

論文の内容の要旨

論文題目 **Cytocompatible polymeric microgel for regulation of cellular activity** (細胞親和性ポリマーマイクロゲルを用いた細胞活動制御)

氏名 相川 達男

本論文では材料工学の観点から細胞の活動を制御する材料の創製について記述した。Fig. 1 に本研究の範囲と示す。以下にその概要を記した。

第1章: 研究の意義と方針

人類は古くから生物資源を利用して自らの生活の向上はかってきた。現在では、病気や怪我で失った機能を補填するために、健康な細胞を移植するなど生きた細胞を改質・利用するにまで至った。このような細胞を活用する次世代医療に対し、有益な細胞ソースを提供することは、今後の社会の発展につながる。しかしながら、細胞ソースの利用にはまだ解決すべき問題が残されている(Fig. 2)。

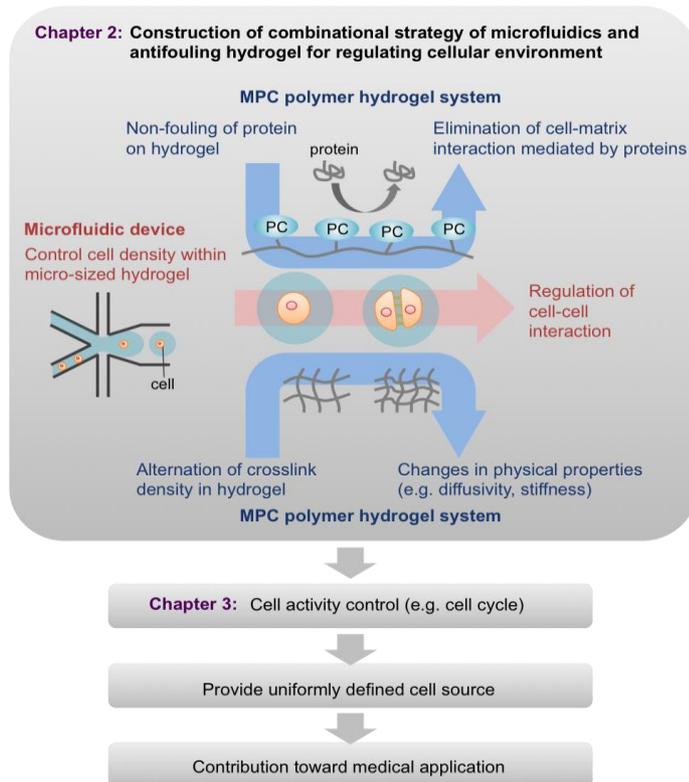


Fig. 1. Overview of this thesis.

近年、様々な細胞に分化することが可能な ES 細胞、iPS 細胞などの有益な細胞ソースの作製が達成された。一般にこれらの細胞ソースの作製方法は、上皮細胞などに溶存因子の添加、フィーダー細胞との共培養、およびウイルスベクターを用いた遺伝子導入、あるいはこれらを組み合わせた方法で細胞の初期化を行い多能性を獲得させる。その後、任意の細胞種

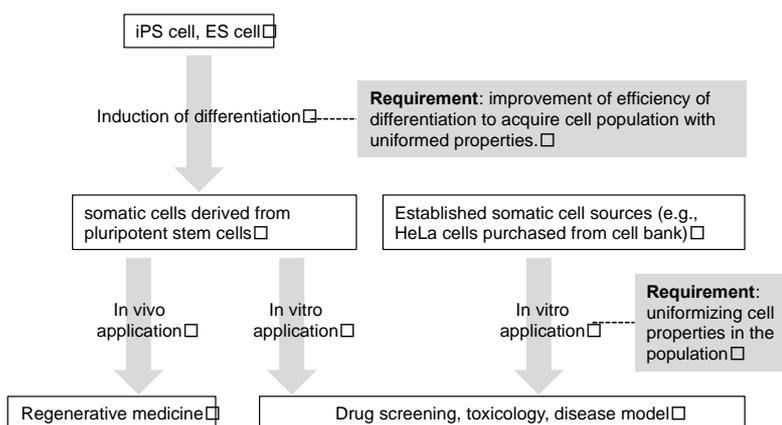


Fig. 2. Requirements in medical applications of pluripotent stem cell sources and established somatic cell sources.

