の初期接着過程においてインテグリンの結合はわずか数十秒程度で開始するが、初期のインテグリンクラスターサイズは約 100 nm で一般的な顕微鏡の回折限界を超えており、結合寿命も短くすぐにクラスターが崩壊する^{66,67}。本研究では細胞接着に伴う pH 低下を FITC の消光で観測しており、消光領域が小さすぎると周辺の水の広がりによって検出できない。今回の観察では約 15 分後から FITC 修飾基材の輝度変化が確認されたが、細胞接着界面でのインテグリンクラスター数が増え、クラスターサイズが安定化するとともにインテグリンのエンドサイトーシスが最小化する時間⁶⁸と一致していた。

続いて、NIH/3T3 細胞が十分に伸展した後にタイムラプス観察を行なった(Figure 3.6)。細胞の接着領域の大部分で FITC の輝度が低下しており、細胞の遊走と同時に輝度低下領域も移動した。細胞運動と輝度低下の程度には関連があるようであり、退縮する仮足周辺(Figure 3.6 赤矢印)での輝度低下レベルは小さく、伸長過程にある仮足周辺(Figure 3.6 白矢印)では強く消光していた。これらの FITC 像を、事前に顕微分光測定から得た FITC 輝度と pH の関係式(*)を用いて校正し、細胞接着界面の pH 分布図を作成した(Figure 3.6 下段)。細胞辺縁部で酸性化していること、および細胞進行方向の仮足付近は特に酸性度が高いことが確認され、遊走中の細胞の前縁部で酸性化するという先行研究⁴⁰に合致していた。

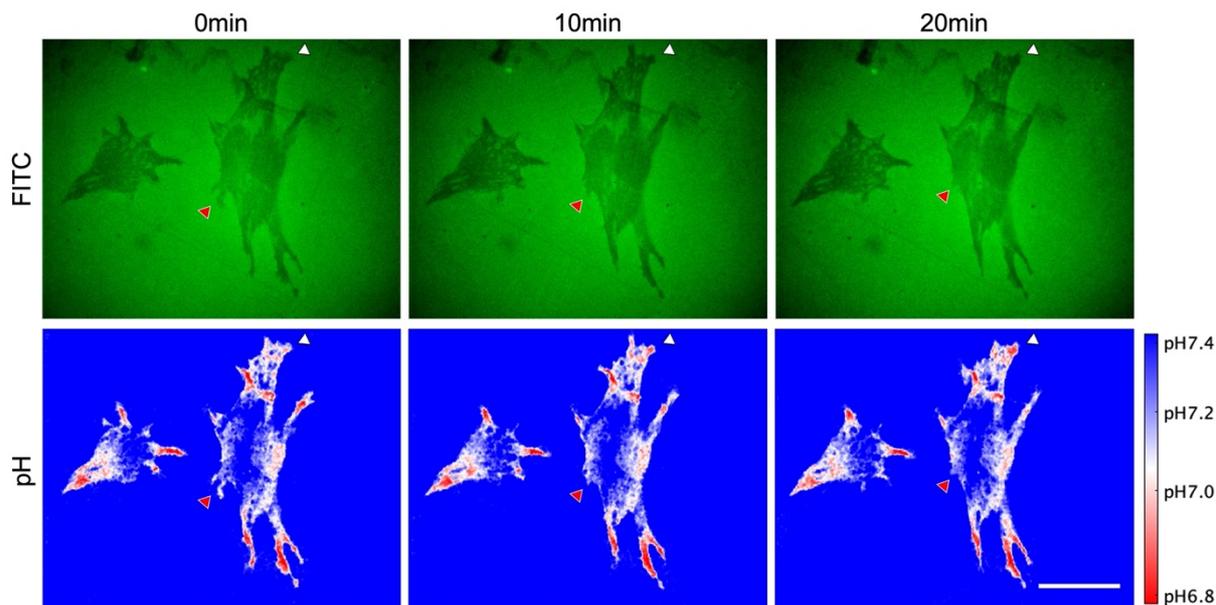


Figure 3.6 NIH/3T3 のライブセルイメージングにおける FITC 像と pH 分布図. 白い矢印部分では仮足の退縮, 赤い矢印部分では仮足の前進が見られる. scale bar = 50 μm .

次に PFA で固定された細胞を用いて、細胞の接着状態と FITC の輝度変化の解析を行なった。生細胞を用いた観察ではイオン輸送体 NHE1 のプロトン放出と糖衣の圧縮に伴う電荷密度の上昇の複合的な観測であったが、固定操作により細胞機能を停止すると観測対象は糖衣の圧縮効果に限定される。糖鎖の分布とその立体構造が保持されていれば、糖鎖のカルボキシ基や硫酸基を遮蔽するための対イオン分布も維持されるためである。がん細胞は正常細胞に比べて厚い糖衣を有する^{45,49,69,70}ため、糖衣の厚さと圧縮効果を検証するべく NIH/3T3 細胞とともに HeLa 細胞の観察も行なった。以下に典型的な NIH/3T3 細胞と HeLa 細胞の FA (vinculin)染色像、アクチン染色像、FITC 像、pH 分布図を示す (Figure 3.7(a))。

NIH/3T3 細胞の FITC 像について、ライブセルイメージングでは細胞接着界面の大部分で輝度の低下が生じた (Figure 3.6) のに対し、固定細胞を用いた観察では輝度の低下領域が細胞辺縁部に集中していた (Figure 3.7(a))。この局所的な FITC の輝度低下領域は vinculin 染色像の接着斑の位置とほぼ一致していた。生細胞では *in situ* で NHE1 から放出・拡散されて生じるプロトン濃度勾配を検出可能なため、比較的広がった領域で FITC 輝度低下が確認されたのだろう。一方、固定細胞では糖衣が圧縮され得る FA 近傍の限定された領域でのみ FITC の輝度低下が生じたと考えられる。

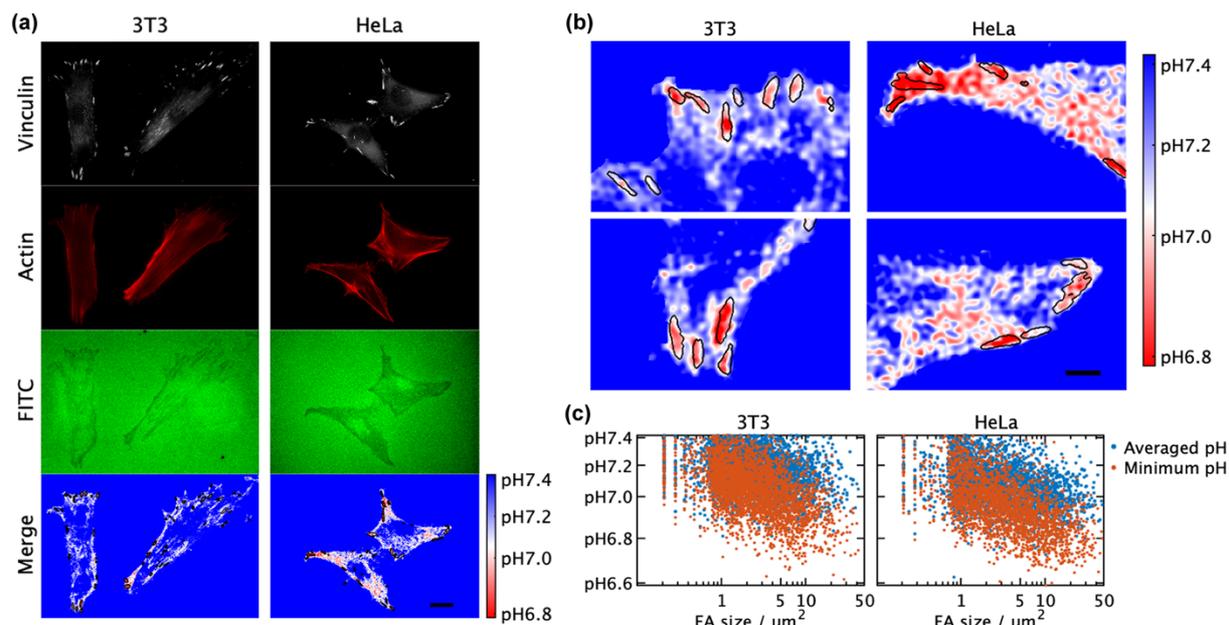


Figure 3.7 FITC 修飾基材による細胞接着界面の pH 分布の可視化. (a) 3T3 細胞および HeLa 細胞の vinculin, actin, FITC, pH 分布図. pH 分布図には FA の輪郭も重ねて表示した. scale bar = 20 μm . (b) 3T3 細胞および HeLa 細胞の仮足部分を拡大表示した pH 分布図. scale bar = 5 μm . (c) 3T3 細胞および HeLa 細胞の個別の FA 内部における pH レベルと FA サイズの相関解析. 解析に用いた細胞数 N および FA 数 n : 3T3 : $N = 58, n = 3437$; HeLa : $N = 84, n = 2596$.

