

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	固体表面に吸着したタンパク質が形成する細胞接着サイトのナノスケール分解能での可視化
Title(English)	
著者(和文)	田原寛之
Author(English)	Hiroyuki Tahara
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12449号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:林 智広,北本 仁孝,曾根 正人,柘植 丈治,田中 圭介
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12449号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース : Department of, Graduate major in	材料 ライフエンジニア リング	系 コース	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of ( 工学 )
学生氏名 : Student's Name	田原寛之		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	林智広 准教授
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	

### 要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

本博士学位論文「固体表面に吸着したタンパク質が形成する細胞接着サイトのナノスケール分解能での可視化」は、以下の5つの章から構成されている。

第1章「序論」では、細胞の足場と細胞接着応答に関する先行研究をまとめ、細胞の足場としての機能を評価する意義や本研究の目的を記述した。

第2章「本研究で用いた表面計測手法と表面改質手法」では、原子間力顕微鏡 (AFM) による接着力マッピングや動的力分光法による分子間相互作用の解析といった表面計測手法と、AFM 探針の化学修飾法や自己組織化単分子膜 (SAMs) といった表面改質技術について記述した。

第3章「RGDS ペプチドで機能化した SAMs 表面における RGD 分布の可視化」では、RGDS ペプチドで機能化した SAMs 表面で接着力マッピングを行い、本研究で提案する手法によって細胞接着サイト (RGD 分布) の可視化が可能であるかを議論した。RGDS ペプチドで機能化する割合を 10%、1%、0.1% となるように調整した SAMs 基板に加えて、RGD 結合ペプチドでブロックした 10% RGDS 基板と、RGDS ペプチドで機能化していない基板を作製して接着力マッピングを行なった。接着力マッピングの結果、SAMs 表面の機能化に用いた RGDS ペプチドの割合に応じて、RGD 分布に顕著な違いが見られた。併せて、RGD 結合ペプチドでブロックした 10% RGDS 基板と RGDS ペプチドで機能化していない基板のそれぞれの結合確率 (特異的な相互作用を検出した割合) が、10% RGDS 基板の結合確率に対して統計的に有意な差を示したことから、提案する手法によって RGD 分布の可視化に成功したと結論付けた。

第4章「血清成分を吸着した SAMs 表面における RGD 分布の可視化と細胞接着応答を決定する因子の議論」では、特性の異なる SAMs 表面に培養環境を模倣して細胞の足場を形成し、接着力マッピングから得られる RGD 分布と、細胞接着実験から得られる細胞接着応答の関係を議論した。ここでは疎水性/親水性、表面電荷、細胞接着性/非細胞接着性など表面特性が異なる5つの SAMs ( $-CH_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-O(CH_2)_2OH$ 、 $-N^+(CH_3)_2(CH_2)_3SO_3^-$ ) を用いた。細胞接着像から接着密度、伸展度、焦点接着斑の形成を、接着力マッピング像から最近傍となる RGD-RGD 間の距離 (以下 RGD 間距離) と RGD 密度を評価した。興味深いことに、Huang らがパターニング基板と RGD 含有ペプチドを用いて明らかにした RGD 間距離 (密度) と細胞接着応答の関係とは異なり、足場内の細胞接着性タンパク質が形成する RGD 間距離(密度)では、細胞接着応答を説明しきれないことがわかった。そこで、細胞接着性タンパク質内の RGD が表面に対してどのように露出しているのか、という点に着目して動的力分光法を用いて分子間のエネルギー障壁の位置と自然結合寿命を評価した。具体的には、ある力の負荷速度ごとに最頻出の接着力をプロットし、Bell-Evans モデルをあてはめることで前述のパラメーターを算出した。結果として、細胞接着性の SAMs 表面に存在する RGD の方が、非細胞接着性の SAMs 表面に存在する RGD よりも、エネルギー障壁の位置と自然結合寿命が長いことがわかり、細胞接着応答を決定する因子として細胞膜上のインテグリンと RGD の結合状態が重要であることが示唆された。従来のパターニング基板と RGD 含有ペプチドを用いた系では、RGD 間距離 (密度) だけで細胞接着応答を議論することができたが、材料表面への吸着を経て細胞の足場が形成されるような複雑な系では、RGD 間距離 (密度) だけでは不十分でありエネルギー障壁の位置や自然結合寿命といった分子間相互作用を考慮して、細胞接着応答を議論する必要があると結論付けた。

第5章「総括と今後の展望」では、総括として本博士論文の研究成果をまとめた。今後の展望では、ナノスケール分解能で細胞接着サイトを可視化する手法を確立したことで実現される、足場材料開発への貢献について記述した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 材料系  
Department of, Graduate major in ライフエンジニアリング 系  
コース

申請学位(専攻分野)： 博士  
Academic Degree Requested Doctor of ( 工学 )

学生氏名： 田原寛之  
Student's Name

指導教員(主)： 林智広 准教授  
Academic Supervisor(main)

指導教員(副)：  
Academic Supervisor(sub)

要旨(英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

In this Ph.D. thesis study, I established a method that can visualize the RGD distribution on cell scaffoldings at nanoscale resolution using atomic force microscopy (AFM) equipped with a RGD binding peptide-functionalized AFM tip. To verify the relationship between RGD distribution and cell adhesion behavior on cell scaffoldings, AFM-based force mapping and cell adhesion test using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were performed on model organic surfaces with adsorbed fetal bovine serum (FBS) component. Here, I modified Au/Ge-coated Si substrates with self-assembled monolayers (SAMs) having different terminal groups:  $-\text{CH}_3$  ( $\text{CH}_3$ ),  $-\text{NH}_2$  ( $\text{NH}_2$ ),  $-\text{COOH}$  ( $\text{COOH}$ ),  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$  (EG1OH), and  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$  (SB). Each SAMs was subsequently coated with FBS component to form varying protein adlayers. I found that the physicochemical properties of the surface significantly affect both the RGD distributions and cell adhesion behaviors. In the case of  $\text{CH}_3$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOH}$ , and SB, the cell adhesion behavior is dependent on ligand-to-ligand distance and ligand density while the opposite is true in the case of EG1OH. To understand how protein adsorption affects the exposure of the RGD domain on the surface, I further investigated the kinetics of RGD binding peptide and RGD domain within FBS proteins using the Bell-Evans model which can describe the potential landscape between two target molecules. A comparison of cell-adhesive and cell-resistant SAMs shows a clear difference in the binding lifetime of the RGD binding and RGD domains on FBS protein, suggesting that conformational changes of FBS protein affect the exposure of the RGD domain on the surface. In conclusion, I successfully imaged the RGD distribution formed on surfaces with nanoscale resolution and realized a quantitative discussion of the parameters that determine cell adhesion. These results provide new perspectives for the development of new scaffolding materials.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).