

## 第7章 第5節「細胞接着を光制御できる機能性基板」

### はじめに

細胞の活性は、溶液中に存在する成長因子やサイトカインなどの液性因子のみならず、細胞外マトリクス (Extracellular matrix, ECM) や近接する細胞との相互作用による調節を受けている。液性因子は細胞膜表面に存在する膜タンパク質に結合することで、細胞内シグナル伝達系を活性化して遺伝子発現等を調節するが、この際に重要なのはこれら分子の溶液中の濃度であり、さらには受容体との結合定数になる。一方で、ECM や近接細胞の作用は、液性因子と同様の生化学的な作用 (ただこの場合は濃度の代わりに表面密度が意味を持つ) に加えて、力学的な相互作用も加味する必要がある。これは細胞内に、モータータンパク質であるミオシンがアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate, ATP) を消費しながらアクチン細胞骨格に物理的な力を印加しており、これを駆動力とする収縮力がメカノバイオロジー的な細胞内応答を引き起こすからである。実験室の細胞培養において、液性因子の作用は、溶液中の当該分子の添加量をコントロールすることで達成されるが、ECM や周囲の細胞との相互作用を制御するには工夫が必要である。本節で紹介する細胞接着性を光制御できる培養基材 (図 1 A) はそのための一つの有効な手段である。基質との生化学的な相互作用が惹起するシグナル伝達のみならず、メカノバイオロジー応答の分析にも最適な材料である<sup>1)</sup>。特に、光の高い時間・空間制御能を利用すれば、細胞を望みの位置に、しかも指定した幾何学形状で接着させることや (図 1 C)<sup>2,4)</sup>、また、照射と細胞播種を繰り返すことで、異なる種類の細胞を配列してそれらの中での細胞間相互作用を制御することもできる<sup>5)</sup>。さらに、細胞を指定した領域に付着させた後に、その接着領域を拡張することで、細胞移動を誘導することもできる (図 1 D)<sup>6,7)</sup>。ここでは、我々が開発してきた光応答基板を用いた細胞接着の制御法について、その作動原理、基板の作製方法、また細胞移動の誘導の解析への応用例について紹介する。

<図 1 挿入箇所

## 1. 光応答基板の原理と作製

### 1.1 作動原理と光照射方法

最初に光応答基板の作動原理について簡単に説明するが、本技術の開発の経緯や多様な応用展開についてはいくつかの媒体で総説を執筆しているのでそちらも参考にされたい<sup>8,9)</sup>。開発過程でいろいろな分子、修飾方法を検討してきたが、安定したスペックが得られるのは基板表面に光分解性の 2-ニトロベンジル基 (2-NB) を介してポリエチレングリコール (PEG) を連結した基板である (図 1 A)<sup>10)</sup>。水溶性の高分子である PEG はバイオイナート、すなわちタンパク質の吸着を抑制する性質を有するために、この表面にはタンパク質が吸着することができない。通常、細胞が培養基質に接着する場合、まず培地中に存在するタンパク質が基質に吸着し、それと細胞膜表面のインテグリン分子が結合することで細胞接着が成立する。したがって、PEG によるタンパク吸着抑制は、細胞接着抑制を意味することになる。次に、この表面に近紫外光 (波長 365 nm) を照射すると、前述の 2-ニトロベンジル基が光分解反応を受ける (図 1 B)。これによって PEG と基板表面との結合が開裂して PEG が溶液バルクに拡散するため、表面のタンパク吸着抑制が解除され、細胞が接着できるようになる。一連の反応を通して、この基板は光照射に応じて細胞非接着性から細胞接着性へと表面改質する性質を示す。基本的には光リソグラフィーなどと似た原理であるが、通常のリソグラフィーではレジストの除去に有機溶媒などを利用する。それに対して 2-ニトロベンジル基の光分解反応は、触媒などを要せずに水溶液中で進行して有害な副生成物を発生しない。それに加えて PEG は水溶性である。このため培養環境中で、細胞が共存している環境下においても、光改質を行える点に大きな特徴がある。