固定された NIH/3T3 細胞と HeLa 細胞での FITC 像を比較するとどちらも細胞辺縁部で輝度の低下が確認されたが、HeLa 細胞の方が輝度低下領域に広がりをもっていた。この FITC 像を、FITC 輝度と pH の関係式(*)をもとに較正し、細胞接着界面の pH 分布図を作成した (Figure 3.7(a, b))。pH 分布図には FA の輪郭も重ねて表示した。NIH/3T3 細胞は FA と一致する微小な領域で pH6.9-7.1 程度の弱酸性化を示し、HeLa 細胞では FA を中心とした広い領域で pH 6.8 程度の弱酸性化を示した。がん細胞の糖衣は嵩高いヒアルロン酸やムチンを多く含み^{45,69,70}、基材表面へのインテグリン結合のためには糖衣を強く圧縮する必要がある⁴⁹。さらに糖衣の強い圧縮は糖鎖を高密度化させ、重なり濃度を越えた糖鎖は排除体積効果により糖衣の非圧縮領域へと逃れようと移動する⁷¹。その結果として糖衣の非圧縮領域でも部分的に糖鎖の高密度化が生じ、正常細胞に比べて広い領域で pH 低下が検出されたと推察される。

固定細胞での pH 低下領域と FA の位置との相関を定量的に評価するため、個別の FA 内部について平均 pH と最小 pH を計測し、それぞれ FA のサイズに対してプロットした (Figure 3.7(c))。NIH/3T3 細胞は FA 内部の平均 pH と最小 pH の差が小さく、HeLa 細胞ではその差が大きかった。これは NIH/3T3 細胞の FA 直下は pH がほぼ均一であるのに対して HeLa 細胞では単一の FA 直下であっても pH の分布をもつことを意味する。また、NIH/3T3 細胞に比べて

HeLa 細胞は FA サイズ vs. pH のプロットが広範囲に広がっており、酸性化の度合いも大きかった。これらの結果から FITC 修飾基材は細胞-基材接着界面の pH 分布を可視化でき、さらには正常細胞とがん細胞の区別にも利用できる可能性が示唆された。

3.5 考察

細胞が基質に接着する際、細胞膜上のインテグリンが接着装置として機能する。細胞-基質間での安定な接着にはいくつかのインテグリン-接着リガンド対が集合しクラスター化する必要がある。細胞膜表面にはインテグリンよりもはるかに嵩高い糖衣が覆っており⁴⁴⁻⁴⁶、インテグリンが基質と結合するには糖衣の外側へ表出しなければならない。このとき糖鎖の圧縮が生じる。ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などの負電荷の強い糖鎖の存在^{72,73}により、糖衣内部はバルク環境と比較してプロトンが豊富で低い pH を示す⁴⁰。インテグリン-接着リガンド間の相互作用は弱酸性環境下で促進されることも知られており⁴¹、細胞-基質界面における pH と細胞接着の関係を明らかにすることは、細胞接着制御に基づく細胞操作を考える上で重要な課題のひとつである。

本研究では細胞-基板接着ナノ界面の局所 pH 分布を可視化するために、pH 応答性蛍光色素 FITC を化学修飾したガラス基板を作製した。この基材上に固定された細胞の接着界面は細胞非接着領域に比べて低い輝度を示し、その内部で不均一な輝度分布が観察された。そこで細胞接着界面における pH 分布図を作成し、接着斑近傍で圧縮された糖衣由来の pH 空間情報を示すことに成功した。

細胞接着界面の pH 分布の不均一性は、FA の位置と相関することが確認された。FA の形成にはまずインテグリン-基材間の結合とそれに続くクラスター化が必要である。インテグリンはわずか 20 nm 以下の大きさしかもたない¹⁶⁻¹⁸一方で、糖衣の厚さは数十 nm 以上に達している⁴⁴⁻⁴⁶(Figure 3.8(a))。そのためインテグリンは糖鎖をかき分け圧縮し、接着リガンドと結合するという過程を経る(Figure 3.8(b))。この際、ポリアニオンである糖鎖が高密度化し、その遮蔽のためにプロトン濃度が増大し、さらに周辺環境の酸性化はインテグリンの活性とリガンドへの親和性を増大させ、接着斑分子の自己組織化を進行する(Figure 3.8(c))。以上をふまえると、細胞接着界面における FITC 輝度分布および pH の分布はインテグリン活性化の空間分布、およびナノスケールの糖衣の圧縮レベルを表すと考えられる。

NIH/3T3 細胞と HeLa 細胞との比較において、pH 変化領域の広がりや pH 低下レベルに明らかな差が生じていた。NIH/3T3 細胞では FA 直下とそのすぐ近傍においてのみ、わずかな

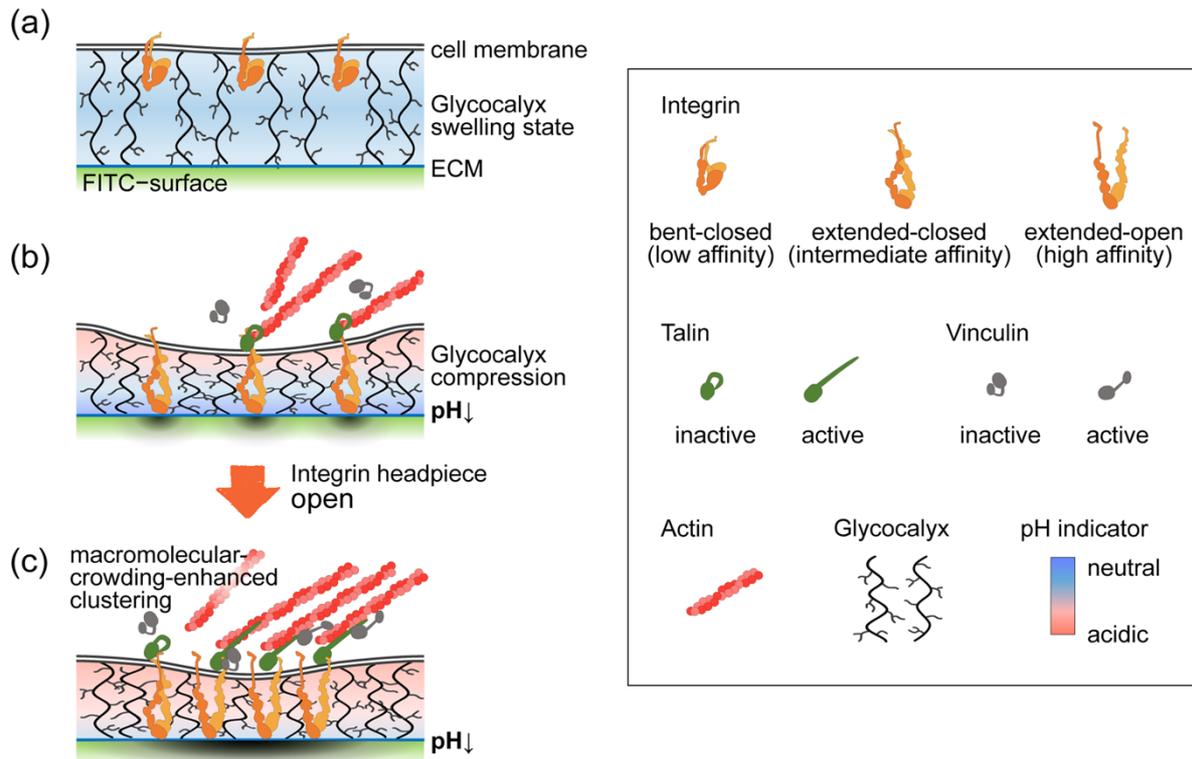


Figure 3.8 インテグリンの段階的な活性化と FA の成熟過程における、糖衣の圧縮と酸性化の役割. (a)インテグリンは不活性状態であり、糖鎖は圧縮されていない. (b)インテグリン-ECM 結合によってインテグリンのコンフォメーションが変化し、リガンドに対して中程度の親和性を示す. このとき糖衣の圧縮が生じ、pH がわずかに低下する. (c)周辺環境の pH 低下に伴ってインテグリンの活性化が進行し、タリン、ビンキュリン、アクチン等の集合・自己組織化を促進する. FA 分子の集合と FA の成熟は糖衣の圧縮を増強し、さらに界面の pH が低下する.

pH の低下を示した一方で、HeLa 細胞では比較的遠く離れた領域でも pH の低下が見られた。一般にがん細胞は正常細胞と比べて分厚く高密度な糖鎖の層を有する^{45,49,69,70}ため、固相表面への細胞接着には糖衣を大きく圧縮させねばならず、この差が反映されたと考える。

近年、糖衣が厚いほど FA の成長が進み⁴⁷⁻⁵⁰、がん遺伝子 KRAS の発現は糖衣の厚さを増す⁷⁰ことが示された。また転移性の高いがん細胞はより嵩高い糖衣を有する^{49,69}。FA の成長促進は細胞接着強度を増大させるが、細胞の接着強度と運動性は逆相関することと、がん細胞は高い運動性を持つことから矛盾が生じる。これは糖鎖の圧縮とそれに伴う反発力で説明できる。嵩高い糖鎖は圧縮に伴うプロトンの濃縮とそれに伴うインテグリンの活性化を引き起こすが、同時に圧縮負荷に対する反発力も生じる。FA の形成と成熟のためにはインテグリンのクラスター化が必要であり、インテグリン間距離を近づけるために糖鎖を横方向へ押し退ける。インテグリンのクラスター化の進行は、そのすぐ側方へ圧縮された糖鎖を集積させ