に分化誘導を行い使用する。しかし、現在までこれらのプロセスを用いて分化誘導を行っても臨床応用に十分な分化効率を達成することができていない。未分化細胞は移植後、腫瘍を形成するため、未分化細胞の残存は幹細胞利用の大きな障害となっている。また別の背景では、薬物スクリーニングなどの非臨床試験に使用されている細胞ソースにおける問題がある(Fig. 2)。このような細胞ソースは互いに異なる性質をもつ個々の細胞で構成されていることが知られている。外部刺激に対し同じ応答を示す細胞で構成される細胞ソースを提供することが、より正確な薬物スクリーニング、毒性試験、および疾患モデルの作製に必要である。

本研究では、マテリアル工学の観点からこれらの問題に対しアプローチした。細胞機能の変化は下記の細胞周囲環境の要素により惹起されるシグナル伝達により、タンパク質の発現が調節されることによって引き起こされる。すなわち、膜表面受容体に結合する溶存因子の種類とその時空間分布、細胞外マトリクスに固定化されたタンパク質、隣接細胞との膜表面タンパク質、および細胞外マトリクスの物性(弾性率、分子拡散係数)が細胞機能変化の引き金である。したがって、これらの要素を制御できる生体親和性材料の設計が必要となる。以下にその設計指針を記す。

まず細胞の内包に適した人工マトリクスは、i)細胞毒性がない、ii)細胞の内包を穏やかな条件で行える、iii)物性の制御が可能であることが重要である。これらの観点から、2種のプレポリマーの混合により温和な条件下でゲル化するハイドロゲルシステムを採用した。プレポリマーのひとつとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)を主成分とするコポリマー poly[MPC-co-n-butyl methacrylate(BMA)-co-4-vinyl phenyl boronic acid(VPBA) [PMBV] を合成した (Fig. 3a)。MPC ポリマーは側鎖に細胞膜表面と同様の官能基を有しており、高い細胞親和性を持つことが示されている。また PMBV はフェニルボロン酸を有しているため、ジオール基との特異的かつ可逆的な共有結合を形成する。ポリビニルアルコール(PVA)と混合すると、温和(中性 pH、常温)な

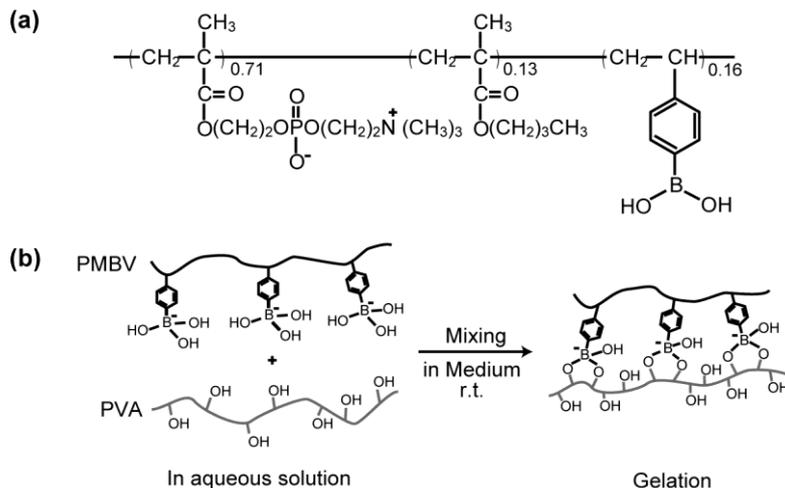


Fig. 3. The chemical structure of PMBV (a), and the gelation mechanism between PMBV and PVA (b).

条件下で水ゲル(PMBV/PVA)が得られるため(Fig. 3b)、損傷を与えずに細胞をゲルに内包することが可能である。粘弾性や拡散係数といった細胞機能に影響を及ぼす物性は、プレポリマーの濃度や混合比を変えることで調節できる。

細胞-マトリクス間相互作用はマトリクスに固定化されたタンパク質を介して引き起こされるが、MPC ポリマーはタンパク質の吸着を抑制する性質がため、ゲルで吸着タンパク質により惹起されるシグナル伝達などの細胞への刺激がない。すなわち、細胞内包マトリクスとして MPC ポリマーを用いることで細胞-マトリクス間相互作用の影響を除くことができる。細胞間の直接結合による相互作用を調節するには小さな領域内で細胞密度を制御すればよい。そのために、PMBV/PVA ゲルを細胞と同程度のサイズに微細化し、細胞を内包する。本研究では細胞数個オーダーで PMBV/PVA ゲルへ内包できるマイクロ流路システムの構築を行った。均一な直径を持つマイクロゲルを作製することは、溶存因子の受容という観点から均一な環境を内包化細胞に提供する。

