

氏名	Yingjun YANG
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第 8987 号
学位授与年月日	平成 31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	

Manipulation of Mesenchymal Stem Cell Morphology and Functions through Nano- and Micro-patterned Surfaces

(ナノ及びマイクロパターン化表面による間葉系幹細胞の形態と機能の制御)

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、ナノ及びマイクロパターン化表面による間葉系幹細胞の形態と機能の制御について述べたものである。

第1章では、間葉系幹細胞(MSC)の機能、およびその影響因子に関する先行研究が文献に基づいてまとめられ、その知見を踏まえて、本論文全体の目的が提示されている。MSCは、骨、筋肉、脂肪、軟骨など様々な組織の細胞に分化するポテンシャルをもつとともに、*in vitro*で比較的容易に増殖することができるため、再生医療の有望な細胞ソースと考えられている。ただし、MSCを再生医療に用いる上では、増殖や分化、その他の機能をいかに制御するかが重要である。MSCの機能に影響を与える因子として、細胞成長因子やサイトカインなどの生化学的因子、および、静水圧、せん断応力、スティフネスなどの物理的因子が知られている。これらの因子とは別に、細胞自体の形態がMSCの機能に影響を与える影響について関する研究も行われている。しかし、細胞の形態が、MSCの分化制御と分化した表現型の維持および外来遺伝子の取り込みがどのように影響をするかは明らかではない。また、細胞の伸展と細胞の配向を同時に制御したとき、MSCの機能にどのような影響を与えるかについてはほとんど知見がない。そこで本研究では、①マイクロパターン化材料を用いてMSCの広がり面積を制御し、MSCの面積が骨分化制御と分化した表現型の維持に与える影響、②マイクロパターン化材料を用いてMSCの形態を制御し、それによって遺伝子導入効率に与える影響、および③ナノ・マイクロ複合パターン複合パターン化材料を用いて、MSCの配向と伸展を制御し、それによるMSCの分化制御について検討した。続く第2~4章では、その

詳細を述べている。

第2章では、マイクロパターン化表面を用いて、MSCの形態制御、およびそれによるMSCの骨分化と骨分化した細胞の表現型維持に与える影響について述べている。これまで、MSCの骨分化制御に細胞の形態、特に大きさ(広がり面積)が影響することが示されているが、骨分化した細胞の表現型維持に対する影響については明らかではない。そこで、マイクロパターン化材料を用いてこの影響について調べた。まず、細胞非接着分子ポリ(ビニルアルコール)(PVA)を光アジドフェニル基で化学修飾した。次に、本修飾ポリマーを用いたUVリソグラフィーによって、直径20-80 μm の円を含むマイクロパターンを細胞接着ポリスチレン(PS)表面に形成させた。MSCの形態が制御されることを確認した後、骨分化および表現型の維持に対する細胞の広がり面積の影響を、幹細胞性および骨分化マーカーの発現を指標に評価した。その結果、MSCの広がり面積が大きいほど、骨分化が促進されるとともに、分化細胞の表現型が維持されることがわかった。他方、MSCの広がり面積が小さいほど、骨分化が抑制されるとともに、幹細胞性が維持されることが示された。

第3章では、マイクロパターン化表面を用いて、MSCの形態が遺伝子導入効率に与える影響について述べている。これまで、遺伝子導入技術は様々な原理に基づいて開発されてきたが、MSCへの高効率な遺伝子導入は依然として困難である。しかも、遺伝子を導入される側である細胞の形態の影響は注目されてこなかった。著者は、まずMSCの広がり面積と伸展といった形態を制御するために、第2章で用いた方法により、種々の直径をもつ円と種々のアスペクト比をもつ楕円を含むPVA/PSマイクロパターン表面を作製した。次に、本表面でMSCを培養し、緑色蛍光タンパク質GFP遺伝子をコードしたプラスミドDNAをリポフェクション法で細胞内に導入した。蛍光顕微鏡による観察の結果、MSCの広がり面積やアスペクト比が大きいほど、遺伝子導入効率が高くなった。このような遺伝子導入効率の上昇は、MSCの広がり面積やアスペクト比の増加にともなう、カチオン性複合体の取り込み能の増大、およびDNA合成活性の上昇によって説明することができた。MSCの形態と遺伝子導入効率の影響に関する知見は、新しい遺伝子導入技術の開発につながると期待される。