ることを意味する。圧縮糖鎖の密度が閾値を超えると、糖鎖は排除体積効果で伸びようとするはずである。インテグリンやタリンなどの FA 分子は一定の負荷がかかると結合親和性を高めるキャッチボンドの性質を示す³⁰⁻³²ものの、その負荷にも閾値があり、圧縮糖鎖の反発力から過剰な負荷を受けると分子間結合を解除して FA を崩壊に向かわせる。したがって、がん細胞の広い領域での pH 低下の観測は FA の形成と成熟を促進すると同時にその崩壊も手助けしている可能性が考えられる。

3.6 結言

FITC 修飾基材を作製し、これによって細胞接着界面の pH 分布を可視化することに成功した。細胞接着界面の pH 分布は正常細胞とがん細胞で異なる傾向を示したことから、細胞診断への応用可能性がある。この評価には固定細胞を用いており、pH 分布は主に FA 周辺で生じる糖鎖の圧縮に由来する。

今後の課題として、糖鎖の圧縮とそれに伴う反発力を吸収するような変形性を有するマトリックスとの接着界面の pH モニターが挙げられる。本実験では凹凸のない平滑な固相表面への細胞接着挙動を評価したため糖鎖の圧縮がより強調されたが、実際の生体組織内の細胞は軟らかくゆらぎのある ECM に対して接着している。生理的環境下に近い細胞接着条件の模倣と接着界面の化学的性質の観測は、細胞の形質を保持するためのバイオマテリアルの設計指針に活かせるだろう。

第4章 細胞接着形態制御材料の応用可能性

4.1 概要

細胞の接着形態操作は細胞の生存や増殖、運動性、分化の制御を可能とするため、細胞接着制御はバイオマテリアル開発において重要な課題のひとつである。第2章では細胞培養基材表面の変形特性と接着斑形成の安定性、第3章では細胞接着界面の pH と糖鎖の密度が細胞接着に関与することを示した。第4章では以上の細胞接着操作を実際に活用するにあたり、その応用展開先を検討した。ここでは1.3節で挙げた細胞接着制御手法のうち最もシンプルな、細胞接着リガンドの有無で細胞接着の ON/OFF のみを調節する設計を採用した。

温度応答性高分子である PNIPAAm 修飾基材を用いて表面へのタンパク質の吸着/脱着を切り替え、これに連動した細胞接着変化を利用することを考えた。PNIPAAm のグラフト表面は細胞シート工学の分野で広く用いられてきた^{12,13}。主な用途は 37°C での細胞培養と、その後の温度低下による細胞の剥離と回収である。しかし、PNIPAAm の温度応答性は可逆であり、一度低温で細胞接着を弱めても 37°C に戻すことで再接着させることが可能である。

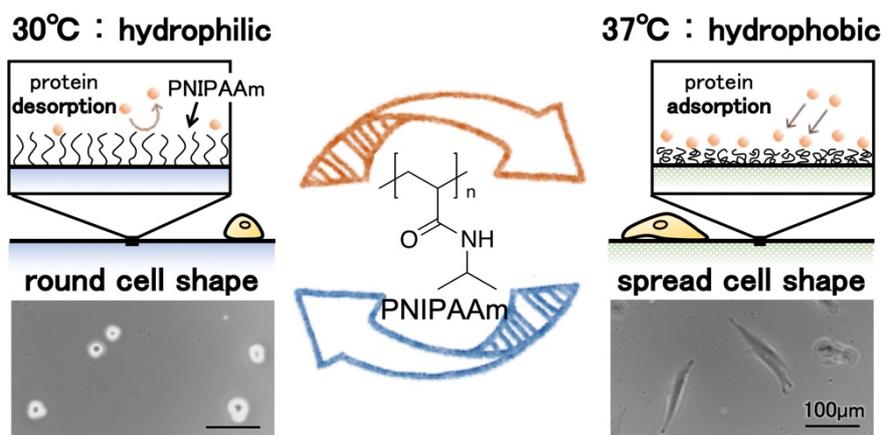


Figure 4.1 PNIPAAm の温度応答性と細胞接着.

4.2 細胞の接着形態制御による形質保持への応用

4.2.1 背景および目的

本研究では幹細胞の形質保持問題に着目した。再生医療等製品の原材料としての応用研究が進む幹細胞のひとつとして間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) が挙げられる。MSC は多分化能のほか、他家移植における高い免疫回避特性、抗炎症・創傷治癒サイトカイン産生による組織修復能を有するなどの長所をもつ。

MSC の分化は培養環境の化学的および物理的特性によって制御可能である。例えば細胞接着の幾何学形状^{7,74}、細胞接着リガンドの配置や密度^{75,76}、基材表面の弾性率⁷⁷などであり、これらの環境依存的な分化系統決定は共通して細胞接着形態に関連している。具体的には接着面積が大きく細胞骨格が発達した伸展型の形態では骨系統へ、接着面積が小さく球型の形態では脂肪系統へと分化偏向が生じる。また、この分化系統の偏りは培養期間の経過とともに不可逆に固定され、次第に幹細胞性を失う⁷⁸。一般的な細胞培養皿である TCPS は材質が硬く、細胞をよく伸展させるため、TCPS 上での MSC の長期培養は望まない分化を引き起こす懸念がある。

MSC の幹細胞性を保持する戦略として、分化系統が固定される前に細胞の接着形態を連続的に切り替えることを検討した。血清を含む一般的な細胞培養液で培養される細胞は ECM タンパク質を介して基材へ接着している。温度応答性高分子 PNIPAAm は約 32°C を閾値とした温度刺激により表面への ECM タンパク質吸着を制御できるため、それによって細胞の接着レベルの連続的な切替を試みた。

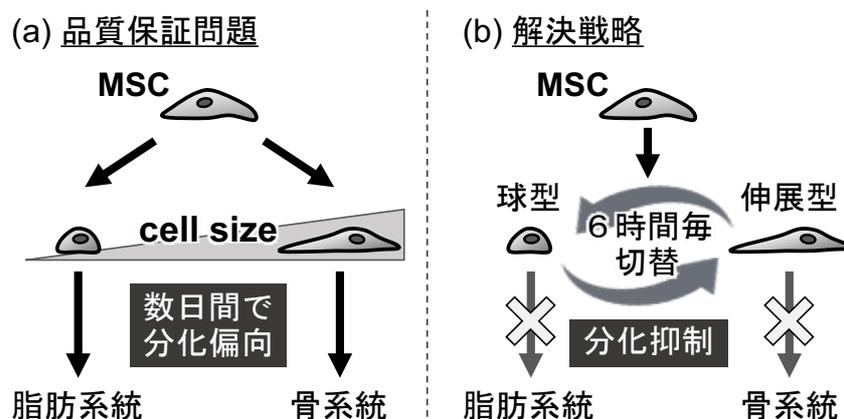


Figure 4.2 MSC の品質保証問題と解決戦略.

4.2.2 PNIPAAm グラフト表面への細胞接着の温度依存性評価

PNIPAAm グラフト基材は第2章と同じものを使用したため、作製方法とその化学的な評価は省略する。ただし、ここではPNIPAAm 基材を室温での AFM 測定より実測された圧縮厚で命名し識別する。

異なる圧縮厚を有する表面上での、37°C および 30°C における細胞接着形態を観察した。細胞は MSC の不死化細胞株 (#1149, P37; JCRB 細胞バンク) を使用し、播種密度は 2000 cells/cm² として 10% FBS を含む DMEM で培養した。コントロール実験として TCPS 上にも同じ条件で細胞を播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で一晩培養した後、細胞接着形態を観察した。その後、各培養基材を 30°C のインキュベーターへ移し、1 時間後に 30°C での細胞接着形態を観察した。

37°C での細胞接着は PNIPAAm のグラフト重合度が高いほど伸展が抑制された。これは第2章で示した通り、高分子鎖の長さが表面の変形性を増加させ、細胞牽引力負荷に伴うリガンド密度の乱れやタリンのコンフォメーション変化の抑制を生じるためである。室温での圧縮厚が 25 nm および 60 nm の PNIPAAm 表面上では 37°C での細胞伸展と 30°C での伸展抑制が観察され、室温での圧縮厚 25~60 nm を有する PNIPAAm 表面が温度応答的な細胞接着強度の切替に有効であることが特定された (Figure 4.3)。

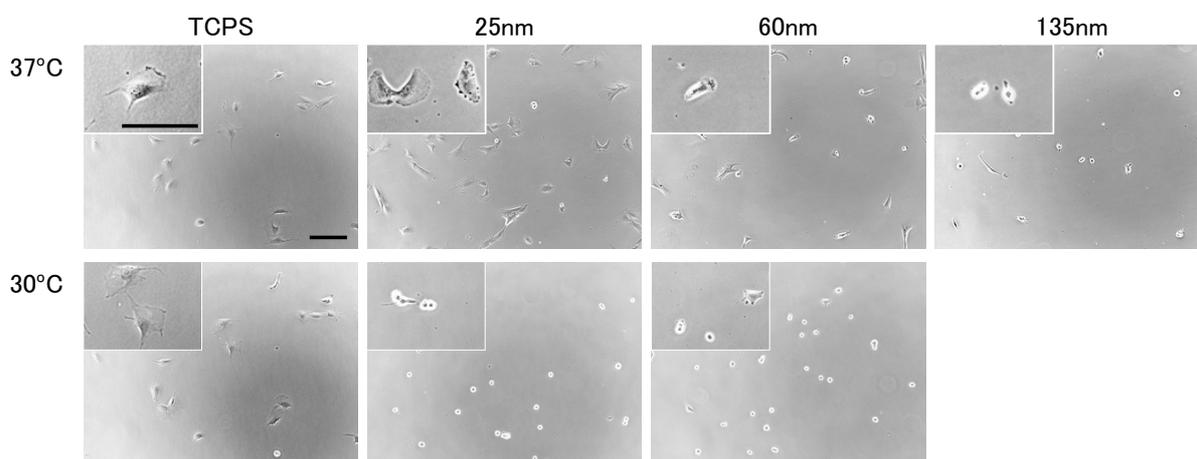


Figure 4.3 PNIPAAm 表面への細胞接着の温度応答性. 室温にて測定された PNIPAAm の圧縮厚をサンプル名として上部に記した. 上段は 37°C, 下段は 30°C での典型的な位相差画像. scale bar = 200 μm.