さらに、通常のリソグラフィーではフォトマスクを基材に密着させてパターン形成を行うが、細胞レベルの分解能であれば遠隔的に光照射領域を制限するだけでも実用可能な細胞接着パターンを形成することができる。したがって

我々は、通常顕微鏡の視野絞りの位置にフォトマスクを挿入して基板表面への光照射領域を行い（図 2A）、投影露光により光照射領域の空間制御を行っている。フォトマスクとしては、イラストレーターなどで描画したパターンを印刷会社に印刷してもらったものを利用している。これは印刷の DPI が低いと、印刷した箇所の黒さが甘く光が漏れるからである。使用する顕微鏡の光学系や対物レンズにもよるが、我々の経験では元のフォトマスクのパターンサイズの 4-10 倍程度の縮小投影になるので、一細胞の形状制御であれば 50  $\mu\text{m}$  程度の精度の印刷が得られれば十分である。使用する対物レンズの種類も重要で、球面収差の優れたレンズを使用しないと広範囲でピントが合わなくなる。Olympus であれば USPLSAPO レンズ、Zeiss であれば Plan Apochromat レンズなどを使用してきた。

また、すでに細胞がパターンニングしている状況で、別の細胞を配列したり、最初の細胞の移動を誘導したりする場合においては、細胞の接着位置に対して 2 次照射領域をアラインメントする必要がある。図 2B にその工程を示す。最初に蛍光マーカーで表面を塗ったカバーガラスなどのダミーサンプルを顕微鏡ステージに設置して 2 次照射領域のパターン化照射を行い（図 2B(i)、顕微鏡のソフトウェアなどでその領域 (ROI, Region of interest) を保存しておく（図 2B(ii)）。その後に望みの細胞の形状・配置で細胞のパターンニング（1 次パターン）を行い（図 2B(iii)）、ROI を読みだしてステージを動かして、細胞の位置をアラインメントして光照射（図 2B(iv)）を行うことで、細胞移動を誘導する。細胞移動現象とする場合、細胞移動アッセイの定番の方法である創傷治癒試験（Scratch wound healing assay）を光で実施するようなイメージになる。ただ、コンフルエント細胞をピペットなどで掻き取って、細胞が移動できる空間を形成する従来法のように、創傷に伴って産生される細胞残渣に起因する生化学・トポグラフィ的な因子の影響を排除できるメリットがある。さらに、後述するように集団で移動する細胞群を牽引するリーダー細胞を研究対象とする場合は、光で正確に接着形状を規格化できることは、集団移動と幾何学形状の解析などにも好都合と言うことは主張に値する。

<図 2 挿入箇所

## 1.2 光応答ガラス基板作製

次に典型的な光応答基板の作製方法について述べる<sup>10)</sup>。使用する化合物は独自に合成した 2-ニトロベンジル基を介して、末端に活性エステル (NHS, *N*-hydroxysuccinimidyl) 基およびトリメチルシリル基を有するシランカップリング剤 (**1**) である（図 3A）。カバーガラスの表面を UV オゾン処理によって活性化した後、トルエンに溶解した **1** を含む溶液で加熱還流することで、光分解性基を介して NHS 基を提示するガラス表面を作製した。この基板はアミノ基を有する様々な分子を捕捉し、その後の近紫外光 (365 nm) の照射によって当該分子を放出し、最終的に光分解残渣として基板上に 2-ニトロソアセトフェノンが生じる（図 3B）。光応答基板においては、アミンとして PEG-NH<sub>2</sub> (分子量 12,000) を採用した。光照射前は基板がタンパク吸着・細胞接着を抑制している状態なのに対して、光照射後の表面は接触角が 60°程度で、普通にタンパク質が吸着する。これによって図 1A で示したような、光照射による細胞非接着→細胞接着へと変化する表面改質が達成される。2-ニトロベンジル基は、一般的な実験室の環境でも僅かずつではあるが光分解が進行するため、作製した基板はアルミホイルなどで遮光して保存する。ただ、基板の作動原理故に、表面改質が起こるためには修飾された分子の大部分が分解する必要があるため、そこまで過敏になる必要はない。それよりも、空気中で保存していると遮蔽していても少しずつ劣化してしまうため (PEG が分解しているものと考えている)、窒素封入して保存することになっている。これにより、数年以上にわたって安定にバイオイナート性と光応答性を維持することを確認している。通常は、光応答基板の小さな断片をガラスボトムディッシュの上に載せて使用するが（図 3B(i)）、底面に穴をあけたディッシュに光応答基板を貼り付けることで、光応答性のガラスボトムディッシュを作製することもできる（図 3B(ii)）。このようにすることで高分解能レンズでの光操作・観察が可能となり、より利便性が高まる。

