

博士論文審査報告書

論文題目

細胞-基材界面の蛍光観察に特化した
温度応答性高分子超薄膜に関する研究

Ultra-thin temperature-responsive polymer layer
for bioimaging

申請者

福守	一浩
Kazuhiro	Fukumori

応用化学専攻 化学工学研究

2010年 7月

本学位論文は、移植医療への臨床応用も行われている細胞シート工学の根幹技術である温度応答性培養表面に対して、温度条件変化に伴う挙動変化について動的かつ定量的な解析を行い、細胞接着・脱着の機能発現のメカニズムの詳細を明らかにしている。これら解析の実現のため、細胞-基材界面のタンパク質および高分子の蛍光観察を可能とする、温度応答性高分子を超薄膜構造とした新たな解析系を構築している。

温度応答性高分子として知られる poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm)を電子線重合法により固定化した温度応答性培養皿は 32°C を境に培養皿表面が高温側で疎水性、低温側で親水性に変化する。この性質を利用することで温度変化により培養皿表面上で細胞の接着・脱着を制御し、細胞をシート状で回収することが可能である。この細胞シートを用いた角膜上皮シートの移植など臨床応用も行われている。これら細胞の接着・脱着現象はポリスチレン製組織培養皿(TCPS)上に固定化されたポリマー層の厚みが約 15 nm の超薄膜の場合にのみ観察され、その厚みが約 30 nm 程度まで厚くなると細胞の接着性が著しく低下することが報告されている。細胞の接着・脱着の挙動は、グラフト PIPAAm 鎖の水和状態の変化が大きく関与していると考えられている。温度応答性高分子層の水和挙動は、厚み、密度、構造、さらに固定器材の物性などにより大きく変化するが、その水和挙動と培養細胞との相互作用を動的かつ定量的に評価した報告は極めて少なく、細胞脱着のメカニズムは未解明な点が多い。また、材料表面での細胞接着関連タンパク質(細胞外マトリックス(ECM)およびインテグリン等の細胞膜表層のECM受容体)の相互作用を分子レベルで動的に捕らえる事は、細胞接着によって引き起こされる細胞機能変化の解析、解明において極めて重要である。

本学位論文では、界面近傍のみを高感度に観察できる全反射型蛍光顕微鏡(TIRFM)に着目し、TIRFMによる細胞接・脱着時の測定が可能な温度応答性薄膜をガラス表面に固定した解析系を新たに構築すると共に、その水中における膨潤・収縮状態が培養細胞にあたえる影響、および細胞接・脱着時の接着班関連タンパク質の動的な挙動についての定量的かつ詳細な検討を行っている。

本論文は、以下の4章より構成されており、以下に順次審査要旨を述べる。

第1章は、温度応答性高分子ゲルの特性とそれを固定化した表面の応用を既往研究から振り返り、温度応答性表面と培養細胞との相互作用について現状で未解明な点を明らかにしている。さらに温度応答性超薄膜の近傍のみを高感度で蛍光観察可能な顕微鏡法および、超薄膜表面とプローブとの微小な相互作用を検出できるAFM測定技術情報をまとめ、溶液中における温度応答性表面の膨潤・収縮挙動の新規な解析方法を提案している。これらを踏まえ、本論文の目的と意義をまとめている。

第2章では、電子線重合法により種々のモノマー濃度で温度応答性高分子をガラス表面に固定化し、その表面特性が培養細胞の接・脱着に与える影響

を検討している。ガラス表面上に固定化されたポリマー膜厚を原子間力顕微鏡 (AFM) で測定している。この結果、仕込みモノマー濃度の増加に従いポリマー膜厚は 3.5 から 9.6 nm の範囲で増加し、仕込みモノマー濃度を变化させることで、PIPAAm 固定化層の厚みをナノメートルオーダーで制御できることを定量的に示している。ついで、これらの表面の 20°C および 37°C での水に対する濡れ性を静的接触角法により評価している。その結果、すべての PIPAAm 固定化ガラス表面で、高温側では疎水性を示し、低温側では親水性を示す温度応答性の表面であることを確認している。また、モノマー濃度の増加にともない表面がより親水性に変化しており、これは、ポリマーの厚みが増加することで、ポリマー表層部の高分子鎖の分子運動性に対する基材物性による抑制が小さくなるため、その結果、高分子鎖の水和が促進され、親水的な表面になったためと考えられる。これらの表面特性の結果を踏まえ、PIPAAm 固定化ガラスの細胞接着性および脱着性についてウシ頸動脈由来内皮細胞を用いて検討を行っている。細胞の接着性はポリマー膜厚の一番薄い 3.5 nm の表面が最も接着性が高く、膜厚の増加にともない接着性が低下する結果を得ている。また、膜厚 7.4 nm 以上の PIPAAm 固定化表面は細胞非接着性を示し、ポリマー膜厚の増加にともなう表面の親水性化の結果と傾向が一致することを確認している。これは、水中(培地中)の PIPAAm 固定化層は相転移温度以上 (37°C) でも脱水和しているが、固定化層の厚みが増加するに従い高分子鎖の水和が促進し、細胞接着を抑制する表面となったと考察されている。さらに低温処理により PIPAAm を固定化したガラス表面から 1 時間以内にほぼ全ての細胞が脱着することを明らかにしている。これらの結果で特に興味深いのは、温度変化により培養細胞の接・脱着の制御が可能な温度応答性表面を作製するためには、3.5 nm 程度の超薄膜 PIPAAm 層を構築する必要があることを定量的に明らかにしたことである。細胞接着性が PIPAAm 層の厚みに強く依存する現象はポリスチレン製基材と同様であるが、その厚みをより薄くする必要があるのは基材表面物性の違いが固定化温度応答性表面の物性に強く影響をおよぼす可能性を示唆している。これは、様々な基材に PIPAAm を固定化するに当たり有用な知見であり、特に電子線重合法による温度応答性培養基材の開発に非常に有効であると高く評価できる。

