

氏名(本籍地)	Kyubae Lee		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	博甲第 9790 号		
学位授与年月日	令和 3年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	Influence of Solution Viscosity on Cell Functions in 3D Culture System Using Gelatin Biphasic Hydrogels (ゼラチン二相性ハイドロゲルを用いた三次元培養システムにおける溶液粘性が細胞機能に及ぼす影響)		
主査	筑波大学教授(連係大学院)	博士(工学)	陳 国平
副査	筑波大学教授(連係大学院)	博士(工学)	川上 亘作
副査	筑波大学教授(連係大学院)	博士(工学)	田口 哲志
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	辻村 清也

論 文 の 要 旨

本論文は、三次元細胞培養において、細胞機能に及ぼす溶液粘性の影響について研究を行い、その成果をまとめたもので、全5章からなる。

第1章は序論であり、著者は、細胞外微小環境が細胞の接着、増殖、分化、および遊走などの機能に及ぼす研究に関する先行文献レビューを行い、それを踏まえて本論文の目的を提示している。天然組織中の細胞は、微小環境(細胞微小環境)に囲まれて存在し、細胞の機能の多くはその細胞微小環境によって制御されている。細胞微小環境のうち、細胞成長因子やサイトカインなど生化学的な因子が細胞機能に与える影響については古くから研究されてきた。さらに、近年になって、物理的な因子、特に細胞外マトリックス(ECM)の力学的特性が細胞機能に果たす役割が注目されるようになった。これまで、細胞微小環境を模倣した様々なタイプのバイオマテリアルが設計・開発され、その中でもハイドロゲルは、親水性高分子の三次元網目構造をもつことから、細胞微小環境のモデルとして用いられてきた。天然組織のECMは粘性と弾性とを兼ねそなえた性質(粘弾性)を示すが、ハイドロゲルを用いた従来の研究の大部分はその弾性のみに注目し、粘性については見過ごされていた。最近になって、粘性の影響が報告されるようになったが、二次元培養にとどまっており、三次元培養における溶液粘性が細胞機能に対して、どのように影響するかは依然不明である。そこで本研究では、粘性溶液中で三次元細胞培養を行ったとき、溶液粘性が細胞機能に与える影響を調べるため、細胞を含有する粘性溶液相、それを取り囲むようにハイドロゲル相からなる二相性三次元培養システムを作製した。そのために、まず、異なるゼラチン溶液中にそれぞれ細胞を分散させ、4℃でインキュベートすることによって細胞を含有する物理架橋ゲルシートを作製した。次に、この細胞含有ゲルシートをナイロンメッシュで濾して細片化した。このゲル細片をメタクリ

レート化ゼラチン(GelMA)溶液中に分散させ、光ラジカル重合開始剤の存在下で光架橋反応を行った。得られたハイドロゲルを 37°C でインキュベートすると、光架橋したハイドロゲル相はゲルのままだが、上記ゲル細片は溶液となる。本培養システムを用いれば、溶液粘性が細胞の増殖や分化などの機能、細胞の形態に及ぼす影響を調べることが可能である。続く第 2~4 章ではその詳細について述べている。

第 2 章では、ウシ関節軟骨細胞(BAC)を粘性環境下で三次元培養したとき、溶液粘性が BAC の機能に与える影響を調べている。天然の軟骨組織では、軟骨細胞を三次元的に取り囲むようにして ECM が存在し、軟骨細胞の機能を維持するのに必要なシグナルを伝達している。これまで、ECM の弾性率が軟骨細胞の機能に与える影響は明らかにされてきた一方で、粘性の影響についてはほとんど不明である。そこで著者は、BACs をゼラチン溶液中で三次元培養したとき、溶液粘性が軟骨細胞の増殖、ECM 産生、および軟骨細胞表現型の維持に及ぼす影響を調べた。まず、5%、10%、15%のゼラチン含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)溶液をそれぞれ調製し、ゼラチン濃度の増加に伴って粘度が増加することをレオメーターで確認した。上記の各溶液に BAC を分散させた後、第 1 章に述べた方法を用いてゼラチン溶液相/ゼラチンハイドロゲル相からなる三次元培養システムを作製した。本システムを用いて、BAC を三次元培養したところ、ゼラチン溶液の粘性が低いほど細胞はより増殖する一方で、粘性が高いほど、硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG)産生量、II 型コラーゲンおよびアグリカン遺伝子の発現レベルがより高くなることを見出した。また、ゼラチン溶液の粘性が低いほど、細胞はより細長い形態を示した。これらの結果は、溶液粘性が高いほうが、軟骨細胞の表現型を維持するのに適し、溶液粘性が低いほうが、細胞が伸展しやすいことを示している。以上の結果から、著者は、三次元培養下の BAC の形態、増殖、および表現型の維持に対し、溶液粘性が影響を与えると結論づけた。