続いて温度応答的な細胞接着形態切替の可逆性を確認した。培地の温度をモニターしフィードバック制御可能な加温冷却チャンバー（東海ヒット）内で 5% CO₂ 条件下、細胞のタイムラプス観察を行なった。PNIPAAm サンプルは室温での圧縮厚 25 ~ 60 nm のものを使用し、細胞は 10% FBS を含む DMEM を用いて 2000 cells/cm² の密度で播種した。培養温度は 37°C と 30°C との間で、昇温および降温速度を制御しながら連続的に切り替えた。以下に培地中の温度の実測値と細胞接着面積の時間変化を示す (Figure 4.4)。細胞接着面積は 10 倍の対物レンズで撮影した画像を Fiji で解析した。

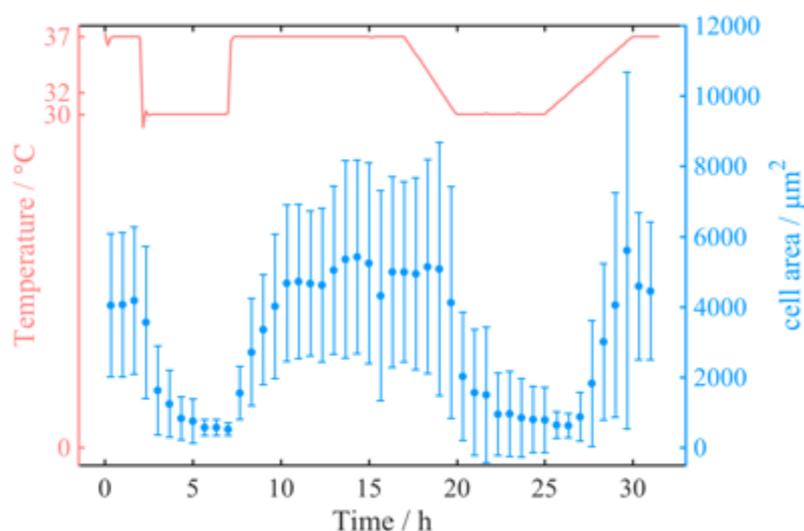


Figure 4.4 PNIPAAm 表面上での細胞接着の温度依存性. (赤) 培地の温度の実測値. (青)細胞接着面積.

Figure 4.4 は培地の温度に連動した細胞接着面積の可逆変化を示し、30°C では 37°C の約 10 分の 1 まで面積が減少していた。温度変化の最初のサイクルでは速い降温/昇温速度としたが、細胞接着面積の応答に遅延は見られなかった。次のサイクルでは 37°C と 30°C の温度切り替えに数時間を要する緩やかな降温/昇温速度を採用した。このサイクルでは 37°C から温度が下がり始めた時点ではなく、PNIPAAm の LCST である 32°C を下回った直後に急速な細胞接着面積の減少が観察された。昇温過程も同様に 30°C から温度が上がり始めた時点では細胞応答は見られず、32°C を超えた後に細胞伸展が開始した。以上の結果は PNIPAAm 上での細胞接着は連続的な切り替えが可能であり、接着状態の切り替えが生じる温度は 32°C で、これを超えると素早く応答することを表している。

4.2.3 YAP の細胞内局在評価

MSC の分化系統決定に関連する転写共役因子として YAP (Yes-associated protein) が知られている。YAP は MSC が骨分化すると核内に、脂肪分化すると細胞質側に局在する。また YAP は MSC の接着形態に応じて細胞内局在を変え、伸展型では核内に、球型では細胞質側に局在する^{79,80}。

MSC の未分化状態を保持する、つまり分化偏向を生じさせないためには、同一の細胞接着状態を長期間継続させず YAP などの分化を方向付けるタンパク質や遺伝子の履歴を残さないことが有効であると考えられる。PNIPAAm の温度応答的な細胞接着の切り替えが、YAP の細胞内局在を変化させ得るか検討した。

PNIPAAm サンプルは室温での圧縮厚 25 ~ 60 nm のものを使用し、この上に細胞を 1000 cells/cm² の密度で播種した。10% FBS を含む DMEM を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で一晩培養し、基材表面に細胞を接着させた。その後 10% FBS を含む L-15 培地に交換し、培養温度が 37°C と 30°C とで 6 時間毎に切り替わる温度揺動培養を行った。2 日間温度揺動培養を経た後の①37°C、②30°C、さらに次の③37°C の時点でそれぞれ YAP の免疫染色を行った。コントロール実験として一定の温度条件下で 2 日間培養した細胞についても YAP の免疫染色を行った。

免疫染色は以下の手順で行なった。細胞固定が完了するまでに使用する器具や溶液は事前にサンプルの最終的な培養温度と同じ温度 (条件①,③,④,⑥: 37°C、条件②,⑤: 30°C) に加温し、操作中の温度維持に留意した。

細胞培養皿をウォームプレート上に設置し、培地を PBS で洗浄・除去した後、4% PFA (富士フィルム和光純薬) を含む PBS を加えて 20 分間反応させた。反応後、1% BSA in PBS で洗浄し、膜透過液 (10% donkey serum, 1% BSA, 0.5% Triton X-100 in PBS) を加えて室温で 45 分間静置した。続いて anti-YAP1 (1:100, rabbit, フナコシ) の一次抗体染色液 (10% donkey serum, 1% BSA in PBS) を添加して 4°C で一晩反応させた。翌日 0.05% tween in PBS で洗浄した後、goat anti-rabbit AlexaFluor 488 (1:800, フナコシ) の二次抗体染色液 (1% BSA in PBS) を添加して 37°C で 1 時間静置した。細胞観察の直前に DAPI (富士フィルム和光純薬) を終濃度が 0.3 μM となるよう添加した。

培養温度条件と細胞固定および YAP 染色のタイミング (Figure 4.5(a)) と各培養条件における YAP と核の蛍光観察像 (Figure 4.5(b)) を次に示す。2 日間温度を一定に保持した培養条件 (④37°C TCPS, ⑤30°C TCPS, ⑥37°C PNIPAAm) では、いずれも YAP は細胞核に局在してい