## 2. 光応答ガラス基板の応用

### 2.1 幾何学形状に応じた細胞集団移動

細胞移動は形態形成や創傷治癒のような生理現象のみならず、がん細胞の浸潤・転移などの病態にも関わる重要な現象である。細胞移動の初期の研究においては化学走化性、すなわち液性因子の濃度勾配に対する細胞の指向性移動の研究が中心に行われてきたため、主に一細胞を対象に、細胞の濃度勾配のセンシング、極性形成、細胞の運動性の原理などが研究対象となってきた。一方で、生体内において細胞は、周囲の細胞との接着を維持した状態で移動する現象（細胞集団移動）がよく見られ、その際に集団であるが故に創発する興味深い現象が観察される。例えば、上皮系の細胞においては、細胞集団の先頭に立ち、集団移動の方向性や移動速度を決定するリーダー細胞と、それに追従するフォロワー細胞が存在することが知られている<sup>11,12)</sup>。また、一定の幾何学空間に置かれた細胞が、集団で一定の方向に回転する現象（集団移動のキラリティ）なども報告されている<sup>13,14)</sup>。これまでの研究で、上皮のリーダー細胞の特徴として低分子量 G タンパク質 Rho の活性が高まっていることが知られており、実際に Rho の活性を調節するとリーダーの数が変化することなどが確認されている<sup>15)</sup>。このような内在性因子に対して、ECM や周囲の細胞との相互作用などの環境因子によるリーダー細胞の出現制御はまだ不明な点が多い。特に、Wound healing アッセイ法は細胞移動の先導端に掻きとった細胞が残存し、しかも物理的な掻き取りによってできたスペースには細胞のデブリが残っているために、これがリーダー細胞の出現に影響している可能性も否定できない。それに対して我々の光応答基板を利用すればこの辺りの不確定要素を排除できる（図 4A）。

具体的な戦略としては、光応答基板を用いて初期の細胞集団の形状を円形状に精密に制御しながら、それに単位外周長あたりのリーダー細胞の出現頻度を評価した<sup>7)</sup>。典型的な上皮細胞である MDCK 細胞（イヌ腎尿細管上皮細胞）を用いて、サイズの小さいクラスター 2 種類（r44, r75）の間ではリーダー細胞の出現に変化は見られなかったが、半径が 104  $\mu\text{m}$ , 142  $\mu\text{m}$  と大きくなるにつれてリーダー細胞の出現頻度が減少していった（図 4B）。一方で、クラスター径が大きくなると細胞数と外周の曲率半径が同時に変化する。この 2 つの因子の寄与を見分けるために、中心付近に細胞が存在しないドーナツ状の形状の細胞クラスターを形成して（r142/81）、円形クラスター（r142）と比較すると、両方でリーダー細胞の出現頻度にあまり差異がみられないことが分かり、曲率半径が主要な決定因子であることが明らかになった。さらにクラスターを形成してから細胞移動を誘導するまでの時間を 9 時間と 25 時間と変化させたところ、後者において大幅にリーダー細胞の出現率が低下することが確認できた。以上の結果から、集団の規模や形成時間の増大に応じてリーダーの出現頻度が低下するという、人間社会の成熟とも通じるような挙動が細胞社会でも目撃できるという興味深い結果が得られた。

