

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)	要約
Type(English)	Outline

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

東京工業大学 物質理工学院 材料系
ライフエンジニアリングコース 林研究室
田原 寛之

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(-CH₃、

-NH₂、-COOH、-O(CH₂)₂OH、-N⁺(CH₃)₂(CH₂)₃SO₃⁻)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 らがナノパターンニング基板と 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。従来のナノパターンニング基板と 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、細胞接着サイトのナノスケール分解能での可視化手法が実現したことで可能となる、異なる細胞接着サイトに対する細胞接着応答の理解や新たな足場材料開発への貢献について記述した。