た。④-⑥の3条件ともに細胞がよく接着伸展しており、インテグリンを介した細胞接着のシグナル伝達を受けてYAPが活性化したことによると考えられる。

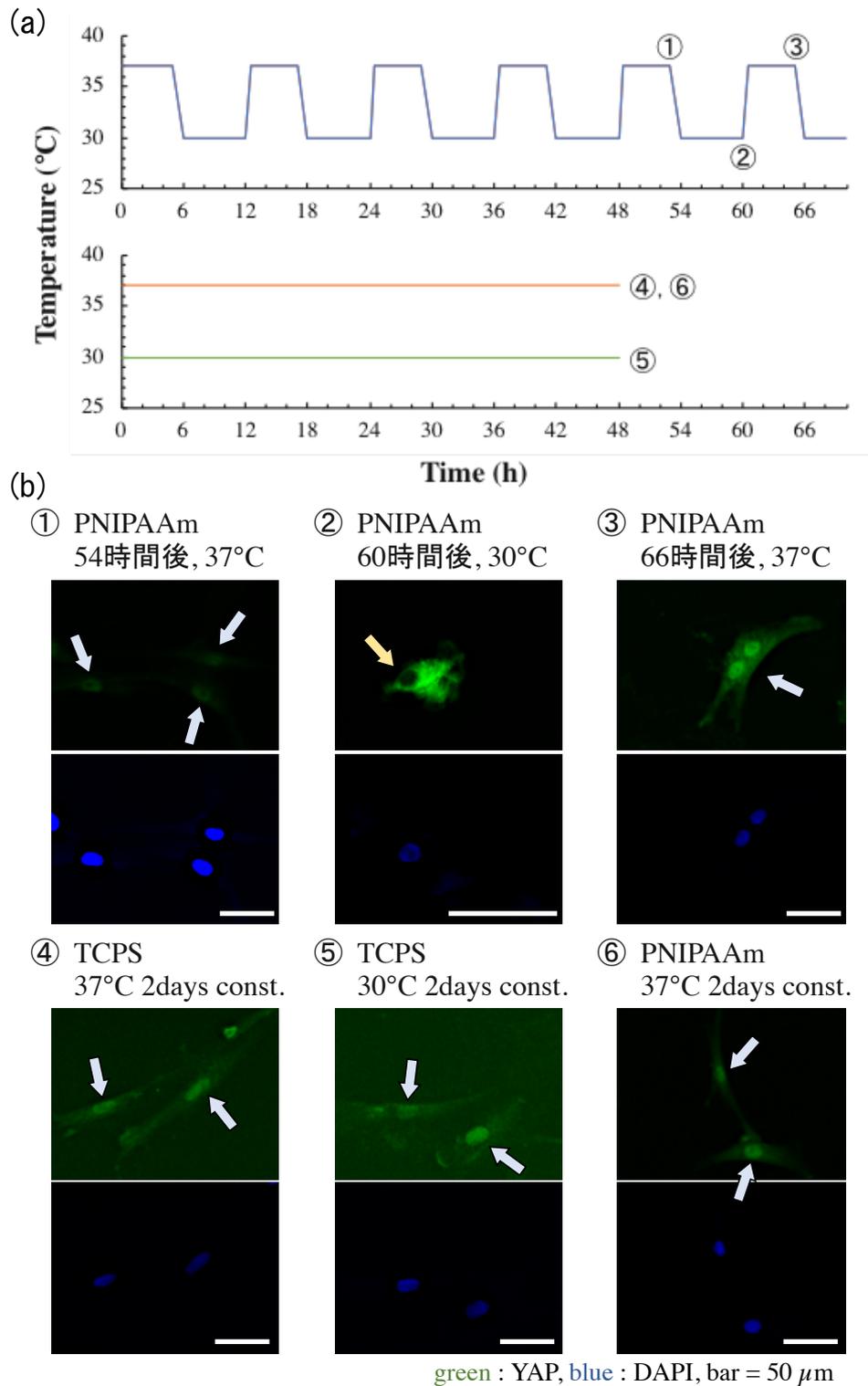


Figure 4.5 PNIPAAm 表面上での温度揺動培養と一定温度保持培養. (a)培養条件. (b)YAP の細胞内局在.

一方、2日間に渡って温度揺動培養された細胞に関しては、その後の①37°Cで伸展しYAPは核内へ、②30°Cで球状となりYAPは細胞質へ、③37°Cで再び伸展してYAPは核内へ、と細胞の接着形態の振動とYAPの核-細胞質間往復(シャトリング)の様子が観察された。PNIPAAmグラフト基材上での30°CにおけるYAPの細胞質局在は、TCPS上での30°C一定温度保持培養条件⑤でYAPが核に局在していたことから、単なる温度変化によって生じたものではなく細胞接着状態の変化に起因する。

4.2.4 結論

MSCは分化が進行すると、骨分化系統であればYAPは核に、脂肪分化系統であればYAPは細胞質に局在し^{79,80}、その局在は不可逆に固定される⁷⁸。また、MSCは長期間に渡って同じ培養環境下におかれると分化偏向が生じ、幹細胞性を失う。そこで定期的に細胞接着強度のON/OFFを切り替える培養法にて幹細胞性の保持を試みた。

PNIPAAmグラフト基材に細胞を播種し、培養温度を37°Cと30°Cとの間で変化させたところ、PNIPAAmのLCSTである32°Cを境に細胞接着形態の伸展型-球型の切り替えが生じた。この温度に依存したMSCの接着形態切り替えを繰り返したところ、培養3日目でもYAPの可逆な核-細胞質間往復を誘導することに成功した。これは未だ分化系統の切り替えが可能な状態の維持を示唆するものである。

近年、特定波長の光照射により硬さの切り替えが可能なゲル上で、硬さ切り替えを1日間経験した細胞のトランスクリプトーム解析が行われた⁸¹。10分毎および160分毎の硬さ切り替え周期に対して異なるシグナル伝達経路の応答が示され、その中には幹細胞の運命決定に関わる因子も多数含まれていた。ただしYAPについては1日間の硬さ切り替えへの応答は見られず、それ以前の硬さ環境を記憶していた。細胞培養基材の硬さも細胞接着形態を操作する手法の一つであり、本研究におけるPNIPAAm基材上での細胞接着切り替えと類似する。幹細胞の運命決定に関与するYAPが、硬さ可変ゲルでの10分毎および160分毎の接着切り替えには応じず、一方でPNIPAAm基材上での6時間毎の接着切り替えには応答を示したことから、シグナル入力には最適な周期の存在が窺える。本研究では6時間毎の細胞接着切り替え条件下でのYAPの応答のみを示したが、MSCの未分化性保持の実証には未分化マーカーの発現と時間応答の確認が必要である。

4.3 細胞の接着形態制御による細胞周期制御

4.3.1 背景および目的

4.2 節では PNIPAAm グラフト基材を用いた細胞形態の可逆な伸展型/弱伸展型切替を達成する細胞培養について記述し、その細胞接着形態変化が転写共役因子である YAP の細胞内局在も切り替えることを示した。YAP は MSC の運命決定の役割^{79,80}だけでなく、細胞の増殖活性も調節している。したがって、PNIPAAm 上での周期的な細胞接着形態の切り替えは細胞周期にも影響すると予測される。実際、6 時間毎に培養温度を切り替えながら 2 日間以上継続したタイムラプス観察において、培養温度が 30°C から 37°C に昇温する、すなわち細胞を球型から伸展型へ切り替える時点で活発に細胞分裂が生じることを発見した。細胞周期と細胞形態は密接に関与しており、細胞周期制御因子 Cyclin-dependent Kinase1 (CDK1) は細胞形態因子であるインテグリン、接着斑 (FA) や細胞骨格と連動する^{82,83}。以上から細胞の伸展型/球型切替を介して、細胞増殖に影響する YAP の活性レベルや細胞周期の進行を駆動する Cyclin-CDK1 複合体形成を制御できるだろうと考えた。

例えば、細胞本来の細胞周期の期間よりやや短い周期で、細胞の間期と分裂期を模倣する細胞接着形態変化を誘導すればより短期間での細胞増殖を達成すると考えられる。幹細胞の増殖は非対称分裂による分化の進行を伴うため幹細胞性維持と細胞数確保は両立が困難な課題の一つであるが、4.2 節で検討した細胞の伸展型/球型切替を連続的に行う培養法にて細胞増殖の活性化も達成すればこの課題が解決できる。そこで、細胞接着形態の連続切り替えとそれに伴う細胞周期への影響について検討した。

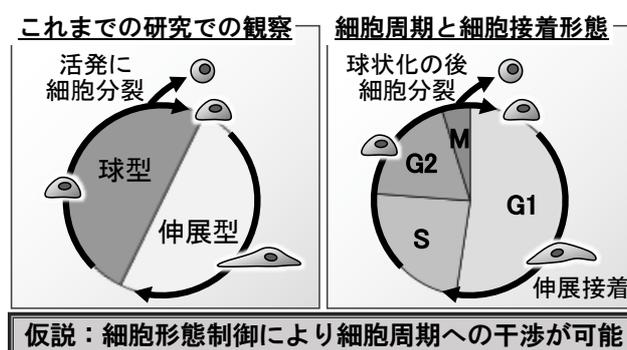


Figure 4.6 細胞接着形態の切替と細胞周期制御.

4.3.2 PNIPAAm 表面での細胞接着と細胞周期の可視化

4.2 節の実験では MSC を使用したが、MSC は培養温度 30°C が一定時間継続すると近隣の細胞同士で細胞間接着を生じ三次元的な細胞塊を形成する傾向が見られた。ここではインテグリンの結合を介したシグナル入力を想定しているため、ここでは細胞が積層しにくい HeLa 細胞を用いて検討した。細胞は細胞周期の間期を 3 色で識別可能な HeLa/Fucci(CA)2 を理研より入手して使用した。培地は 10% FBS を含む DMEM を用いて 37°C、5% CO₂ 環境下で維持培養した。

一般的な HeLa 細胞の細胞周期は間期が約 19 時間、分裂期が約 1 時間の合計約 20 時間である。そこでこれよりもやや短い 15 時間を 1 サイクルとして細胞の間期と分裂期を模倣する細胞接着形態変化の誘導を行なった。培養温度 37°C を 10 時間の後、30°C を 5 時間を 1 セットとしてこれを繰り返した。以下に 37°C と 30°C における典型的な HeLa/Fucci(CA)2 の様子を示す (Figure 4.7)。

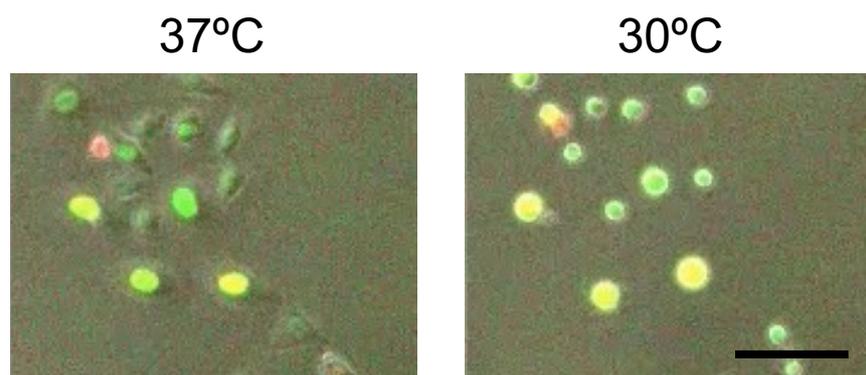


Figure 4.7 37°C と 30°C における典型的な HeLa/Fucci(CA)2. scale bar = 100 μ m

Fucci(CA)2 は G1 期を赤、S 期を緑、G2 期を黄色の蛍光で示すプローブである。37°C と 30°C で培養温度を切り替えながら撮影したタイムラプス画像をもとに、細胞接着形態変化の誘導に伴う増殖活性について評価を行なった。通常ガラス表面では細胞接着形態の温度応答性はなく、細胞数は連続的かつ緩やかに増加した (Figure 4.8(a))。PNIPAAm 表面上の細胞とガラス上の細胞は計測初期 (0h) ではほぼ同じ細胞数だったが、72 時間後にはガラス上と比べて細胞数が増加していた。さらに、15 時間の温度変化を 3 サイクル経験した 48 時間後、および 5 サイクル目の 72 時間後で不連続な細胞増殖が確認された。