### 2.2 細胞外マトリクスの種類の変化に対する集団移動挙動

上述した光分解性基板では、光照射領域に吸着するタンパク質は血清中に含まれる多種多様なタンパク質であったが、光分解性基板の原理を利用すれば、1 次・2 次照射時に特定のタンパク質を吸着させて（図 5A）、その種類に応じた細胞移動挙動を解析することも可能である（図 5B）<sup>16)</sup>。特に、実際の生体内の癌の悪性化や浸潤時には基底膜（ラミニンが豊富）から間質（コラーゲン I が主成分）への環境の変化が見られるため、この際に細胞に暴露される ECM の種類の変化を模倣すると考えれば生理的な意義も高い。実際に最初の細胞の円形パターンの形成時に吸着させる ECM-1 をラミニンあるいはコラーゲン、細胞移動を誘導する 2 次照射時に円形クラスターの周辺領域に吸着させる ECM-2 をラミニンあるいはコラーゲンをを用いることで、同種・異種 ECM を横断する際の MDCK 細胞の応答を解析した。その結果、ECM-1 がコラーゲンよりもラミニンを用いた方が細胞集団移動は速く（図 5C）、その際に ECM-2 と

して用いたタンパク質が異種のコラーゲンよりも、同種のラミニンである方がより円形度が小さくなることが確認できた (図 5D)。本手法では、初期の集団形状を円形と規定している。その際、図 4A の結果からも想像できるようにリーダー細胞が多くなる方が、円形度が小さくなることが想定される。図 5D の結果は、実際の生体内における基底膜から間質への移動における ECM の生化学的な変化が細胞集団移動挙動やリーダー細胞の出現に与える影響について重要な示唆を与えるものである。

<図 5 挿入箇所

### 3. ガラス以外の材料の光機能化

#### 3.1 金蒸着基板に基づく ECM 密度が制御された光応答基板

ガラスと比べると金基板はチオールやジスルフィドなどによる修飾で混合自己組織化単分子膜を容易に作成することができる。特にカバーガラスの表面に数十 nm の金薄膜を蒸着するだけで表面の化学修飾が可能となり、と同時に細胞の顕微鏡観察も行える。この特徴を利用して、ジスルフィド基の両末端に(i)光分解性の PEG (分子量 12K)、(ii)環状 RGD ペプチド (cRGD)、(iii)ヘキサエチレングリコール (EG<sub>6</sub>) が修飾された分子の混合比を変化させた光応答基板を開発した (図 6A)<sup>17)</sup>。この際、cRGD と EG<sub>6</sub> の混合比をコントロールすると細胞に提示される cRGD 密度が変化する。と同時に EG<sub>6</sub> が他のタンパク質の非特異吸着を抑えるため、その状況が安定的に保たれる設計になっている。そのため、生化学因子としての cRGD の密度 (刺激強度) が細胞集団移動挙動に与える影響を調べることが可能になった。

MDCK 細胞を対象の集団の初期形状を直径 260 μm の円形パターンと規定してし、そこから放射状に広がっていく様子を観察し、リーダー細胞の出現率を評価したところ、中間の cRGD 密度で極大値を取る Biphasic な挙動を示した (図 6B)<sup>18)</sup>。過去の研究で、フィブロネクチン等の ECM タンパク質の吸着密度が細胞の集団移動挙動や上皮間葉転換に与える影響が正・負の両方向の調節が行われるなどと相反する結果が得られていたのが<sup>19,20)</sup>、それぞれの研究で使用されていた ECM タンパク質の濃度レンジなどが微妙に異なっていたことに起因していることを示唆しており、光応答基板を使った研究手段の有用性が強調された。