第 3 章では、温度応答性高分子薄膜表面の水和状態の詳細な解析と細胞接着タンパクの吸着挙動について検討を行っている。乾燥時において 3.3 および 8.8 nm の 2 種類のポリマー膜厚の PIPAAm 固定化表面を作製し、AFM 測定により 25°C および 37°C の PIPAAm 固定化層の厚みの変化を定量している。この結果、ポリマー膜厚 3.3 nm の表面は 37°C から 25°C に温度を变化させても 2 nm 程度膨潤しただけであったが、膜厚 8.8 nm の表面では 12 nm 程度膨潤することを示している。また、37°C における細胞接着タンパク質(フィブロネクチン)の吸着実験では、膜厚 3.3 nm の表面で 330 ng/cm² と膜厚 8.8 nm の表面で 130 ng/cm² と厚みの増加にともない強いタンパク質吸着の

抑制が起こることを明らかにしている。これらの結果から、膜厚の厚い表面は 37°C においても比較的水和が促進されており、細胞接着タンパクとの相互作用も弱いと考えられる。そのため、相転移温度以上の 37°C においても膜厚 8.8 nm の表面は細胞非接着性を示すと考察している。さらに、AFM を用いたフォースカーブ測定により、低温処理時の疎水性処理チップと PIPAAm 固定化表面の相互作用の変化を経時的に評価している。これにより、温度応答性超薄膜の相転移時の水和挙動を動的に定量することに成功している。膜厚 3.3 nm の PIPAAm 表面と疎水性チップとの相互作用は、低温処理から 30 分程度で約 20 nN から約 3 nN に大きく低下しており、細胞剥離挙動と強い相関があることが示されている。このような PIPAAm 表面と疎水性チップとの相互作用の変化を、細胞接着性と関連づけて動的に評価した例はこれまでに報告がなく、非常に新規性が高い。また、バルク状態で膨潤・収縮が加速することが報告されているグラフトゲルなど、温度応答性固定化層の構造を変化させた際の水和挙動を超薄膜の表面でも評価できると期待できる。これらの点は、独創的で工学的にも有用であることから、評価に値する。

第 4 章では、温度応答性高分子表面から低温処理により剥離する正常ヒト臍帯静脈内皮細胞のインテグリン β 1 サブユニットのクラスターの挙動を TIRFM により測定し、タンパク質分解酵素であるトリプシンを用いた場合との違いを検討している。その結果、低温処理により方法では、部分的にインテグリンを基材表面に残しながら剥離することを示している。一方、トリプシン処理による細胞の剥離過程では基材表面に大部分のインテグリン分子が残存する結果が観察され、これをトリプシン処理による細胞の剥離過程で、インテグリン分子が切断されたためと考察している。また低温処理による細胞の脱着時のクラスターの移動が、約 15 秒で 3 μ m 程度移動する非常に変化の大きなものであることを明らかにしたことは、将来的な温度応答性表面の評価方法の指針となる重要な知見であり、高く評価できる。

以上のように、本論文では、電子線重合法を用いてガラス表面上に温度応答性超薄膜を構築し、固定化基材の材料物性および温度応答性高分子の水和挙動ならびに培養細胞の接着・脱着挙動の相関について定量的な解析を行っている。また、作製した表面を用いて、細胞膜タンパクの蛍光イメージングにより、細胞剥離法の違いによる膜タンパクへの影響を動的に評価している。その研究成果は、再生医療の発展へと繋がる新規温度応答性培養床の開発に広く貢献し、工学的にも非常に価値が高い独創的なものと考えられる。よって本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2010 年 7 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 准教授 博士（工学）東京大学 武田直也