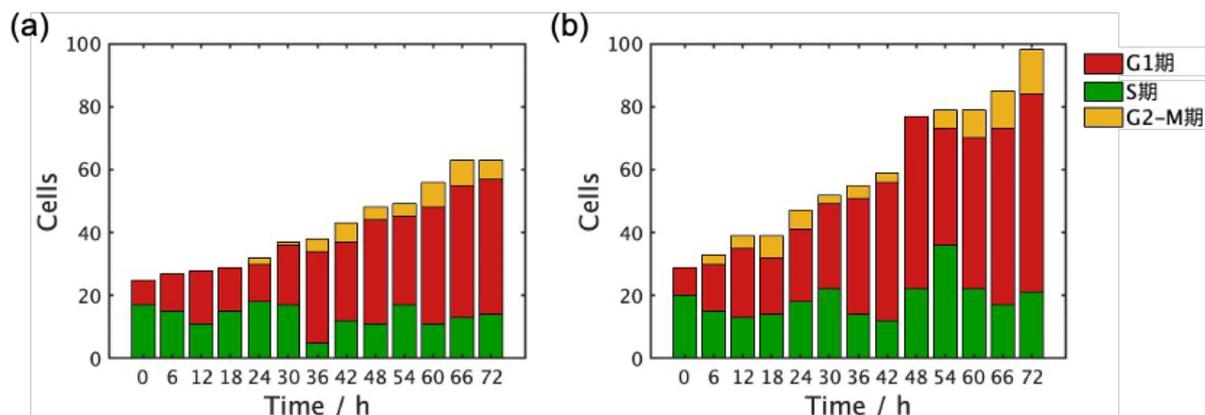


Figure 4.8 培養温度を 37°C 10h - 30°C 5h の周期で切り替える条件下での、細胞周期の各時期の細胞数を計測した。(a)ガラス表面での細胞培養. 細胞形態は制御されない。(b)PNIPAAm 表面上での細胞培養. 30°C の期間は細胞の伸展が抑制された。

4.3.3 考察

近年行われたインテグリンシグナル伝達のプロテオーム解析では、細胞周期制御因子 CDK1 が接着斑タンパク質の活性化を誘起することが明らかにされた⁸²。また、FA を形成するインテグリンの活性化は CDK1 の発現を増強する⁸⁴。これらの知見はインテグリンを介した細胞接着より細胞周期に干渉し得ることを示唆している。

これまでにグラフト重合度が制御された PNIPAAm の表面グラフトポリマー基材を開発し、培養温度を 37°C と 30°C の間で変更すると細胞接着形態の伸展型/球型が切り替えが可逆に生じることを確認した。そして細胞接着の切り替え操作を繰り返し行くと、細胞を球型から伸展型へ切り替える操作が細胞分裂を促すことを発見した。また、細胞増殖に関する転写共役因子 YAP が、細胞の接着形態に応じて核内外を往復することも確認している。

本研究では細胞接着と細胞周期の評価のため Fucci(CA)2 プローブが導入された HeLa 細胞を用いた。細胞の間期と分裂期を模倣する細胞接着形態変化の誘導を人為的に行なった培養では、細胞接着形態変化制御を行わない培養と比べて細胞の増殖が促進された。また、この培養法では人為的な細胞接着形態の切替サイクルを複数回経験すると、不連続的に細胞数が増えるタイミングが現れた。

インテグリンの活性は細胞周期を調節する CDK1 と連動するため^{82,84}、同一の細胞培養環境下にある細胞すべてに対して同時にインテグリン活性/不活性を切り替える操作を繰り返すと、細胞の CDK1 活性化時期、つまり細胞周期の回転が同期化される可能性がある。

細胞周期の同期化は細胞周期の各段階で生じる現象を調査するために有効であり、従来、DNA 複製や微小管重合の阻害剤添加あるいは血清飢餓といった化学的手法が用いられてき

た。しかし、これら化学的手法は細胞周期制御以外に細胞のストレス応答を誘発するはずであり、興味ある生命現象と化学的処理に起因する副次的効果を切り分ける方法の確立が望まれる。今回検証した3日間の細胞実験では細胞周期の同調は生じなかったが、さらに外部刺激による細胞接着形態変化を繰り返すと同調培養を達成できるかもしれない。温度変化は加えているがその温度範囲は生理的条件に近く、細胞接着形態変化も基材表面と細胞培養液との間のタンパク質の平衡吸着量にて制御されるもので、細胞自体への薬物ストレスは与えていない。細胞への過度なストレスを与えない細胞周期制御は細胞の形質保持が期待される。また、従来法では個々の細胞の細胞周期が次第にばらついて同調を失うが、本手法にて同調培養が達成された場合には細胞形態を介したシグナル入力を持続されることから長期の同調培養達成が見込まれる。

4.4 結言

本章では機能性生体材料として広く使われている PNIPAAm グラフト表面の応用可能性について検討した。

4.2 節では MSC の未分化性保持について述べた。PNIPAAm の温度応答的な表面水和性の変化は、応答時間の遅延なく、すぐに細胞の接着形態を変化させた。この温度応答的な細胞接着形態の切り替えは、幹細胞の運命決定に関与する転写共役因子 YAP の活性/不活性の切り替えを誘導した。MSC は分化が進行して未分化性を失うと YAP の細胞内局在が不可逆に固定されると知られている^{78,85}ため、本研究での YAP の可逆的な細胞内局在変化は分化が進行していないことを示唆している。一方で、MSC の未分化性の評価として YAP のみでは不足しており、他の運命決定関連因子も評価する必要がある。

PNIPAAm 上で MSC を培養する際、30°C では球状の細胞形態をとっており、これは表面に対してほぼ接着していないことを意味する。このような細胞-基材間相互作用が非常に弱い状態を長時間継続すると、細胞は自身が接着可能な領域を求めて遊走し、近隣の細胞と細胞間接着を生じる。本研究で用いた MSC は 30°C の期間中に三次元的な細胞凝集塊を形成しやすく、そのため長期的な評価を行う際には遊走中の細胞同士が出会う頻度を抑えるために、非常に薄い播種密度での実験となった。播種密度の低さは細胞がバルクに放出するサイトカインが希釈され細胞同士の相互作用が機能しないなど、意図しない影響があるかもしれない。

4.3 節では細胞接着形態制御を介した細胞周期への干渉について述べた。本来の細胞周期よりやや短い期間で、細胞周期の間期と分裂期を模倣した細胞接着形態の切り替えを行うことで、

細胞増殖が活性化することを示した。さらに、この細胞接着形態の切り替えを複数回経験すると、不連続的に細胞数が増える時期が現れ、細胞周期の同期化にも利用できる可能性を議論した。しかし、使用した HeLa 細胞は細胞増殖が進んで細胞-細胞間接着が増えると接触阻害が生じる。接触阻害は細胞周期を止めるため、接触阻害が生じない範囲での短期間での実験に限定された。本手法に基づく細胞周期の同期化には接触阻害の課題解決が望まれる。

第5章 総括

本研究では細胞-基材間接着メカニズム解明に際して、接着界面に存在する高分子層に着目した。バイオマテリアル表面への細胞接着は細胞接着性リガンドとインテグリンレセプターの結合に始まり、そのクラスター化、およびタリンやビンキュリン、アクチンなどのタンパク質の集合と自己組織化が進行する。これらの分子間結合の形成や分子集合のしやすさは、周辺分子の配置やその移動度、立体障害によって左右される。

第2章では温度応答性高分子 PNIPAAm の疎水性凝縮層に対する細胞接着抑制効果の要因について調査した。PNIPAAm 表面は温度応答的な表面水和性の変化が特徴的である。そのため、LCST 以上における疎水性状態では表面にタンパク吸着が生じて細胞接着性を示し、LCST 以下での親水化状態では表面吸着タンパク質の不足から細胞接着抑制される、という議論がなされてきた。これは比較的低分子量の PNIPAAm 表面に対しては妥当であるものの、高分子量の PNIPAAm 表面では矛盾する結果が報告されている⁵¹⁻⁵³。そこで表面修飾 PNIPAAm の分子量 (第2章ではグラフト重合度 DGP で記述した) が系統的に異なる基材を作製し、それらの表面の化学的性質と物理的性質について評価した。XPS 測定や接触角測定、フィブロネクチンの表面吸着の TIRF 観察では DGP による差は得られず、37°C 条件下での DGP 増大に伴う細胞接着抑制は表面の化学的性質によるものではないことを示した。表面修飾 PNIPAAm の長さは可動域の大きさに相関するはずである。37°C、PBS 中での AFM 測定では、DGP によらずいずれの表面も圧縮変形可能な 10 nm 程度の層を有することがわかった。続いて LFM 測定により、この圧縮変形を示した層が細胞牽引力程度の負荷で長距離の引伸変形を生じることを明らかにした。LFM プロファイルから算出された高分子鎖の水平変形量は DGP と相関し、細胞接着が抑制される PNIPAAm 条件ではインテグリンのクラスター化に必要とされる 70 nm¹⁵ よりもはるかに長距離の高分子鎖の引き伸ばしが確認された。PNIPAAm 表面での細胞接着は、従来議論されてきた表面へのタンパク質吸着だけでなく、表面の水平変形のしやすさによっても決定されることを明らかにした。

