氏　　名	Xinlong Wang
学　位　の　種　類	博　士（工学）
学　位　記　番　号	博　甲　第　　7930　　号
学位授与年月日	平成　28年　　9月　23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	Design and Preparation of Micropatterns to Control Cell Functions （細胞機能を制御するためのマイクロパターンの設計と作製）

主　　査	筑波大学教授	博士（工学）	陳　国平
副　　査	筑波大学教授	工学博士	金　熙榮
副　　査	筑波大学准教授	博士（工学）	田口　哲志
副　　査	筑波大学准教授	博士（工学）	荏原　充宏

論　　文　　の　　要　　旨

本論文は、工学的な手法による細胞機能の制御を実現するために、単一細胞の形状、大きさ、およびアスペクト比といったファクターを制御できるマイクロパターン化基板を新規に設計・作製し、これらのファクターと細胞機能との関係を明らかにし、さらにその原因を考察したものである。

第 1 章では、本論文の研究背景として、生体組織工学で用いられる細胞ソース、幹細胞の機能に影響を与える細胞微小環境、細胞のマイクロパターン技術が先行研究に基づいてまとめられている。そしてこれらの背景を踏まえ、本論文の研究全体を貫く目的が述べられている。

第 2 章では、細胞の大きさ、形状及びアスペクト比によるヒト間葉系幹細胞のステムネス（幹細胞性）への影響について述べられている。まず、ポリビニルアルコール（PVA）と光反応性化合物であるアジド安息香酸とカップリング反応させることにより、光反応性の PVA 誘導体を合成した。この光反応性 PVA を用いて光リソグラフィー法により、細胞培養用ポリスチレンプレート表面の「島」を、細胞が接着しない PVA の「海」で囲ったマイクロパターンを作製した。フォトマスクを設計することにより、大きさ、形状及びアスペクト比が異なる 13 種類のマイクロパターンを作製した。次に、マイクロパターン化基板を用いてヒト間葉系幹細胞を培養し、単一細胞の大きさ（伸展面積）、幾何学的形状、およびアスペクト比を制御し、これらのファクターがステムネスに及ぼす影響を調べた。その結果、細胞の伸展面積とアスペクト比の増加にともない、ステムネスの指標となる表面マーカーの染色性が低下し、ステムネス維持能は低下することが明らかとなった。一方、細胞の幾何学的形状の違いによるステムネスに有意な差は見いだされなかった。さらに、その原因を解明するために、マイクロパターン化した幹細胞の細胞骨格の染色及び細胞のヤング率測定

を行った。これらの実験結果から、細胞の伸展面積およびアスペクト比の増加に伴い、アクチンフィラメントの集合体が顕在化し、細胞のヤング率は増加することを明らかにしている。このように、本章は単一幹細胞の大きさとアスペクト比が形状よりも幹細胞のステムネスに大きく影響することを結論づけたものである。

第 3 章では、大きさが異なる円形のマイクロパターンによる幹細胞、正常細胞、および肉腫細胞の力学的性質への影響について述べられている。まず、直径 20, 40, 60, 80 μmの円形のマイクロパターンを作製し、単一の間葉系幹細胞、正常な骨芽細胞、骨肉腫細胞をそれぞれ培養した。次に、この三種類の細胞の細胞骨格、ナノメカニクス、非特異的な接着、細胞膜のラフネス及び移動を比較した。実験の結果から、肉腫細胞の細胞骨格とナノメカニクスは幹細胞と正常細胞と比べ、細胞の大きさによる影響が小さいことを明らかにしている。

第 4 章では、細胞の大きさによる金ナノ粒子の細胞への取り込みへの影響について述べられている。直径 20, 40, 60, 80 μmの円形のマイクロパターンを用いて間葉系幹細胞を培養し、単一細胞の大きさを制御した。蛍光色素 FITC で標識した金ナノ粒子を培地に添加し、細胞への取込みを調べた。単一細胞の大きくが増加するとともに、一個の細胞への金ナノ粒子の取り込み量は増加したが、細胞の単位面積あたりに換算すると取り込み量は低下していることを見いだした。これは金ナノ粒子と細胞との相互作用および細胞膜の張力によることを明らかにしたものである。

第 5 章では、幹細胞の分化に対して細胞接着と細胞伸展のどちらの寄与が大きいかという問題を提起し、実験的にその答えを導いたものである。この問題にアプローチするために、細胞接着領域と細胞伸展領域を制御できる 10 種類のマイクロパターン化基板を作製し、単一間葉系幹細胞を培養した。マイクロパターン上での間葉系幹細胞の接着斑、細胞骨格、アクチンファイバーへのミオシンの結合、細胞のヤング率、細胞核における YAP/TAZ 分布、骨分化と脂肪分化を調べ、細胞接着面積と細胞伸展がこれらの細胞機能への影響を比べた。実験の結果から、細胞接着面積は、細胞伸展に比べてこれらの細胞機能への影響が有意に大きいという結論を導いている。

第 6 章では、これまでに述べた内容の総括と今後の展望について述べられている。本論文のマイクロパターン化基板を利用することにより、単一細胞の大きさ、形状とアスペクト比を制御しながら、これまでは困難であった長期間の安定的な培養を実現し、こららのファクターによる細胞機能への影響を明らかにすることができた。研究結果は生体組織工学及び幹細胞の機能制御のための材料設計指針として役立つと述べられている。

審　査　の　要　旨

〔批評〕

本論文では、単一細胞の大きさや形状、アスペクト比などのファクターを制御するためのマイクロパターンを設計・作製し、これらのファクターによる細胞機能への影響を明らかにした。まず、光反応性のポリビニルアルコールを合成し、紫外線リソグラフィー法により、細胞培養用ポリスチレンの基板にポリビニルアルコールをマイクロパターン化した。本マイクロパターン化基板を用いて間葉系幹細胞の伸展面積、幾何学的形状、およびアスペクト比を制御し、ステムネスへの影響を調べた。細胞の伸展や伸長にしたがい、細胞骨格の秩序だった集合構造が観察され、細胞の弾性率の増加をともなった。細胞の伸展面積やア

スペクト比が増加するにつれて、ステムネスの維持能は低下した。細胞の伸展面積が小さいとき、細胞の幾何学的形状を変えてもステムネスには影響しなかった。また、大きさが異なる円形のマイクロパターンで単一の間葉系幹細胞、正常な骨芽細胞と肉腫細胞の三種類をそれぞれ培養し、細胞のナノメカニクスを調べた。肉腫細胞のナノメカニクスは幹細胞と正常細胞と比べて、細胞の大きさによる影響は小さかった。また、細胞の大きさの違いによる金ナノ粒子の細胞への取り込みへの影響を比較した。細胞が大きくなるにつれて一個の細胞への金ナノ粒子の取り込み量は増加したが、細胞の単位面積あたりに換算すると取り込み量は低下していた。さらに、細胞接着面積と細胞の伸展を精密に制御できるマイクロパターン化基板を作製し、細胞接着面積と細胞伸展が間葉系幹細胞の骨分化と脂肪分化に及す影響を明らかにした。細胞接着面積は細胞接着斑の形成や細胞骨格の組織化、細胞ヤング率、骨分化、脂肪分化などの機能への影響が細胞伸展より有意に大きかった。これらの研究成果は、マイクロパターン化基板により細胞の機能を効率よく制御できることを示し、生体材料の設計・作製において重要な学術的貢献を果たすものである。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として十分な学術的価値をもつものと認める。

〔最終試験結果〕

平成28年9月1日、数理物質科学研究科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。