

早稲田大学博士論文(審査報告書)		
	学位記	文科省報告
2006	4483	① 2296 乙

36

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

Fabrication of a Cell Array
for Biological Applications Utilizing
Hydrophilic Nano-bio Interfaces

親水性ナノバイオ界面の構築と生物学的応
用を目指した細胞アレイの作製

申請者

Shintaroh Iwanaga
岩永 進太郎

応用化学専攻 化学工学研究

2007年 3月

近年、医療分野や生化学分野において遺伝子やタンパク質を用いた生体情報制御が重要視されている。ゲノム(genome)およびプロテオーム(proteome)解析の発展により、難病の発症メカニズムの理解や創薬プロセスに大きな影響を及ぼすと考えられる。昨今ではそれらに加え、細胞を用いたセローム(cellome)解析の開発が著しい進歩を遂げている。細胞は生体を構成する最小単位であり、遺伝子やタンパク質がその機能を発揮する場所でもある。細胞を用いることによって得られる結果は、生体物質の機能状態が我々の生体環境に極めて近い状態での情報を提供し、延いては個人の生体情報をもとにしたテーラーメイド医療の発展へつなぐと期待される。これら生体物質の解析方法を飛躍的に進歩させたものがチップやアレイといったデバイス表面へのパターンニング手法である。

本学位論文では、新たなマイクロチップ作製法により細胞をパターン化し、心筋細胞の拍動変化を観察することで、アレイの機能解析への応用を検討している。新規作製法によって安定性の高い表面構築を行うことが可能であり、長期間の培養維持に成功している。これらの成果は、今後、機能的なバイオマテリアルの構築や細胞医療分野への貢献が期待される。本論文は全4章から構成されており、以下にその審査要旨を述べる。

第1章では序論として、本論文の要であるバイオマテリアルの歴史およびその特性について述べている。また、本研究の主旨およびオリジナリティーがまとめられている。

第2章では、細胞アレイ作製の前段階である親水性高分子固定化表面の作製について述べている。生体物質をデバイス表面にパターン化する方法は種々報告されているが、パターン化の基本は何れも同じで、接着部位および非接着部位の制御が必要となる。細胞は親水性表面または極端な疎水性表面には接着をしないことが知られているため、第一段階として、市販のポリスチレン性の細胞培養ディッシュ(TCPS)表面に親水性高分子を固定化することでパターン化に必要な細胞非接着表面の構築を試みている。親水性高分子としては *N*-メチルアクリルアミド(MAAm)、アクリル酸(AAc)、2-ヒドロキシメチルアクリルアミド(HMAAm)、アクリルアミド(AAm)の4種類を用いて表面を構築している。高分子を固定化する方法として、電子線重合法により表面に共有結合的に修飾する方法を選択しているが、これは従来法と比較し、様々な表面に適用可能であること、また、簡便に安定性の高い表面を作ることが可能な方法である。それぞれ、モノマーの濃度を変化させてTCPSに固定化した表面を作製し、以下のように表面物性の検討を行っている。表面の親水性がどの程度かを測定するため、静的接触角法により各表面の接触角を測定し、評価している。何れの表面も未修飾のTCPSより低い接触角の値を

示したことから、高分子が固定化されて表面が親水性になっていることを明らかにしている。また、高分子固定化表面にウシ血管内皮細胞(EC)を播種して培養し、表面における細胞接着性の観察を行っている。各高分子固定化表面において、調製溶液の濃度が高くなると細胞の接着性が低くなることを観察しているが、細胞が全く接着しない表面の作製が可能であったのは HMMAm と AAm という結論を生み出している。そこで、低濃度のモノマー溶液で細胞非接着表面を作製可能であった AAm 固定化 TCPS(PAAm-TCPS) のみに着目し、更に詳しく表面分析を行っている。FT-IR および XPS により PAAm-TCPS 表面のスペクトル分析を行うことにより、PAAm-TCPS 表面には均一に PAAm が固定化されており、作製時のモノマー濃度を調整することによって固定化する PAAm 層の厚みを制御可能なことを見出している。また、PAAm-TCPS 表面で EC を培養することで、表面の細胞非接着性と増殖の様子を検討している。その結果、低濃度で作製した表面では、細胞は接着するだけでなく増殖することを確認しているが、細胞がコンフルエントになることは無いことを明らかにしている。低濃度の表面の場合、非常に早い初期の段階では培養液中のタンパク質が吸着することで細胞の接着が促進され、ある程度の時間が経過した後に表面が十分に水和されて、その後の細胞接着性が低くなると考察している。このことを確認するため、予めリン酸緩衝液(PBS)にて表面を濡らした場合の接触角変化と細胞接着性の観察を行っている。各 PAAm-TCPS を PBS にて湿潤させ、バブル法によって継時的に表面の接触角を測定し、親水性が低かった表面も 24 時間後には非常に親水性が高くなっていることを見出している。また、12 時間以上 PBS にて湿潤させた表面に細胞を播種して培養したところ、全ての PAAm-TCPS において細胞の接着が観察されていないことを実証している。これらの結果より、PAAm 層の薄い表面でも基材界面で水和が起こることによってタンパク質の吸着および細胞の接着を著しく抑制することを示唆している。本研究により作製された親水性表面は従来の細胞非接着性表面と比較しても非常に高いバイオインерт性を有しており、バイオマテリアルとしての機能性・実用性は非常に高い。また、基材-細胞・タンパク質間の相互作用を詳細に評価している価値のある研究である。

