

氏名	Yongtao Wang
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第10085号
学位授与年月日	令和3年9月24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	Regulation of Gene Transfection of Mesenchymal Stem Cells by Micropatterned Surfaces (マイクロパターン化表面による間葉系幹細胞の遺伝導入の制御)

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	工学博士 長崎 幸夫
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

論 文 の 要 旨

本論文は、マイクロパターン化表面で制御した間葉系幹細胞の形態が外来遺伝子の導入効率に与える影響について研究した成果をまとめたもので、全6章から構成される。

第1章は序論として、細胞に外来遺伝子を導入する方法および細胞形態が細胞機能に及ぼす影響に関する先行文献をレビューし、それを踏まえて本論文の目的を提示している。細胞に外来遺伝子を導入する方法には、ウイルスを用いた生物学的方法とウイルスを利用しない物理化学的方法に分けられる。物理化学的方法は、生物学的方法と比較して安全性が高い一方、導入効率に劣るという問題がある。そこで、外来遺伝子の導入効率を高めるために、これまで様々な遺伝子キャリアが設計・合成されてきた。しかしながら、細胞形態は細胞機能に大きく影響するにもかかわらず、遺伝子導入効率に与える細胞形態の影響は注目されてこなかった。本論文では、①マイクロパターン化材料を用いてヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)の密度を制御し、細胞密度が遺伝子導入効率に与える影響、②マイクロパターン化材料を用いてhMSCの大きさ、形状、およびアスペクト比を制御し、それらが遺伝子導入効率に与える影響、③マイクロパターン化材料でhMSCの接着面積と伸展面積を制御し、それらが遺伝子導入効率に与える影響、および④マイクロパターン化材料でhMSCの細胞骨格のキラリティーと旋回角度を制御し、それらが遺伝子導入効率に与える影響について検討した。続く第2~5章ではその詳細について述べている。

第2章では、マイクロパターン化材料を用いてhMSCの密度を制御し、hMSCへの遺伝子導入に与える細胞密度の影響について調べている。従来の細胞培養法では、細胞密度を同一培養皿表面で制御し、細胞密度による遺伝子導入への影響を比較することはきわめて困難である。そこで、著者はマイクロパターン化材料を用いて同一培養皿表面で細胞密度を制御し、遺伝子導入効率における細胞密度の影響について調べた。具体的にはまず、細胞非接着分子ポリ(ビニルアル

コール) (PVA) の一部の側鎖にアジドフェニル基を結合させることによって、光反応性 PVA を合成した。次に、UV リソグラフィーで光反応性 PVA をポリスチレン (PS) 製細胞培養皿にマイクロパターン状にグラフト化することにより、細胞非接着 PVA 面積と細胞接着 PS 面積の比率が異なる正方形のマイクロパターンを形成させた。続いて、このマイクロパターン化表面で hMSC を培養したところ、PS 領域のみに細胞が接着し、しかも、PVA 領域面積と PS 領域の面積の比率に依存して細胞密度を制御できたことを確認した。次に、緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子をコードしたプラスミドとカチオン性リポソームの複合体を形成させた後、マイクロパターン表面の細胞に遺伝子導入を行った。その結果、非接着面積と細胞接着面積の比率が 4 : 1 のマイクロパターンで、遺伝子導入効率は最も高かったが、その後、非接着面積の割合が増えるにつれて減少に転じ、50 : 1 のマイクロパターンで最も低くなった。蛍光修飾ビーズの取り込み実験、BrdU 染色実験を行った結果、上記の遺伝子導入効率の違いは、細胞が外部からナノ粒子を取り込む能力および細胞の DNA 合成活性にそれぞれ起因することが分かった。以上より、著者は、hMSC への遺伝子導入に最適な細胞密度を見出すとともにその原因も解明した。

