

論文の内容の要旨

論文題目 Fabrication of micropatterned thermosensitive gels with highly-ordered honeycomb structure and their application to cell scaffolds (高秩序ハニカム構造を持つ温度応答性マイクロパターン化ゲルの作製と細胞足場材料への応用)

氏 名 前田 康弘

分子細胞生物学などの進展にともなう細胞生理の理解と再建外科における生体材料学の進歩とを基礎にして、生体組織工学などの新分野が誕生し、再生誘導治療の実現に向けて活発に研究がなされている。同時に、細胞や微生物およびその組織体の高度な情報処理能力や材料合成能が明らかになり、これらをセンサやプロセッサなどの生物素子として、または物質合成装置として工学的に応用する研究もおこなわれている。他方、細胞外基質 (ECM) に関する研究から、ある種の細胞が、足場の化学的および物理的性質によって、その接着性だけでなく、その形態や活性に関して明白に影響を受けることが分かってきた。足場の表面特性と細胞挙動の相関は近年取り組まれている課題の1つであり、一方で、これら知見をもとに、生体タンパクや生体無機物質のマイクロパターンニングや濡れ性の操作、また粘弾性分布制御など、足場表面特性を意図的かつ精密に操作することを通して、特定の細胞機能を選択的に誘導するという試みも始まっている。

本研究では、足場材料の表面微細形状制御を通じたアプローチに着目した。A. C. G. Curtisらにより1960年代に始められたこのアプローチにおいては、半導体産業で培われた精密加工技術、また近年においては自己組織化現象を利用した合成技術を基本として、溝や突起そしてハニカムといった微細構造を有する足場材料を用いている。これら先行研究によれば、異種形状はもとより同種形状においても、溝の深さや突起間隔や孔径といった各種パラメータの差異により、発現する細胞機能が異なることを報告している。この事実は、細胞自体を最小構成材料として用い、生体組織の再構築を通して欠損機能の復元を図る再生医工学において大きな意味を持つと考えられている。組織再生は、細胞接着、増殖、分化の各段階が時系列になった過程であるが、増殖活性化や分化誘導向上が達成されれば、その期間の短縮が期待できるからである。そのため近年では、3次元足場作製による細胞の空間配置制御だけでなく、接着表面修飾による細胞の増殖・分化活性制御も足場設計における重要な指針となっている。

刺激応答性高分子ゲルは外部刺激を通してその物性・化学的性質を調節できるため、近年、スマート材料として注目を集めている。この刺激応答性ゲルを用いることにより微細形状を“動的に”制御することが可能になれば、金属やセラミックまたポリマーなどにより作製された従来の足場と異なり、増殖や分化段階を随時適切に促進させることのできる足場になることが期待できる。そこで本論文では、温度応答性ゲルのマイクロパターンニングと表面微細構造形成および表面形状の温度応答挙動制御により、刺激応答性表面微細構造を有する細胞足場材料の開発を行った。

同時にこの温度応答性マイクロパターン化ゲルを用いて骨芽細胞を培養することにより、その細胞足場材料としての可能性を評価した。

以下に本論文の各章の概要を示す。

第1章 緒論．本論文の主目的であるバイオマテリアル作製に関して、特にバイオミメティクスとバイオインスピレーションに基づく研究事例についてまとめた。さらに組織工学分野における細胞足場材料研究の背景について述べ、最近注目を集めている、細胞力覚や形状応答性に基づく先行研究例を紹介した。最後に本論文の目的と構成について述べた。