第 3 章では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSCs)を粘性環境下で三次元軟骨分化誘導したとき、溶液粘性がその軟骨分化に及ぼす影響を調べている。細胞外微小環境において、ECM の弾性が幹細胞の分化に影響を与えることが明らかになってきたが、溶液粘性の影響については依然不明である。本章では、ゼラチン溶液相/ゼラチンハイドロゲル相からなる三次元培養システムを用いて、粘度の異なるゼラチン溶液中(ゼラチン濃度を 5%、10%、15%と変えて粘度を調整した)で hMSC の三次元培養を行った。デキサメタゾンと TGF- β 3 の存在下または非存在下で、hMSCs の軟骨分化に対する溶液粘性の影響を調べた。細胞生死染色の結果から、培養 21 日後では、デキサメタゾン、TGF- β 3 の有無にかかわらず、大部分の細胞が生存していた。上記三次元培養システムにおいて、ゼラチン溶液の粘性が低いほど細胞増殖が促進されたのに対し、コントロールとして用いた GelMA ハイドロゲル(ゲル相のみ、溶液相を含まない)中で培養した細胞は増殖しなかった。ゼラチン溶液の粘性が高いほど、sGAG の産生レベルが増加した。デキサメタゾンおよび TGF- β 3 をともに含まないゼラチン溶液相中では、培養時間とともに I 型コラーゲン遺伝子の発現レベルは上昇したが、アグリカン遺伝子の発現レベルは低下した。デキサメタゾンおよび TGF- β 3 をともに含む場合、溶液粘度が高いほど、II 型コラーゲンとアグリカン両遺伝子の発現レベルが上昇し、軟骨分化が促進されることが分かった。以上の結果に基づき、著者は、三次元培養下の hMSCs の軟骨分化に対し、溶液粘性が影響を与えると結論づけた。

第 4 章では、hMSCs を三次元の粘性環境下で骨・脂肪同時分化誘導したとき、溶液粘性が hMSCs の骨分化および脂肪分化に与える影響を調べている。著者はまず、骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地、および両者の混合培地(骨分化/脂肪分化同時誘導)に、それぞれゼラチンを溶解させた。このとき、ゼラ

チン濃度を5%、10%、15%と変えることによって粘度を変化させ、合計9種類のゼラチン溶液を調製し、そのそれぞれに hMSCs を分散させた。次に、本溶液を用いて、ゼラチン溶液相/ゼラチンハイドロゲル相からなる三次元培養システムを作製し、三次元分化誘導を行った。その結果、骨分化誘導培地を含むゼラチン溶液中では、溶液粘性が高いほど、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、カルシウム沈着量、および骨分化関連遺伝子の発現レベルが上昇した。脂肪分化誘導培地を含むゼラチン溶液中では、溶液粘性が低いほど、多くの脂肪滴が形成され、脂肪分化関連遺伝子の発現レベルが上昇した。さらに、上記の混合培地中で培養すると、溶液粘性が高いほど骨分化が促進される一方、溶液粘性が低いほど脂肪分化が促進されることが分かった。以上の結果に基づき、三次元培養下の hMSCs の骨および脂肪分化に対し、溶液粘性が影響を与えると結論づけた。

第5章では、本論文全体を総括している。著者は、ゼラチン溶液相/ゼラチンハイドロゲル相からなる二相性三次元培養システムを用いて、溶液相の粘性が組織細胞の増殖や表現型維持に及ぼす影響、および幹細胞の増殖や分化に及ぼす影響について研究した。その結果、BAC をゼラチン溶液相で三次元培養した場合、溶液粘性が高いほど、軟骨遺伝子発現レベルおよび ECM 産生レベルは上昇する一方、細胞の増殖性は低下した。また、hMSC をゼラチン溶液相で三次元軟骨分化誘導を行った場合、溶液粘性が高いほど、sGAG 産生レベルが上昇したが、細胞の増殖性は低下した。同様に、hMSCs の骨・脂肪同時分化誘導を行った場合、溶液粘性が高いほど、脂肪分化よりも骨分化が促進された。以上のように、本論文の研究全体を通じて、細胞外微小環境として溶液の粘性が組織細胞の増殖や表現型維持に及ぼす影響、および幹細胞の増殖や分化に及ぼす重要なパラメーターであることが明らかとなった。

審 査 の 要 旨

[批評]

本論文では、三次元細胞培養において、溶液粘性が細胞機能に及ぼす影響に関する研究成果がまとめられている。細胞外マトリックスの弾性が、三次元培養下の細胞の増殖や分化などに及ぼす影響については従来の研究で多くの知見が得られているが、溶液粘性の影響については依然として不明なままである。そこで著者は、ゼラチン溶液相/ゼラチンハイドロゲル相からなる二相性三次元培養システムを用いて、溶液相の粘性が組織細胞の増殖や表現型維持に及ぼす影響、および幹細胞の増殖や分化に及ぼす影響について詳細な研究を行った。その結果、細胞外微小環境として溶液の粘性が組織細胞の増殖や表現型維持に及ぼす影響、および幹細胞の増殖や分化に及ぼす重要なパラメーターのひとつであることを明らかにした。本研究成果は、三次元の細胞微小環境としての溶液粘性の重要性を浮き彫りにし、細胞機能を制御するためのバイオマテリアルの設計と作製に関して新たな学術的知見を与えるだけでなく、三次元細胞培養の産業応用にきわめて重要な貢献をもたらすものと期待される。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分に高い学術的価値をもつと認められる。

[最終試験結果]

令和3年2月19日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において、審査委員の全員出席のも

と、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。