第 3 章では、作製した PAAm-TCPS 表面上に細胞をパターン化するための加工条件の検討およびパターン化アレイ表面上における細胞の機能評価の可能性について述べている。これまで報告されている細胞のパターン化表面作製手法は煩雑な工程を経る必要が多い。また、長期培養に耐えうる表面ではなく、短期的な細胞機能の観察にしか使えないなどの問題がある。そこで、PAAm-TCPS を加工することによってわずか数工程でアレイを作製し、細胞の機能評価を行うことで、本パターン化表面の生物学的応用への検討を行っている。PAAm-TCPS は市販の細胞培養基材の表面上に親水性高分子を修飾

しているため、微細加工によって下地を露出させることで細胞接着性領域と非接着性領域の局所的な作製が期待される。そこで、UV エキシマレーザーを用いて表面の微細加工を行い、加工条件の検証をしている。レーザーの強度を制御することにより、加工部位の高分子にほとんど物性変化を与えることなく、細胞接着性領域である下地の TCPS 表面を露出させることを明らかにしている。AFM の結果により、微細加工を施したドメインと施していない部位の両方において表面は均一であり、微細加工部の深さは 35 nm 程度であることを見出している。続いて微細加工表面で細胞のパターン化を実現するために、表面における接着タンパク質処理の検討を行っている。接着タンパク質であるフィブロネクチン(FN)の PBS 溶液で表面を処理し、EC を播種したところ、細胞をパターン化するのに至適な FN 濃度が存在することが見出されている。至適濃度の FN 溶液で処理することによって、ドメインの大きさを変化させてもパターン通りの細胞アレイの作製が可能であり、加工部の大きさを制御することで 1~数十ないし数百個の細胞数制御が可能であることを確認している。また、作製したアレイで 2 ヶ月もの長期間に渡ってパターン化形状を崩すことなく培養することが可能であることも確認している。この表面上で培養した心筋細胞は結合している細胞数によって拍動状態の安定性が変化することを見出している。これは、ある程度の細胞塊となることにより、単純な細胞の機能からより組織に近い機能を獲得しているためと考察している。このように、本論文は今までなしえなかった長期的なパターン化培養表面の維持に関しての初めての報告であり、そのオリジナリティーはきわめて高い。また、心筋細胞を用いた機能性の評価に関する報告しており、細胞チップの生物学的応用への有用性が高いことを示している。

第 4 章では総括として、本研究にて得られた知見をまとめている。

以上で述べたように、本学位論文では新規な表面作製法を用いることで、これまでに無い簡便でバイオイナート性の非常に高い表面の構築および細胞のパターン化に成功している。また、作製した表面で心筋細胞の拍動状態の変化を捉えるなどの成果を得ることによってその生物学的な応用展開の可能性を示している。今までの手法にとらわれずに、果敢に新しい方法に取り組んで得られた成果は医工学分野における独創的で多くの可能性を秘めた研究により得られたものであり、今後の医療分野への貢献は非常に大きいと考える。よって本学位論文は博士(工学)の学位授与に十分値するものと認める。

2007 年 2 月

審査員 (主査) 早稲田大学 教授 工学博士 (早稲田大学) 酒井清孝
早稲田大学 教授 工学博士 (早稲田大学) 平沢 泉
早稲田大学 助教授 博士(工学) 東京大学 常田 聡