第3章では細胞-基材接着界面における微小環境の pH 分布の可視化を試みた。細胞接着装置であるインテグリンの活性は細胞膜表面の酸性度に関係しており^{41,42}、インテグリンの活性化はイオン輸送体 NHE1 を活性化し³⁷、さらに接着斑タンパク質は NHE1 の活性化に伴い

クラスター化を進行する³⁸。したがって細胞膜表面の pH 情報は細胞接着状態の把握やその後の細胞運動状態の予測の手がかりとなる。また、細胞-基材接着界面に存在する糖衣も pH 変化を生じる要素のひとつである。インテグリンが基材表面に結合するには、インテグリンよりも嵩高く厚みのある糖鎖をかき分け、糖衣の外まで表出する必要がある⁴⁹。このとき糖鎖は高密度化と圧縮変形を受けることになる。糖鎖は負電荷に富んでいる^{72,73}ため、糖鎖の高密度化と圧縮変形は対イオンとしてのプロトンを局所的に濃縮させ、これが細胞膜表面の酸性化を引き起こす。FITC 修飾基材上での NIH/3T3 細胞のライブセルイメージングにおいて細胞接着界面のほぼ全体で FITC の輝度が低下していたが、その領域内部では濃淡の分布が見られた。特に伸長過程の仮足前方で酸性化を意味する強い消光が確認され、参考研究と一致する⁴⁰ことから細胞接着界面の pH 可視化に成功したといえる。生細胞を用いた観察では NHE1 と糖衣の効果を併せた pH 検出となるが、PFA で固定すると NHE1 の機能が停止し糖衣の効果のみを取り出せる。固定された NIH/3T3 細胞の接着界面において、FITC の輝度低下領域は生細胞での観察時より縮小しており、おおよそ FA 近傍のみに限定された。また HeLa 細胞では PFA で固定後であっても接着界面の広い領域で pH の低下が確認された。がん細胞は正常細胞より糖鎖が嵩高く^{45,49,69,70}、そのため糖衣のわずかな圧縮に対しても糖鎖密度が変動して広範囲での酸性化につながったと考えられる。つまり FITC 修飾基材上で細胞固定を行うと、インテグリン-基質結合形成に伴う糖鎖の密度変化が pH 応答として検出可能であり、その検出感度は細胞膜上の糖衣の厚さに依存するようである。

第4章では細胞接着制御可能な培養基材の応用展開について模索した。最もシンプルな細胞接着制御は、表面へのタンパク質吸着の有無によるものである。そこで、まず PNIPAAm 修飾基材を用いて表面へのタンパク質吸着の ON/OFF を切り替え、それに伴う細胞接着強度の ON/OFF 変化の利用を考えた。MSC は長期間に渡って同じ培養環境下に置かれると幹細胞性を失う。そこで定期的に細胞接着強度の ON/OFF を切り替える培養法にて幹細胞性の保持を試みた。6時間ごとに細胞接着強度を切り替える培養法は幹細胞の運命決定に関連する YAP の細胞内局在の変化を達成した。YAP の細胞内局在の可逆変化は幹細胞性を有する MSC において観察されるものであるから、この結果は本手法が MSC の形質保持に有効である可能性を示唆する。さらに、細胞接着強度の ON/OFF 変化は細胞増殖を活性化させていた。幹細胞は増殖時における非対称分裂の問題から幹細胞性の保持と細胞増殖による細胞数の確保の両立は困難な課題のひとつである。幹細胞性の保持のために検討した操作において細胞増殖能の活性化も合わせて生じたことは、幹細胞性の保持と細胞増殖の両立の課題解決の手がかり

となるだろう。ただし、ここで行なった細胞接着強度の切り替え操作は細胞-基材間相互作用を完全に OFF にする過程が含まれ、予期せぬ細胞-細胞間接着も生じることがわかった。そこで第2章や第3章で整理した力学応答的、あるいは pH 応答的な細胞接着メカニズムも組み込んで細胞接着レベルの多段階制御を達成することが望まれる。

参考文献

1. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
2. Folkman, J. & Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* **273**, 345–349 (1978).
3. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425–1428 (1997).
4. DiMilla, P. A., Stone, J. A., Quinn, J. A., Albelda, S. M. & Lauffenburger, D. A. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J. Cell Biol.* **122**, 729–737 (1993).
5. Carvalho, R. S., Schaffer, J. L. & Gerstenfeld, L. C. Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: Demonstration of a common role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation. *J. Cell. Biochem.* **70**, 376–390 (1998).
6. Thomas, C. H., Collier, J. H., Sfeir, C. S. & Healy, K. E. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1972–1977 (2002).
7. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–495 (2004).
8. Spiegelman, B. M. & Ginty, C. A. Fibronectin Modulation of Cell Shape and Lipogenic Gene Expression in 3T3-Adipocytes. *Cell* **35**, 657–666 (1963).
9. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry* vol. 275 21785–21788 (2000).
10. Heskins, M. & Guillet, J. E. Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Part A - Chem.* **2**, 1441–1455 (1968).
11. Okano, T., Yamada, N., Sakai, H. & Sakurai, Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 1243–1251 (1993).
12. Yamato, M. & Okano, T. Cell sheet engineering. *Mater. Today* **7**, 42–47 (2004).
13. Kobayashi, J., Kikuchi, A., Aoyagi, T. & Okano, T. Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **107**, 955–967 (2019).
14. Lehnert, D. *et al.* Cell behaviour on micropatterned substrata: Limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J. Cell Sci.* **117**, 41–52 (2004).
15. Arnold, M. *et al.* Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *ChemPhysChem* **5**, 383–388 (2004).
16. Xiong, J. *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3. *Science* **294**, 339–345 (2001).

17. Eng, E. T., Smagghe, B. J., Walz, T. & Springer, T. A. Intact α IIb β 3 integrin is extended after activation as measured by solution x-ray scattering and electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **286**, 35218–35226 (2011).
18. Dai, A. *et al.* The structure of a full-length membrane-embedded Integrin bound to a physiological Ligand. *J. Biol. Chem.* **290**, 27168–27175 (2015).
19. Huang, J. *et al.* Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion. *Nano Lett.* **9**, 1111–1116 (2009).
20. Schwartzman, M. *et al.* Nanolithographic control of the spatial organization of cellular adhesion receptors at the single-molecule level. *Nano Lett.* **11**, 1306–1312 (2011).
21. Kanchanawong, P. *et al.* Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**, 580–584 (2010).
22. Patla, I. *et al.* Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nat. Cell Biol.* **12**, 909–915 (2010).
23. Liu, J. *et al.* Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4864–E4873 (2015).
24. Dedden, D. *et al.* The Architecture of Talin1 Reveals an Autoinhibition Mechanism. *Cell* **179**, 120–131.e13 (2019).
25. Pelham, R. J. & Wang, Y. L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13661–13665 (1997).
26. Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. & Wang, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* **79**, 144–152 (2000).
27. Mitchison, T. & Kirschner, M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* vol. 1 761–772 (1988).
28. Chan, C. E. & Odde, D. J. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* **322**, 1687–1691 (2008).
29. Elosegui-Artola, A., Trepate, X. & Roca-Cusachs, P. Control of mechanotransduction by molecular clutch dynamics. *Trends Cell Biol.* **28**, 356–367 (2018).
30. Hytönen, V. P. & Vogel, V. How force might activate talin’s vinculin binding sites: SMD reveals a structural mechanism. *PLoS Comput. Biol.* **4**, (2008).
31. Del Rio, A. *et al.* Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* **323**, 638–641 (2009).
32. Kong, F., García, A. J., Mould, A. P., Humphries, M. J. & Zhu, C. Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *J. Cell Biol.* **185**, 1275–1284 (2009).
33. Gong, Z. *et al.* Matching material and cellular timescales maximizes cell spreading on viscoelastic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E2686–E2695 (2018).