第4章では、ナノ・マイクロ複合パターン化表面の作製とMSCの分化制御への応用について述べている。従来の研究では、ナノまたはマイクロパターン化表面は別々に作製して検討されてきた。さらに、細胞の配向は常に細長い形態をとらない、細胞機能に対する細胞の伸展、および配向の役割は不明である。そこで、細胞の伸展と配向を同時制御するために、ナノ・マイクロ複合パターン表面を設計した。まず、ナノインプリンティング法を用いて、細胞培養用ポリスチレン基板表面にナノ溝(幅800nm, 深さ400nm)を形成させた。次に、UVリソグラフィー法を用いて、上記ナノ溝の方向と平行または直交になるようPVAマイクロストライプを形成させた。PVAマイクロストライプの幅は、異なる間隔(50, 100, 200 μm)を有する。ナノ・マイクロ複合パターン表面上でhMSCを培養し、ナノ溝の方向によって、細胞の配向、PVAマイクロストライプの間隔によって細胞の伸展を制御した。MSCの筋分化、骨分化、および脂肪分化に対する細胞の配向および伸展の影響を調べた。その結果、筋分化は、細胞の配向によって促進されること、骨分化は細胞の伸展によって促進されること、脂肪分化は、細胞の配向や伸展のいずれによっても有意な影響を受けないことを明らかにした。

第5章では、本論文の内容を総括している。光反応性PVAを用いたUVリソグラフィーによってPS表面に、種々の直径やアスペクト比を有するマイクロパターン化表面を作製した。①MSCの広がり面積が骨

分化制御と表現型維持に与える影響、②MSC の広がり面積やアスペクト比が遺伝子導入効率に与える影響を明らかにした。さらに、③上記のマイクロパターン化法にナノインプリンティング法を組み合わせることによって、ナノ・マイクロ複合パターン化材料を作製し、MSC の骨・脂肪・筋分化を制御した。これらのパターン化表面での MSC の異なる挙動は、細胞機能の制御において細胞形態が重要であることを示している。この一連の研究成果は、幹細胞工学および組織工学のためのバイオマテリアルの設計・開発のための有用な情報を提供するはずである。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文は、マイクロパターン及びナノ・マイクロ複合パターン化表面を用いた間葉系幹細胞 (MSC) の形態と機能の制御についてまとめたものである。

著者は、MSC を再生医療に用いる上で、細胞の増殖や分化、その他の機能を制御することの重要性を鑑み、機能制御の手段として材料技術を用いることを本研究のモチベーションとしている。MSC の機能に影響する因子として、細胞成長因子などの生化学的因子、細胞外環境の静水圧やスティフネスなどの物理的因子とは別に、細胞自体の形態に注目した。すなわち、細胞の形態をナノ・マイクロパターン化材料を用いて制御し、一定の形態を付与した細胞の機能を解析するという戦略を用いている。先行研究を入念に調査し、MSC の分化制御と表現型維持や外来遺伝子の取り込みに対する細胞の形態の影響、また、配向と伸展を同時に制御したときの MSC の機能について本論文のトピックを構成した。マイクロパターン化表面を用いた周到に計画された実験によって、次の①、②を明らかにした。①MSC の広がり面積が大きいほど骨分化が促進されるとともに、分化細胞の表現型が維持される。他方、MSC の広がり面積が小さいほど、骨分化が抑制されるとともに、幹細胞性が維持される。②MSC の広がり面積やアスペクト比が大きいほど、遺伝子導入効率が高くなる。さらに、独創的な設計に基づくナノ・マイクロパターン化材料を作製し、これを用いて、③筋分化は、細胞の配向によって促進されること、骨分化は細胞の伸展によって促進されること、脂肪分化は、細胞の配向や伸展のいずれによっても有意な影響を受けないこと、を明らかにした。上記①～③の知見は、幹細胞機能制御材料や幹細胞生物学の学術的発展に寄与するだけでなく、MSC を再生医療に応用する上でもきわめて重要である。

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と認められる。

〔最終試験結果〕

平成 31 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。