

# 論文内容要旨 (和文)

平成 24 年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 北上 恵理香



論 文 題 目 生体適合性高分子材料によるヒト歯根膜細胞の接着・増殖・機能制御  
-高分子の中間水量と選択的な細胞接着との相関と再生医療への応用-

## <背景>

抜去歯から入手できるヒト歯根膜(PDL)細胞は多分化能を有する幹細胞を含んでいるので、再生医療のための有用な細胞源として期待されている。PDL 細胞を用いた再生医療を実現するためには、PDL 細胞が接着、増殖し、最終的に組織再生が可能な生体適合性足場材料が必要である。しかし、医療製品として用いられている生体適合性高分子材料は細胞が接着、増殖しないという問題点がある。したがって、細胞が接着、増殖し、最終的に組織再生を達成できるような生体適合性高分子足場材料の開発が求められている。我々はこれまでに、Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)およびその類似体の優れた生体適合性について報告している。PMEA および PMEA 類似体が優れた生体適合性を示す要因として、含水した高分子に形成される中間水という特殊な水に着目して研究を行ってきた。また、少量の中間水量を有する高分子上では血小板が粘着するが、中間水量の増加に伴い、血小板粘着が抑制されることから、生体適合性の発現には中間水の量も重要であることを報告してきた。したがって、生体適合性高分子が形成する中間水量を適切に制御した高分子足場材料を創製することができれば、生体適合性と組織細胞の接着性を併せ持った次世代生体適合性高分子足場材料を開発できるのではないかと考えた。本研究では、組織再生用の足場材料としての可能性を検討するために、中間水量の異なる生体適合性高分子である PMEA および PMEA 類似体表面上における PDL 細胞の接着性、増殖性、形態観察および細胞外マトリックス(ECM)形成能を調べた。その結果、血小板粘着を抑制する PMEA 類似体上には PDL 細胞は有意に接着した。このような細胞の接着選択性のメカニズムを解明するために、基板上に吸着したタンパク質の量や細胞接着部位の露出量と細胞接着の関係について、高分子材料の物性および水和構造の観点から考察した。

## <実験>

PMEA、PMEA 類似体および Poly[(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-co-(butyl methacrylate)] (30 : 70 mol%) (PMPC)をスピンコーターにより Polyethylene terephthalate (PET)上にコーティングした。高分子の被覆は水の静的接触角測定により確認した。細胞接着は PET、細胞培養用ポリスチレン (TCPS)、Fibronectin をコーティングした PET (FN)を陽性対照、PMPC を陰性対照とした。

PDL 細胞は 10%ウシ胎児血清(FBS)を添加した培地で培養した。各基板上で PDL 細胞を 37°C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下、 $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>で播種後、所定時間培養したのち細胞を固定し、DAPI、蛍光ファロイジン、抗ビンキュリン抗体、抗 I 型コラーゲン抗体、抗フィブロネクチン抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で細胞数、接着形態および ECM 形成能を評価した。初期接着に関しては、各基板上で PDL 細胞を 1 時間培養後、非接着細胞を PBS 洗浄にて除去し、細胞を固定した。細胞はクリスタルバイオレット法にて染色し、細胞核を計測した。

各基板上に吸着したタンパク質の量は、各基板に 10%FBS 添加培地を 1 時間吸着させた後、 $\mu$ BCA 法にて各基板上のタンパク質吸着量を評価した。また各基板上に吸着した Fibrinogen(Fbn)および FN の細胞接着部位の定量を、構造特異的抗体を用いた Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)法により評価を行った。

#### <結果・考察>

##### 初期接着(培養 1 時間)について

初期接着に着目すると、Poly[2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate] (PMe2MA)を除く全てのPMEA類似体上でPDL細胞はPETと同程度接着した。また、PMe2MAとPMPC上にはPDL細胞はほとんど接着しなかった。各高分子の接触角やガラス転移点と細胞接着には明確な相関がみられなかったが、各高分子が有する中間水量と細胞接着には良い相関がみられた。

##### 各基板上に吸着したタンパク質について

各基板上に吸着したタンパク質の量を $\mu$ BCA法にて定量化したところ、中間水量の増加に伴い、タンパク質吸着が抑制される傾向がみられた。各基板上に吸着したFbnおよびFNの細胞接着部位の定量を、構造特異的抗体を用いたELISA法により評価を行った結果、PMEAおよびPMEA類似体上では血小板が粘着するためのリガンドであるFbnの細胞接着部位の露出が少なかったことがわかった。また、PDL細胞が接着するためのリガンドであるFNの細胞接着部位の露出量を比較したところ、PMEA、PTHFA、PET2A上ではTCPSと比較して細胞接着部位の露出量は多かったが、PET2MA、PMe2MA、PMPC上ではFNの細胞接着部位の露出量に差が見られ、中間水量が増加するにつれて吸着したFNの細胞接着部位の露出量が減少することがわかった。吸着タンパク質と中間水量に関して、中間水量が増加するほど吸着タンパク質が抑制され、吸着したタンパク質の細胞接着部位の露出量が減少するという傾向がみられた。以上のように、タンパク質の種類によって構造変化のしやすさが異なるので、PMEAやPMEA類似体上では、血小板粘着は抑制されるが、PDL細胞が接着できたと考えられる。