第2章: 細胞環境を制御するための細胞親和性マイクロゲルの作製と物性評価

細胞を内包するためのマイクロ流路デバイスの設計を行った。流路の作製は PDMS を用いたソフトリソグラフィーを用いた。マイクロ流路の構造は2種のプレポリマーを混合し、その直後に剪断する必要がある。Flow-focusing 型の流路構造を採用した(Fig. 4)。また、安定的にマイクロゲルを作製するには、流路表面へのプレポリマーの付着を抑制する必要がある。この問題は、フッ化アルキル基をもつシランカップリング剤で流路にフッ化アルキルを導入し表面エネルギー低下させることで解決できた。得られるマイクロゲルの直径はおよそ 10–100 μm の範囲で精密に制御することが可能であり、粒径分布が非常に狭く均一なマイクロゲルが得られた(変動係数 <5%)。導入する細胞密度を調整することで、およそ 32% のマイクロゲルに 1 個から数個程度の細胞が内包できることがわかった (Fig. 5)。また、細胞の活動に影響を及ぼす物性として、粘弾性とゲル中のタンパク質の定数の測定を行った。弾性率は、~20–400 Pa であり、脳や脂肪など比較的軟らかい組織と同程度の弾性率であった (Table 1)。この弾性率はゲル中にあるフェニルボロン酸基がすべて架橋されたとして見積もった値より低く、未架橋のフェニルボロン酸が存在していることが示された。ゲルの弾性率に寄与しているのは、フェニルボロン酸と PVA 中のジオールとの結合よりも、PVA の水素

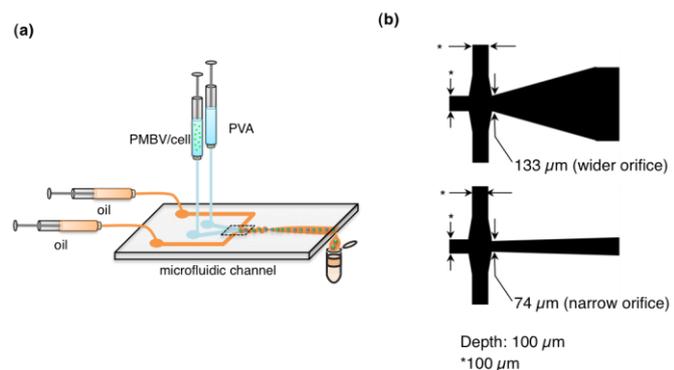


Fig. 4. Preparation of the PMBV/PVA microgels using the microfluidic channel (a), dimension of microfluidic channels with wider and narrow orifice (b).

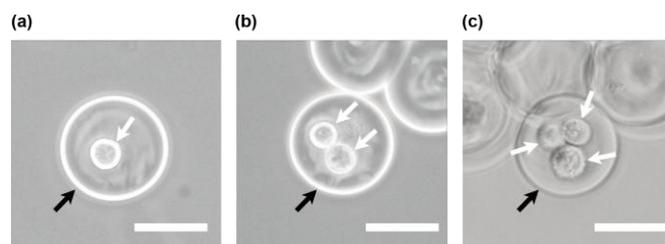


Fig. 5. Representative microscopic images of HeLa cells encapsulated in the microgel. Microfluidic device with narrow junction was used. $Q_c/Q_d= 6.0$, Scale bar = 50 μm .

Table 1. Elastic moduli and crosslink density of the PMBV/PVA hydrogel

PVA concentration used in gel preparation (wt%)	E (Pa)	$\nu_e \times 10^6$ (mol/L) ^{*1}	Crosslinked phenylboronic acid units in hydrogel (mol%) ^{*2}
1.0	24 \pm 2	3.2	3
2.5	209 \pm 13	28	28
5.0	367 \pm 25	49	49

PMBV concentration used in the preparation was 5.0 wt% (constant)

この弾性率はゲル中にあるフェニルボロン酸基がすべて架橋されたとして見積もった値より低く、未架橋のフェニルボロン酸が存在していることが示された。ゲルの弾性率に寄与しているのは、フェニルボロン酸と PVA 中のジオールとの結合よりも、PVA の水素

結合やポリマー鎖の絡み合いであると考えられる。マイクロゲル内部におけるタンパク質の拡散定数は、 $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ オーダーの範囲で調整でき、これは天然の細胞外マトリクス中における拡散定数と同程度の値である (Fig. 6)。プレポリマーの内部分布状態が不均一なマイクロゲルは、混合前後で拡散係数の差が小さいことから、架橋が効率的に形成されていないことが明らかになった。

