

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 岡島周平

本論文は、「細胞シグナル応答材料を用いた自己修復型細胞培養材料システムの開発」と題し、細胞が発した分子シグナルを材料が認識し材料が細胞機能を自発的に制御する新規な材料システムの研究である。生体では細胞と材料が協調的に働く高度なシステムを有しているが、その生体システムを模倣した新しいシステムの開発を目的に行われ、5章から成る。

第1章は序論であり、本研究の目的を述べている。まず分子シグナル応答膜、および細胞機能を制御する機能性材料について既往の研究のレビューを行なった。その上で、死細胞からのシグナルであるカリウムイオンに反応して、その状態を劇的に変化させる分子シグナル応答膜上に細胞を培養するシステムの提案を行った。分子シグナル応答膜とは、多孔基材の細孔表面に、特定のイオンシグナルに反応して親水性または疎水性に変化するポリマーである poly-N-isopropylacrylamide-co-benzo-18-crown-6-acrylamide (NIPAM-co-BCAm) をグラフト重合法によりグラフト鎖として固定した構造を持つ膜である。この膜はカリウムイオンなどの特定シグナルを捕捉認識すると親水化する。一方、細胞は死滅すると恒常性が維持出来なくなるために細胞内部に高濃度で保持されていたカリウムイオンを流出する。細胞死が起きると人工膜界面が死細胞から流出したカリウムイオンを認識し、膜表面が細胞の接着しにくい親水性となり、死細胞の脱着が起きると考えた。これにより選択的に死細胞が脱着するだろう。さらに、死細胞脱着後はカリウムイオンが拡散しグラフト鎖が元の収縮した状態に戻るため、周辺の生細胞が増殖することで元の状態に自己修復することが可能と考え新陳代謝が可能な材料システムの提案を行った。

第2章は生細胞脱着実験について述べている。分子シグナル応答膜上に細胞を培養し、人工的にカリウムイオンを添加することにより生細胞が脱着回収可能であるか実験を行った。死細胞脱着実験の際の指針とするとともに、温度反応による細胞回収法に代わる新規なシグナルによる細胞回収法として利用できるか確認を行った。まず、接触角、SEM 写真、IR によって、分子シグナル応答膜の性能評価を行った。その後、膜上に細胞を培養し、接着細胞数の評価を行った。細胞が膜上に培養可能なことを確認し、膜上に培養した細胞に人工的にカリウムイオンを添加することにより、一定温度下で分子シグナル応答膜からのみ生細胞が脱着することを示した。また、細胞脱着はグラフト鎖の分子量に依らず、親・疎水性変化によって起きることを確認した。最後に、回収細胞の顕微鏡下観察及び生存率を測定し、60 mM のカリウムイオンを用いれば高活性を維持した細胞を回収することが可能であることを示した。以上のことから、カリウムイオンシグナルによって分子シグナル応答膜から温度変化なしで、高活性を保持した細胞の脱着が可能であることを確認した。

第3章は死細胞脱着実験について述べている。分子シグナル応答膜上に培養した細胞に紫外線を照射することにより実際に細胞死を誘導し、死細胞自身のシグナルによって死細

胞が選択的に脱着するか確認を行った。まず、カリウムイオンの拡散時間を計算し、グラフト鎖が応答可能か確認した。その後、実際に紫外線により細胞死を誘導し、分子シグナル応答膜からのみ死細胞が選択的に脱着することを示した。また、培地中にクラウンポリマーを添加することによって、死細胞から放出されるカリウムイオンが脱着のトリガーとなっていることを実験的に証明した。死細胞脱着においても、幅広いグラフト重合量で現象が発現することを示した。さらに、紫外線以外の細胞死誘導法でも同様に死細胞が脱着するか確認を行った。分子シグナル応答膜に応答しないリチウムイオンを添加することで、細胞の浸透圧を変化させて細胞死を誘導した。その結果、紫外線による死細胞脱着実験とほぼ同様の結果が得られ、異なる細胞死誘導法でもカリウムイオンが放出されれば死細胞の脱着は起き、この現象は幅広い状況に適用できることを示した。また、実験結果と既往の研究を参照することにより、死細胞脱着メカニズムの考察を行った。

第4章は細胞再生実験を行っている。紫外線による局所的な死細胞脱着を行った後、周辺細胞の増殖によって素早い再生が起きるか確認を行った。まず、フィルム基材を用いることで顕微鏡下での観察を可能にした。フィルム上に培養した細胞に紫外線を照射し、その後の再生の様子を位相差顕微鏡によって確認した。また、修復速度を観察写真から測定することで、分子シグナル応答フィルム上の細胞は非常に速い再生が起きることを発見した。炎症状態を確認するためにインターロイキン6量を定量し、分子シグナル応答膜で炎症が抑制されていることを実証した。BrdUを用いることによって活性細胞の蛍光による観察を実現させ、分子シグナル応答フィルム上の細胞は死細胞の影響を受けず、活性の高い状態が保持されることを確認した。最後に、実験結果と既往の研究から再生機構についての考察を行った。さらに、細胞増殖モデルを適用することによって、おおよその修復速度を見積もることができることを示した。

第5章は、第1章から第4章に記載した内容を総括するとともに、自己修復型細胞培養システムの具体的な応用用途について示した。死細胞を選択的に脱着し周辺細胞の活性を保つ本システムは、プライマリーカルチャーなど培養困難な細胞培養法の確立に大きく貢献出来る可能性がある。また、バイオリアクターの長寿命化にも有効であると考えられ、新規なバイオマテリアルとして有用であることを述べている。

以上要するに、本論文は今までの生体模倣材料システムに比べ、細胞と材料が協調的に働く、より生体に近い高次なシステムを開発したものである。このような協調現象は生体内においては恒常性を保つために普遍的に行われているものであるが、人工的に再現することは難しかった。本論文は新陳代謝を人工的に再現したという個別の技術開発にとどまらず、細胞と材料とを組み合わせることで細胞機能をそのシグナルによって制御出来る可能性があることを示した。これは、新たな生体材料工学分野の先駆的な研究になると考えられ、化学システム工学への貢献は大きいものと考えられる。

よって、本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。