次に、光応答基板の遠隔操作性を示した研究として、この金基板を利用して重力ベクトルが細胞集団移動に与える影響も調べた結果を紹介する<sup>21)</sup>。最初に正立状態で光照射を行って円形領域に MDCK 細胞をパターンニングした後に、正立の状態のまま、あるいは基板を反転させた状態で光照射を行って細胞移動を誘導した (図 7A)。すると、倒立状態ではリーダー細胞の出現頻度も低下することが分かった (図 7B)。この際の細胞骨格 (F-actin) を染色すると、細胞の頭頂部が正立状態では凸凹なのに対して、倒立状態では平坦になっていた (図 7C)。その他の阻害剤などの実験なども合わせて考察すると倒立状態では、重力ベクトルの反転に適応すべく、細胞骨格の再配列や応力分布の変化が生じ、その結果として集団全体の構造やリーダー細胞の出現に影響を与えていることが明らかになった。

<図 6 挿入箇所

<図 7 挿入箇所

#### 3.2 ハイドロゲルに基づく弾性率が制御された光応答基板

これまでの光応答基板はガラスや金などを基材に用いてきたものであるが、実際の生体軟組織はこれよりはるかに軟らかい。メカノバイオロジー的な視点で考えると、これは実際の生体内における移動挙動と決定的に異なる可能性もある。そこで、ポリアクリルアミドゲルの表面にガラスや金と同様の光応答性を付与することを試みた<sup>22)</sup>。最初に行ったアプローチでは、光架橋 (Sulfo-SANPAH) を介してポリ-D-リジン (PDL) を固定し、光分解性基を介して末端に活性エステルを有する PEG による修飾でゲル表面を光機能化した (図 8)。上述したガラス・金基板と同様に光照

射で細胞集団の初期形状やその移動を誘導することができるが、そこに基質の力学特性の影響を加味した議論が可能になる。例えば、Wound healingアッセイのように細胞の平行移動挙動を光操作で行った、軟らかいゲル (5 kPa) よりも硬いゲル (55 kPa) の方がより速く移動した (図8B)。また比較対象として、同様の修飾を施したガラス基板と比較したところ、軟らかいゲルと同様の移動速度となり、細胞は確かに基材の硬さを感じ取っており、中間くらいの硬さで最も速く移動することが明らかになった。

また、弾性率に加えて、上述の金基板と同様に、ECMリガンドの密度も同時に制御することが可能な光応答ゲル基板を開発した。そのため、上述の光分解性PEGの末端の活性エステル基にエチレンジアミンを反応させた新規分子を合成した (図9A)。この分子と末端にNH<sub>2</sub>基を有するcRGD分子を、カルボジイミド架橋剤 (EDC) で活性化したポリアクリル酸ハイドロゲルのカルボキシ基に共固定した。この基板上における円形状のMDCK細胞の集団移動挙動を解析すると、cRGD密度とアクリルアミドゲルの弾性率の相乗効果が見られることが確認できた (図9B,C)<sup>23)</sup>。

<図8挿入箇所

<図9挿入箇所

#### 4. 結論

以上のように、光応答基板は光刺激を用いるが故に、細胞接着を空間 (幾何学)・時間制御能、ならびに遠隔操作性有する。また、表面光改質反応が培養環境中で実施できるために、細胞接着領域の拡張が可能であり、それを利用した細胞移動研究に有用であることを示した。さらに、作動原理が界面の光反応に基づいているために、同じ原理を、顕微鏡観察に好適なカバーガラスに限らずに、金基板やハイドロゲル表面などに展開できることは、本技術の高い拡張性を物語ると同時に、基質からもたらされる分子刺激、力学刺激などの影響を探究できるなど、今後の分子生物学・メカノバイオロジー分野における「問い」に答えを与えるための強力なツールとなることが期待される。