第 3 章では、マイクロパターン化材料を用いて、hMSC の大きさ、形状、およびアスペクト比が遺伝子導入効率に与える影響について述べている。第 2 章で用いたマイクロパターン化法を用いて、異なる大きさ、形状、およびアスペクト比をもつマイクロパターンを作製した。次に、このマイクロパターン化材料で hMSC を培養し、GFP 遺伝子の導入効率を調べた。その結果、細胞が大きくなるにつれて、遺伝子導入効率は有意に増加した。アスペクト比は、大きな細胞への遺伝子導入効率に影響を与えたが、小さい細胞には影響しなかった。細胞の形状は遺伝子導入効率に有意な影響を及ぼさなかった。これらの影響は、細胞骨格の構造、外部粒子の取り込み能力、および DNA 合成活性の違いに起因することを明らかにした。以上より、著者は、hMSC への遺伝子導入に対し、細胞の大きさとアスペクト比が影響を与えると結論づけた。

第 4 章では、マイクロパターン化材料を用いて、hMSC の接着面積と伸展面積が遺伝子導入効率に与える影響について述べている。著者は、第 2 章で用いたマイクロパターンニング方法を用い、直径が 40、60、80 μm の PS/PVA マイクロパターンを形成した。各マイクロパターンの内部に直径 2 μm の PS マイクロドット群を配置することにより、細胞の接着面積と伸展面積を独立して制御できるマイクロパターンを作製した。本マイクロパターン化材料にフィブロネクチンをコーティングし、hMSC を培養した後、遺伝子導入を行った。その結果、接着面積が大きい細胞ほど遺伝子導入効率が高く、細胞伸展面積は遺伝子導入効率にはほとんど影響しなかった。細胞接着面積と伸展面積が、細胞接着斑の形成と成熟、細胞骨格の組織化、メカノシグナルの伝達、取り込み能力、および DNA 合成活性に対する影響と相関していることが分かった。以上より、著者は、細胞接着面積が遺伝子導入効率に大きな影響を与えると結論づけた。

第 5 章では、マイクロパターン化材料上で、hMSC の細胞骨格のキラリティーと細胞骨格の旋回角度が遺伝子導入効率に与える影響について述べている。著者はまずキラリティーと回転角度の異なるマイクロパターンを設計・作製し、細胞骨格のキラリティーと回転角度を制御した。次に、本マイクロパターン化材料で hMSC を培養した後、遺伝子導入を行った。その結果、左旋回と右旋回の渦巻パターン上の hMSC は、同じレベルの遺伝子導入効率を示した。他方、旋回角度

によって遺伝子導入効率は異なり、旋回角度 0°、30°、60°、90°のうち、60°における遺伝子導入効率が最も低かった。これは、旋回角度が 60°のマイクロパターンでは、細胞接着斑が短くなり、アクチンフィラメントの組織化が乱れていたためと考察した。以上より、著者は、細胞骨格の旋回角度が遺伝子導入効率に影響を与えると結論づけた。

第 6 章では、本論文を総括している。著者は、光反応性 PVA を用いた UV リソグラフィーによって PS 製細胞培養皿表面に、細胞密度、細胞の大きさ、形状、アスペクト比、細胞接着面積、細胞伸展面積、および細胞骨格のキラリティーと旋回角度を制御できる種々のマイクロパターン化材料を作製した。これらのマイクロパターン化材料を用いて、hMSC の細胞形態を制御し、GFP 遺伝子導入効率に対する細胞形態の影響とそのメカニズムも明らかにした。

以上のように、本論文の研究全体を通じて、外来遺伝子導入効率に細胞形態が影響することが示された。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文では、マイクロパターン化材料を用いて間葉系幹細胞の形態を制御し、細胞形態が外来遺伝子の導入効率に及ぼす影響に関する研究成果がまとめられている。細胞形態が細胞の接着や増殖、分化、アポトーシスなどの機能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、遺伝子導入に与える影響については不明なままである。そこで著者は、マイクロパターン化材料を作製し、それを用いて間葉系幹細胞の密度、大きさ、形状、アスペクト比、接着面積、伸展面積、および細胞骨格のキラリティーと旋回角度を制御し、これらのパラメーターによる遺伝子導入への影響を明らかにした。細胞密度、大きさ、アスペクト比、接着面積、および細胞骨格の旋回角度は遺伝子導入効率に影響したが、細胞形状、伸展面積、および細胞骨格のキラリティーは遺伝子導入効率に影響を与えないことを明らかにした。本研究成果は、細胞形態が外来遺伝子の導入効率に及ぼす影響に関して新たな学術的知見を与えるだけでなく、外来遺伝子を細胞に導入する際の条件最適化において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 8 月 3 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。