##### 各基板上の細胞増殖、機能(ECM形成能)について

PMe2MAを除く全てのPMEA類似体上のPDL細胞はPET上の細胞と同様の増殖挙動を示した。一方、PMe2MA、PMPC上の細胞はPET上の細胞に比べ、増殖が低かった。次に、抗体染色により各基板上の細胞のECM形成能を評価した。PET、PMe2MAを除くPMEA類似体上の細胞はI型コラーゲン、フィブロネクチンの形成が良好であったが、PMe2MA、PMPC上の細胞は各ECMの形成が少なかった。以上の結果から、中間水量を適切に制御した高分子材料は生体適合性を有し、かつPDL細胞が接着、増殖し、ECM産生可能な組織再生用足場材料として期待できる。

# 学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成 27 年 2 月 16 日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 田中 賢

副査 山本 修

副査 堀田 純一

副査

副査



印

印

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

|          |                                                                     |         |                                       |
|----------|---------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------|
| 論文申請者    | バイオ工学専攻 バイオ化学分野 氏名 北上 恵理香                                           |         |                                       |
| 論文題目     | 生体適合性高分子材料によるヒト歯根膜細胞の接着・増殖・機能制御<br>-高分子の中間水量と選択的な細胞接着との相関と再生医療への応用- |         |                                       |
| 学位論文審査結果 | 合格                                                                  | 論文審査年月日 | 平成 27 年 1 月 28 日～<br>平成 27 年 2 月 13 日 |
| 論文公聴会    | 平成 27 年 2 月 13 日                                                    | 場 所     | 工学部 9 号館 300-2 教室                     |
| 最終試験結果   | 合格                                                                  | 最終試験年月日 | 平成 27 年 2 月 13 日                      |

## 学位論文の審査結果の要旨 (1,000 字程度)

本論文は、これまでに医療廃棄物として廃棄されていた抜去歯由来のヒト歯根膜細胞 (PDL 細胞) を新たな幹細胞の細胞源として選択している。さらに生体適合性を示す合成高分子が水和時に形成する中間水という特殊な水和構造に着目し、適切な中間水量を有する生体適合性合成高分子を用いることで、安全に PDL 細胞の接着、増殖、細胞外マトリックスタンパク質 (ECM) 形成を制御できることを見出したものである。本論文の構成は、以下の 5 章からなる。

第 1 章では、本研究の背景として、再生医療分野における生体適合性を示す合成高分子の重要性を述べ、さらに生体適合性と組織細胞の接着性、増殖性などを併せ持った生体適合性高分子足場材料の開発意義を述べ、本研究の重要性や目的について述べている。

第 2 章では、組織再生用の足場材料としての可能性を評価するために、中間水量が異なる生体適合性高分子を用いて、PDL 細胞の接着、増殖、細胞外マトリックスタンパク質 (ECM) 形成能を評価した。その結果、1.4~4.0 wt% の中間水を有する生体適合性高分子は抗血球細胞活性を示し、かつ PDL 細胞が接着、増殖、ECM 形成が可能な生体適合性高分子足場材料であることを明らかにしている。

第 3 章では、中間水を有する生体適合性高分子上で血小板粘着は抑制するが、PDL 細胞が接着するという細胞の接着選択性の発現メカニズムを明らかにすることを目的とし、検討を行った。その結果、水和した高分子が有する中間水量が、吸着したタンパク質の量やその変性の度合いに影響を与えた結果、最終的な血小板粘着数と PDL 細胞の接着数に変化を与えていることを明らかにしている。

第 4 章では、超解像蛍光顕微鏡を用いて、生体適合性高分子基板上に接着した細胞の接着部位を高空間分解能で観察することを目的とした。超解像蛍光顕微鏡観察可能な透明性の高い高分子被覆基板の作製方法を確立し、その後、その基板上で培養した細胞の接着点を、超解像蛍光顕微鏡を用いて高空間分解能で観察することに成功した。本手法を応用することで、さまざまな高分子バイオマテリアルと細胞間相互作用の解析への応用が期待される。

第 5 章では本論文を総括し、各章において得られた結論をまとめている。

本研究の成果は、1 報の英文学術論文として掲載済みである。さらに国際学会発表 14 件、国内学会発表 11 件、特許出願 1 件を行っている。また、国際学会において表彰されている。以上の研究成果を総合的に判断し、本論文に関する研究およびその成果は、学術的にも工学的にも価値があるものと認め、博士 (工学) の学位論文として合格と判定した。

## 最終試験の結果の要旨

公聴会における学位論文を中心とした 30 分の口頭発表、ならび 30 分の質疑応答を最終試験とした。最終試験は、主査および 2 名の副査による学位論文の審査、ならびに公聴会での口頭発表および発表内容と関連ある科目について口頭試問により厳正な審査を行った。その結果、博士論文として十分な内容とそれを裏付ける公聴会発表、口頭試問での受け答えであり、申請者の学力も工学博士として相応しいものであると認められたため、最終試験を合格と判定した。