#### 参考文献

- 1) J. Nakanishi and K. Uto, *Material-based Mechanobiology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, (2022).
- 2) J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, H. Nakayama, K. Yamaguchi et al., *Journal of the American Chemical Society*, 126, 16314-16315 (2004).
- 3) J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, H. Nakayama, K. Yamaguchi et al., *Anal. Chim. Acta*, 578, 100-104 (2006).
- 4) J. Nakanishi, Y. Kikuchi, Y. Tsujimura, H. Nakayama, S. Kaneko et al., *Supramol. Chem.*, 22, 396-405 (2010).
- 5) Y. Kikuchi, J. Nakanishi, T. Shimizu, H. Nakayama, S. Inoue et al., *Langmuir*, 24, 13084-13095 (2008).
- 6) J. Nakanishi, Y. Kikuchi, S. Inoue, K. Yamaguchi, T. Takarada et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 6694-6695 (2007).
- 7) C. G. Rolli, H. Nakayama, K. Yamaguchi, J. P. Spatz, R. Kemkemer et al., *Biomaterials*, 33, 2409-2418 (2012).
- 8) J. Nakanishi, *Chem. Rec.*, 17, 611-621 (2017).
- 9) J. Nakanishi, *Chemistry – An Asian Journal*, 9, 406-417 (2014).
- 10) Y. Kikuchi, J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, Y. Yoshino et al., *Chem. Lett.*, 37, 1062-1063 (2008).
- 11) A. A. Khalil and P. Friedl, *Integrative Biology*, 2, 568-574 (2010).
- 12) S. A. Vilchez Mercedes, F. Bocci, H. Levine, J. N. Onuchic, M. K. Jolly et al., *Nature Reviews Cancer*, 21, 592-604 (2021).
- 13) L. Q. Wan, K. Ronaldson, M. Park, G. Taylor, Y. Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 12295-12300 (2011).
- 14) A. S. Chin, K. E. Worley, P. Ray, G. Kaur, J. Fan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115, 12188-12193 (2018).
- 15) T. Omelchenko, J. M. Vasiliev, I. M. Gelfand, H. H. Feder and E. M. Bonder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 10788-10793 (2003).

- 16) S. A. Abdellatef, F. Bard and J. Nakanishi, *Biomaterials Science*, DOI: 10.1039/D4BM00225C (2024).
- 17) Y. Shimizu, M. Kamimura, S. Yamamoto, S. A. Abdellatef, K. Yamaguchi et al., *Anal. Sci.*, 32, 1183-1188 (2016).
- 18) S. A. Abdellatef and J. Nakanishi, *Biomaterials*, 169, 72-84 (2018).
- 19) A. Haeger, M. Krause, K. Wolf and P. Friedl, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840, 2386-2395 (2014).
- 20) A. Ravasio, A. P. Le, T. B. Saw, V. Tarle, H. T. Ong et al., *Integrative Biology*, 7, 1228-1241 (2015).
- 21) S. Sakakibara, S. A. Abdellatef, S. Yamamoto, M. Kamimura and J. Nakanishi, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 24, 2206525 (2023).
- 22) M. Kamimura, M. Sugawara, S. Yamamoto, K. Yamaguchi and J. Nakanishi, *Biomaterials Science*, 4, 933-937 (2016).
- 23) K. Tatematsu, S. Yamamoto, M. Kamimura, K. Yamaguchi and J. Nakanishi, *Talanta Open*, 9, 100319 (2024).

#### 図の脚注

図 1. 光応答基板の作動原理と細胞パターンニングおよび細胞移動の誘導の方法。(A) 光分解性の 2-ニトロベンジル (2-NB) 基を介してタンパク吸着・細胞接着を抑制するポリエチレングリコール (PEG) が修飾されている。光照射によって表面が細胞非接着性から接着性へと変化する。(B) 近紫外光 (波長 365 nm) の照射によって 2-NB が光分解し、脱炭酸反応を伴いながら PEG が放出される。(C) フォトマスクを介した細胞接着領域および細胞のパターンニング。(D) 2 次照射による細胞移動の誘導。

図 2. 光応答基板に対する光照射の方法。(A) 光学系。顕微鏡の視野絞りにフォトマスクを挿入して投影露光によって光照射領域を規定する。(B) 細胞移動の誘導方法。先に 2 次照射領域 (ROI) をソフトウェア上で記録しておき、1 次照射によって細胞がパターンニングされた基板の位置を ROI にアライメントして、2 次照射を行う。アレイ化した円形細胞集団から特定の集団を選び、2 次照射時は細胞に光が当たらないように、細胞の周囲だけを光照射する例。