第2章 コロイド結晶の作製およびマイクロパターンニングに関して述べた。毛細管マイクロモールド (MIMIC) やマイクロトランスファーモールド (μ TM) 等のソフトリソグラフィ法、およびシリコンリングを利用した移流集積法によるシリカ微粒子単層／複層コロイド結晶の作製とマイクロパターン形成を行なった。その結果、静水圧や重力を利用することにより、MIMICや μ TMで対象とされているサブミクロンサイズの微粒子だけでなく、数 \sim 10 μ mの微粒子でもコロイド結晶およびそのマイクロパターンを作製できることが明らかになった。また流路やウェルの形状に従った構造体となり、積層数を制御することが可能であることも明らかになった。移流集積法により単結晶性の高い単層微粒子パターン作製を行なった結果、表面濡れ性だけでなく、懸濁溶媒組成や溶液注入用ピペットチップの先端孔径、また乾燥時においては水平固定が重要な要素であることが明らかになった。エタノール水溶液を利用することにより表面張力が低下したため塊状微粒子の形成を防げたこと、またピペットチップ孔径が大きくなったため事前に広面積の充填配列体を形成できたこと、さらに水平化によりシリコンリング中央部に向かう移流集積効果を最大限に利用できるようになったことが理由として考えられる。

第3章 2章において示したコロイド結晶作製法に基づく温度応答性多孔材料の合成およびマイクロパターンニングについて示し、かつその膨潤収縮挙動に由来する表面ハニカム形状の変化について述べた。種々の重合法での合成を通し、光重合法が本研究における最適な合成法であることを見出した。MIMICや μ TMを利用することにより、流路パターンからドットアレイなど様々なマイクロパターン化したゲルが作製できることを明らかにした。またPDMSの溝形成面を接着して形成させた流路を利用することにより、流路接合部で化学架橋された2層構造を有するハニカムゲルを作製することが可能なことを示した。作製したゲルの温度応答性を観察した結果、基板固定化の有無により、円形状を保持したまま単純に孔径変化させることと、LCST以下で規則的な複屈折形状を出現させることを選択できるようになることを明らかにした。ハニカム多孔構造は、圧縮によりこのような複屈折現象を起こすことが有限要素法解析や均質化理論等で報告されており、基板固定により膨潤に制限が入ったことで、擬似的に圧縮がかかった状態になったからだと考えられる。固定化の有無により多様な表面微細形状変形を選択でき、従来の細胞足場とは異なる細胞足場の創製につながると示唆された。

第4章 3章までの考察をもとに、ハニカムゲルシートによる細胞培養実験について述べた。3種類のシリカ微粒子 (2 μ m, 4 μ m, 10 μ m) を用い移流集積法により作

製したコロイド結晶を鋳型とし、エタノール水溶液を反応場として光重合によりゲルシートを作製した。温度応答性のN-isopropylacrylamide (NIPAAm) ゲルだけでなく、側鎖末端にリン酸基を持つmethacryloyloxyethyl phosphate (MOEP)との共重合ゲル、およびアミン基を有するN-(3-aminopropyl)methacrylamide hydrochloride (NAPMAm) との共重合ゲルを用いた。結果、エタノール水溶液を用いてゲルを作製した場合、プレゲル溶液のモノマー濃度に応じてゲルの構造が変化することが見出された。これらを足場とし、 α -MEM (10% FBS) を培地として骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を培養した。結果、いずれの場合でも細胞が接着することが確認された。同時に異なる孔径のハニカムゲル上で培養した細胞を顕微鏡観察した結果、孔径により異なる形態を示すことがあきらかになった。培養期間を14日間とし、poly(NIPAAm-co-NAPMAm)ゲルを用いて、37°Cで培養した細胞に対してALP染色を施した。結果、ハニカム孔径に依存したALP活性があることが示唆見出された。この結果はハニカム孔径がMC3T3-E1の分化活性に影響を及ぼしうることを示唆している。

第5章 総括。本論文全体の内容をまとめるとともに、細胞足場としての刺激応答性表面形状の可能性について述べた。

本論文の遂行により、マイクロサイズの微粒子からなるコロイド結晶のマイクロパターンニング法が開発されただけでなく、それらを鋳型として用いることにより生物様の高秩序ハニカム構造を有する温度応答性ゲルの合成およびマイクロパターンニングが可能となった。またこれらハニカムゲルの表面形状が示す興味深い規則的な座屈現象を見出した。一方で、これら温度応答性ゲルで作製されたハニカム構造が細胞機能発現に影響を及ぼしうることを確認した。スマートソフトマテリアルを利用した新しい細胞足場材料の創製につながるものと期待できる。