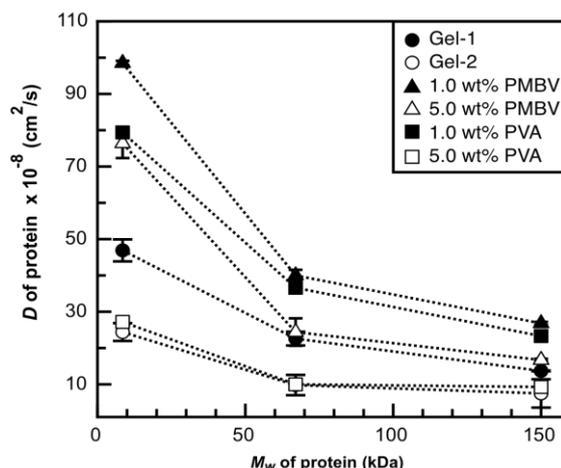


Fig. 6. Plots of diffusion coefficients of proteins in the microgels and pre-polymer solutions as a function of molecular weight of proteins.

第3章: マイクロゲル中での細胞の活動

マイクロゲルの組成を変え細胞周囲の環境を変化させると細胞周期が同調することを明らかにした。細胞が遺伝子導入や薬剤などの外部刺激を受容するのは、細胞が休止期(G1 期)にいるときであると考えられている。したがって、細胞周期を制御することは細胞の感受性を調節することにつながるため、分化誘導の効率改善につながるかと期待される。次に、ここで見られた細胞周期の変調はマイクロゲルの物性変化(e.g. 物質拡散、粘弾性)により誘起されるという仮定のもと、物性と細胞周期と関係について詳細に調べた。まず細胞に影響を与える物性以外のパラメーターである、1) 細胞間相互作用、2) 溶存因子の種類と濃度、3) 細胞-マトリクス間相互作用を固定した。これにはマイクロゲルに内包された1個細胞に注目し、かつ馴し培地中に細胞内包マイクロゲルを分散することで、細胞間相互作用と溶存因子の種類と濃度を一定にした。マイクロゲルは上述のようにタンパク質の吸着を抑制する素材であるため、細胞-マトリクス間相互作用は除かれる。このような条件では、マイクロゲルの粘弾性が細胞周期に影響を与えることが示された。マイクロゲル中の分子拡散は粘弾性の増加と共に減少するため、分子拡散変化の影響を考慮する必要がある。しかし、用いたマイクロゲルの分子拡散定数の範囲をカバーするポリマー溶液(PMBV: 1.0–5.0 wt%, または PVA:1.0–5.0 wt%)溶液中では細胞周期はコントロールと同様の進展挙動を示した。一方、マイクロゲル中では細胞周期の進展が遅れ、特に弾性率の高いマイクロゲル中では通常の培養系と比較して顕著な差が見られた (Fig. 7)。したがって、細胞-マトリクス間相互作用がない条件において、弾性率の変化は細胞周期に影響を及ぼす主要因であるといえる。

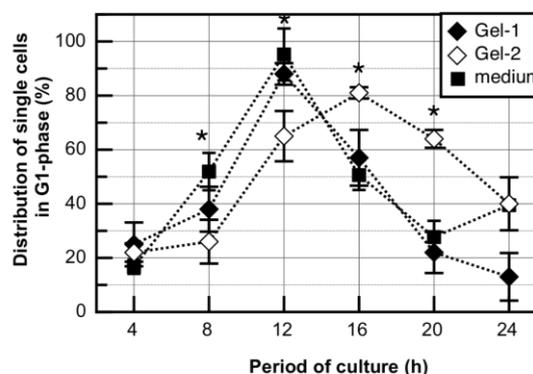


Fig. 7. The temporal changes of G1-phase distribution. Asterisk (*) indicates statistically significant difference ($p < 0.05$, $n = 3$) between pair of distribution values in the medium and in the PMBV/PVA microgel composed of 5.0 wt% PMBV/5.0 wt% PVA.

第4章: 結論

以上のように本研究では、細胞機能に影響を及ぼす細胞周囲環境を多岐にわたり緻密に制御できる細胞親和性マイクロゲルを創製した。このマトリクスを用いて細胞間相互作用、細胞-マトリクス相互作用を固定パラメーターとし、細胞周囲の物性を変化させると、粘弾性が細胞周期に変調を与えていることが示された。細胞周期の制御は、効率的な分化誘導につながるため、細胞を利用する次世代医療への貢献が期待できる。また、ここで示された知見に基づいてバイオマテリアルを設計・作製することは、細胞機能の効率的制御の実現につながる。