34. Kuhlman, W., Taniguchi, I., Griffith, L. G. & Mayes, A. M. Interplay between PEO tether length and ligand spacing governs cell spreading on RGD-modified PMMA-g-PEO comb copolymers. *Biomacromolecules* **8**, 3206–3213 (2007).
35. Attwood, S. J. *et al.* Adhesive ligand tether length affects the size and length of focal adhesions and influences cell spreading and attachment. *Sci. Rep.* **6**, 34334 (2016).
36. Grinstein, S. *et al.* Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na⁺/H⁺ antiporter: Assessment of effects on intracellular pH. *EMBO J.* **12**, 5209–5218 (1993).
37. Schwartz, M. A., Lechene, C. & Ingber, D. E. Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin $\alpha 5\beta 1$, independent of cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7849–7853 (1991).
38. Tominaga, T. & Barber, D. L. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2287–2303 (1998).
39. Stock, C. *et al.* Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *J. Physiol.* **567**, 225–238 (2005).
40. Stock, C. *et al.* pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **20**, 679–686 (2007).
41. Paradise, R. K., Lauffenburger, D. A. & van Vliet, K. J. Acidic extracellular pH promotes activation of integrin $\alpha v\beta 3$. *PLoS One* **6**, 15746 (2011).
42. Paradise, R. K., Whitfield, M. J., Lauffenburger, D. A. & Van Vliet, K. J. Directional cell migration in an extracellular pH gradient: A model study with an engineered cell line and primary microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **319**, 487–497 (2013).
43. Schnitzer, J. E. Glycocalyx electrostatic potential profile analysis: ion, pH, steric, and charge effects. *Yale J. Biol. Med.* **61**, 427–446 (1988).
44. Barker, A. L. *et al.* Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1006–1011 (2004) doi:10.1039/b312189e.
45. Hatrup, C. L. & Gendler, S. J. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology* vol. 70 431–457 (2008).
46. Nieuwdorp, M. *et al.* Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: A potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J. Appl. Physiol.* **104**, 845–852 (2008).
47. Paszek, M. J., Boettiger, D., Weaver, V. M. & Hammer, D. A. Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000604 (2009).
48. Lin, K. & Asaro, R. J. Nascent Adhesion Clustering: Integrin-Integrin and Integrin-Substrate Interactions. *Biophysica* **2**, 34–58 (2022).

49. Paszek, M. J. *et al.* The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* **511**, 319–325 (2014).
50. Kanyo, N. *et al.* Glycocalyx regulates the strength and kinetics of cancer cell adhesion revealed by biophysical models based on high resolution label-free optical data. *Sci. Rep.* **10**, 1–20 (2020).
51. Linhui, L., Yang, Z., Bo, L. & Changyou, G. Fabrication of thermoresponsive polymer gradients for study of cell adhesion and detachment. *Langmuir* **24**, 13632–13639 (2008).
52. Takahashi, H., Nakayama, M., Yamato, M. & Okano, T. Controlled chain length and graft density of thermoresponsive polymer brushes for optimizing cell sheet harvest. *Biomacromolecules* **11**, 1991–1999 (2010).
53. Zhao, T. *et al.* Inhibition of protein adsorption and cell adhesion on PNIPAAm-grafted polyurethane surface: Effect of graft molecular weight. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **85**, 26–31 (2011).
54. Rajendran, L. & Simons, K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* **118**, 1099–1102 (2005).
55. Chaudhuri, O., Cooper-White, J., Janmey, P. A., Mooney, D. J. & Shenoy, V. B. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* vol. 584 535–546 (2020).
56. Otsu, T. & Yoshida, M. Role of initiator-transfer agent-terminator (iniferter) in radical polymerizations: Polymer design by organic disulfides as iniferters. *Makromol. Chemie. Rapid Commun.* **3**, 127–132 (1982).
57. Nakayama, Y. & Matsuda, T. Surface macromolecular architectural designs using photo-graft copolymerization based on photochemistry of benzyl N,N-diethyldithiocarbamate. *Macromolecules* **29**, 8622–8630 (1996).
58. Kidoaki, S., Nakayama, Y. & Matsuda, T. Measurement of the interaction forces between proteins and iniferter-based graft-polymerized surfaces with an atomic force microscope in aqueous media. *Langmuir* **17**, 1080–1087 (2001).
59. Kidoaki, S., Ohya, S., Nakayama, Y. & Matsuda, T. Thermoresponsive structural change of a poly(N-isopropylacrylamide) graft layer measured with an atomic force microscope. *Langmuir* **17**, 2402–2407 (2001).
60. Hoffmann, C., Leroy-Dudal, J., Patel, S., Gallet, O. & Pauthe, E. Fluorescein isothiocyanate-labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remodeling. *Anal. Biochem.* **372**, 62–71 (2008).
61. Xue, C. *et al.* Protein adsorption on poly(N-isopropylacrylamide) brushes: Dependence on grafting density and chain collapse. *Langmuir* **27**, 8810–8818 (2011).
62. Dai, W. *et al.* A negative correlation between water content and protein adsorption on polymer brushes. *J. Mater. Chem. B* **7**, 2162–2168 (2019).
63. Liu, W., Bonin, K. & Guthold, M. Easy and direct method for calibrating atomic force microscopy lateral force measurements. *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 063707 (2007).

64. Balaban, N. Q. *et al.* Force and focal adhesion assembly: A close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* **3**, 466–472 (2001).
65. Kim, H., Witt, H., Oswald, T. A. & Tarantola, M. Adhesion of Epithelial Cells to PNIPAm Treated Surfaces for Temperature-Controlled Cell-Sheet Harvesting. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 33516–33529 (2020).
66. Choi, C. K. *et al.* Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1039–1050 (2008).
67. Changede, R., Xu, X., Margadant, F. & Sheetz, M. P. Nascent Integrin Adhesions Form on All Matrix Rigidities after Integrin Activation. *Dev. Cell* **35**, 614–621 (2015).
68. Yu, C. H. *et al.* Integrin-beta3 clusters recruit clathrin-mediated endocytic machinery in the absence of traction force. *Nat. Commun.* **6**, 1–12 (2015).
69. Woods, E. C. *et al.* A bulky glycocalyx fosters metastasis formation by promoting g1 cell cycle progression. *Elife* **6**, (2017).
70. Möckl, L. *et al.* Quantitative Super-Resolution Microscopy of the Mammalian Glycocalyx. *Dev. Cell* **50**, 57-72.e6 (2019).
71. Gandhi, J. G., Koch, D. L. & Paszek, M. J. Equilibrium Modeling of the Mechanics and Structure of the Cancer Glycocalyx. *Biophys. J.* **116**, 694–708 (2019).
72. Gamse, G., Fromme, H. G. & Kresse, H. Metabolism of sulfated glycosaminoglycans in cultured endothelial cells and smooth muscle cells from bovine aorta. *BBA - Gen. Subj.* **544**, 514–528 (1978).
73. Oohira, A., Wight, T. N. & Bornstein, P. Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.* **258**, 2014–2021 (1983).
74. Kilian, K. A., Bugarija, B., Lahn, B. T. & Mrksich, M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4872–7 (2010).
75. Trappmann, B. *et al.* Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat. Mater.* **11**, 642–649 (2012).
76. Frith, J. E., Mills, R. J. & Cooper-White, J. J. Lateral spacing of adhesion peptides influences human mesenchymal stem cell behaviour. *J. Cell Sci.* **125**, 317–327 (2012).
77. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677–89 (2006).
78. Yang, C., Tibbitt, M. W., Basta, L. & Anseth, K. S. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat. Mater.* **13**, 645–652 (2014).
79. Dupont, S. *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–83 (2011).
80. Elosegui-Artola, A. *et al.* Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* **171**, 1397-1410.e14 (2017).

81. Hörner, M. *et al.* Phytochrome-Based Extracellular Matrix with Reversibly Tunable Mechanical Properties. *Adv. Mater.* **1806727**, 1–11 (2019).
82. Robertson, J. *et al.* Defining the phospho-adhesome through the phosphoproteomic analysis of integrin signalling. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
83. Jones, M. C., Askari, J. A., Humphries, J. D. & Humphries, M. J. Cell adhesion is regulated by CDK1 during the cell cycle. *J. Cell Biol.* **217**, 3203–3218 (2018).
84. Manes, T. *et al.* $\alpha\beta 3$ integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. *J. Cell Biol.* **161**, 817–826 (2003).
85. Dupont, S. Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Exp. Cell Res.* **343**, 42–53 (2016).

本学位論文は、次の論文を基に作成した。

第2章

- (1) Sayaka Masaïke, Saori Sasaki, Hiroyuki Ebata, Kosuke Moriyama and Satoru Kidoaki, Adhesive-ligand-independent cell-shaping controlled by the lateral deformability of a condensed polymer matrix. *Polym. J.* **54**, 211–222 (2022).
- (2) 政池 彩雅, 木戸秋 悟, 細胞操作変数としての高分子基材の変形特性, 高分子 第71巻 4月号 (2022).

第3章

- (3) Sayaka Masaïke, Yukie Tsuji and Satoru Kidoaki, Local pH mapping in the cell adhesion nano-interfaces on a pH-responsive fluorescence-dye-immobilized substrate. *Anal. Sci.* (2022) doi:10.1007/s44211-022-00239-8.

謝辞

本研究を行うにあたり、懇切丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りました九州大学先導物質科学研究所 木戸秋悟教授に心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり有益なご助言をいただきました九州大学工学府 片山佳樹 教授、九州大学工学府 工藤奨 教授に厚くお礼申し上げます。

伊勢裕彦准教授、久保木タッサニーヤー助教、技術補佐員の辻ゆきえ氏には研究について日頃より有益な助言と、あらゆる面でのご助力をいただきました。また、九州大学工学府 佐々木沙織助教、九州大学理学府 江端宏之 助教、佐世保工業高等専門学校 森山幸祐 講師 には、学部課程での研究室配属当初より、研究への取り組み方の基礎からご指導いただきました。ここにお礼申し上げます。

さらに研究等で日頃から大変お世話になりました木戸秋研究室の先輩、後輩の皆様に感謝いたします。