図 3. 光応答基板および光応答ガラスボトムディッシュへの作製方法。(A) 末端に活性エステルを有する光分解性シランカップリング剤の化学構造。(B) 表面修飾手順と光改質。(I) シランカップリング剤を修飾後に、(II) PEG-NH<sub>2</sub> (分子量 12,000) をグラフトして細胞非接着性とした後に、(III) 光照射により PEG を解離して細胞接着性の表面にする。文献 10 より一部改変。(C) 市販のカバーガラスの表面に光応答基板を載せるか、穴あきカバーガラスの底面より光応答基板をグリースで貼り付けることによって光応答ガラスボトムディッシュを調製する。

図 4. 光応答ガラス基板を用いた細胞集団移動時に発生するリーダー細胞の解析。(A) 円形の領域 (r104, 半径 104 μm) に細胞を付着させ (左, 0 h), 2 次照射により細胞移動を 1 時間誘導した (右, 1 h)。矢印はリーダー細胞を示す。(B) 初期幾何学形状に応じたリーダー細胞の出現頻度の変化。文献 7 より一部改変。

図 5. 光応答ガラス基板を用いた同種・異種 ECM タンパク質を横断する細胞集団移動の解析。(A) 光照射位置に特定の ECM タンパク質 (ECM-1) を吸着させて細胞パターンニングする。(B) 細胞移動を誘導する 2 次照射する際に、周辺領域に同種 (ECM-1) あるいは異種 (ECM-2) を吸着させて細胞移動を誘導する。(C, D) ECM-1 と ECM-2 がラミニンやコラーゲン I であった場合の (C) 細胞の面積増大率と (D) 円形度の違い。文献 16 より一部改変。

図 6. 光応答金基板を用いた ECM 密度の細胞集団移動挙動への影響の解析。(A) 光分解 PEG, cRGD, ヘキサエチレングリコール (EG<sub>6</sub>) を両末端に有するジスルフィド (PCP-ds, cRGD-ds, EG<sub>6</sub>-ds) の基板修飾時の仕込み濃度 (下部)

に応じて PEG の光解離後に細胞に提示される cRGD 密度を調節する。(B) cRGD 密度に対して二相性のリーダー細胞出現頻度を示す。文献 17,18 より一部改変。

図 7. 光応答金基板を用いた細胞集団移動における重力ベクトルの影響の解析。(A) 通常の正立状態での光照射と倒立状態での細胞移動の誘導方法。倒立状態では、細胞が押しつぶされないようにカバーガラス 2 枚分のスペーサー (0.34 mm) 浮かせた状態で細胞の培養を行う。(B) 正立・倒立状態でのリーダー細胞の出現数の違い。(C) 正立・倒立状態での細胞骨格 (F-アクチン) の染色。倒立状態の画像は上が頭頂部になるよう上下反転したものを示している。文献 21 より一部改変。

図 8. 光応答ハイドロゲル基板。(A) ポリアクリルアミドゲルの表面に Sulfo-SANPAH を介してポリ-D-リジンを修飾した後に、末端に活性エステルを有する光分解性 PEG を修飾し、ゲル表面に光応答性を付与する。(B) 軟らかい 5 kPa ゲル, 硬い 55 kPa ゲル, ガラス基板上での細胞集団移動のプロファイル。文献 22 より一部改変。

図 9. 弾性率と ECM 密度をいずれも制御可能な光応答ゲル基板。(A) 末端にアミノ基を有する光分解 PEG および cRGD ペプチドの化学構造。(B, C) cRGD 密度 (仕込みの濃度で表記) を増減させた軟らかいゲル (7.5 kPa) と硬いゲル (52 kPa) 上で細胞集団移動を誘導した際の、細胞集団の (B) 相対面積と (C) 円形度の時間変化。文献 23 より一部改変。