

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 串田 愛

組織工学、再生医療、細胞療法など、臨床の現場に培養細胞を用いる研究が精力的に行われている。生体から取り出した細胞を *in vitro* で培養し、分化機能を発現させることが出来たとしても、培養した状態のまま回収する方法は確立されていない。細胞の回収にトリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いる方法では、培養細胞間の接着が悪くなり、生体組織より劣った機能を有するものしか得られない。申請者は培養した細胞を、タンパク質分解酵素を用いることなしに、非侵襲的に回収する技術に着目した。申請者の所属する研究所では、温度応答性高分子、ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) を電子線照射により、組織培養用のポリスチレン製培養皿上に共有結合的に固定化させ温度応答性培養皿を開発している。この培養皿表面は 37°C の培養条件では疎水性を示し、高分子固有の下限臨界溶液温度 (LCST) である 32°C 以下では、親水性になる。細胞は一般的に比較的疎水性の表面に接着する。37°C では PIPAAm 培養皿上で様々な種類の細胞が通常の培養皿と同様に接着・伸展・増殖する。しかし、培養温度を LCST 以下に下げると、PIPAAm 培養皿表面は親水性となり、細胞は脱着する。本研究はこのような細胞脱着の新しい技術を用いて回収した細胞および細胞シートの特徴および脱着を適切に行うための生化学的要因について検討を行ったものである。以下に本論文の概略を述べる。

本論文は二部、全五章から構成されている。第一部では温度応答性培養皿からの細胞および細胞シートの脱着のメカニズムに関するものである。第一章では、LCST 以下の温度に下げることにより、温度応答性培養皿上でコンフレントに達した血管内皮細胞層を細胞-細胞間が連結した一枚の細胞シートとして回収されるが、脱着するのは、温度応答性高分子とフィブロネクチン (FN) などの細胞外マトリックスとの間の相互作用が減少することにより生じることを示した。すなわち、抗 FN 抗体を用いた組織学的・生化学的検討から FN を細胞底面に接着した状態で細胞層は脱着することが明らかとなった。したがって、別の表面へ細胞シートを接着させる際に新たな接着剤を必要としない可能性がある。第二章では、あらかじめ FN 分子を温度応答性培養皿に吸着させ、低温処理を行った。しかし、細胞なしには FN は脱着してこないことが明らかとなった。第三章ではイヌ腎上皮由来細胞株 MDCK 細胞を用

い、MDCK 細胞シートの脱着挙動を観察した。MDCK 細胞は播種後 2 週間目までは温度を下げてでも培養皿より、脱着しなかった。しかし、培養日数が増すと共に次第に脱着が容易になる。MDCK 細胞はコンフレントに達した後も増殖し、細胞一個あたりの接着面積が小さくなっていく。すなわち、MDCK 細胞シートの脱着は細胞の底面積に逆相関した。以上、三つの章から得られた結果を統一的に考察すると、細胞シートの温度応答性培養皿からの脱着には、培養皿表面の親水性化だけでなく、細胞自身の代謝、主に細胞骨格に起因した収縮力が重要に関係することが明らかとなった。細胞は培養皿上に接着・伸展すると細胞骨格に起因した牽引力を生じる。37°Cではこの牽引力と、PIPAAm 鎖と細胞外マトリックスとの相互作用とが均衡を保っており、細胞は接着している。しかし、温度が LCST 以下になり、PIPAAm 鎖が水和し表面が親水性になると、その均衡が崩れ、細胞は自らの牽引力により収縮し脱着するのである。

温度応答性培養皿からの脱着には細胞自身の収縮力が必須であるという知見をもとに、第二部では細胞シートの剥離性の向上を目指し、支持体として親水性の PVDF 膜を用い、細胞シートを回収・移動・再接着させる手法「細胞シートの二次元マニピュレーション法」の開発を検討した。第四章では、この二次元マニピュレーション法を MDCK 細胞シートの回収に適用した。MDCK 細胞は血管内皮細胞と比較し、細胞の脱着の低温処理に長い時間を要する。MDCK 細胞の収縮力が弱いことに起因することを示唆する。支持体を MDCK 細胞シート上面にくっつけて、外力も付加することにより、細胞シートの脱着を容易にすることが出来た。シートを脱着し別の表面に移動した後も β -カテニン は細胞間接着部位に局在しており、透過電子顕微鏡観察により、微絨毛やタイトジャンクション (TJ) が観察された。第五章では、細胞シートの二次元マニピュレーション法の有効性をさらに詳細に検討した。TJ を構成するオククルジン は、トリプシン処理により回収した場合は分解されていたが、二次元マニピュレーション法では維持されていた。共焦点レーザー顕微鏡観察により、 Na^+/K^+ -ATPase、グルコーストランスポーター、アクアポリンなどの局在を検討したところ、それぞれの局在が維持されていた。

以上、本論文の成果はインタクたな機能を有する細胞シートを操作できることを示したもので、組織構造の再構築への新しい道を開いたものと評価できる。一方、細胞外マトリックスの構成するマイクロ細胞環境が細胞分化の誘導・維持・復元さらには細胞の極性に基本的に関わることを解明する上でも有効な方法論を提供する可能性を秘めている。本研究は学位に相応しい内容を有するものと、審査委員会は認定した。本論文の研究成果は他の研究者との共同によるものであるが、申請者の貢献度が最も高いと評価される。串田愛氏の申請した学位論文について、審査委員は投票により評価を行い、合格とされた。したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。