

Cell adhesion behavior on patterned substrates

(パターン化された基板上での細胞接着挙動)

学位論文内容の要旨

細胞・基質間の接着を制御することで伸展や分化機能などの応答を刺激したり、増殖やアポトーシスによる細胞死などの遺伝子発現を制御するなどの研究が行われている。フォトリソグラフィーやマイクロコンタクトプリンティングなどのパターン化技術の発達により、マイクロメートルスケールの領域で化学的または立体的な微細加工が可能になり、このパターン化技術を応用した新たな細胞培養基材、生体適合性材料の開発も試みられている。このように生体材料の開発において、材料表面の化学的な性質のみならず、表面構造も考慮した細胞接着面の設計の重要性が提示されている。

このような背景をもとに本研究では、これまでに当研究室で見出されている孔径数 μm のパターン状多孔構造を有するフィルム(Fig.1)を表面微細加工を施した細胞培養基材として応用し、細胞接着面の物理的および化学的な特性を利用した新規な細胞培養基材、生体適合性材料の開発を試みた。また、このパターン化フィルム上での血管内皮細胞の培養および肝細胞の接着、形態、肝細胞機能について調べ、パターン化フィルムによる細胞応答の制御を検討した。

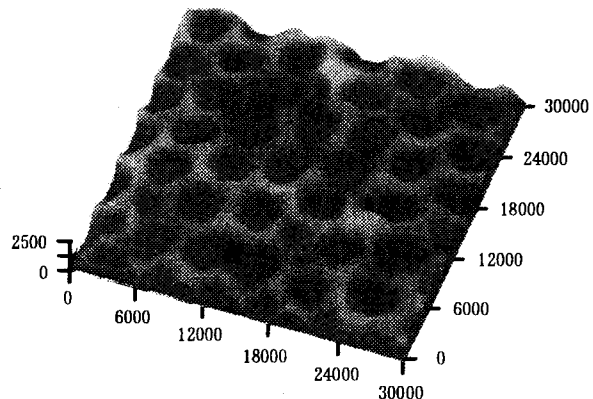


Fig. 1 AFM image of the honeycomb patterned film (scale: nm)

第一章では、これまでに行われている組織工学的なスキャフォールドおよび細胞外マトリックス等の細胞接着面の重要性に関する研究を概説し、細胞の足場となる材料が、用いた細胞に対して至適な接着面を提供する必要があることを示した。さらに、生体材料の微細加工法の問題点を指摘し、本研究における表面微細加工法および加工された材料が、この問題の解決に向けたアプローチとなることを述べた。

第二章では、高湿度キャスト法による固体基板上でのハニカムパターン構造のポリマーフィルム表面への導入と、パターン化フィルムの表面構造の評価およびパターン化フィルム上での血管内皮細胞の培養を試みた。その結果、パターン化フィルムは内皮細胞の接着や形

態を阻害せず、培養基材として用いることが出来ることが解った。

第三章では、肝細胞の高機能発現の形態で知られるスフェロイドの早期作製およびパターン化フィルム上での肝細胞スフェロイドの培養を試みた。その結果、肝細胞スフェロイドをパターン化された基板上に固定化できる事が解った。第四章では、高湿度キャスト法による水面上での微細加工法とパターン化された表面構造の評価およびパターン化フィルム上での肝細胞の培養を試みた。第一節では、水面上での高湿度キャスト法を用いて側鎖にラクトース基を有するポリマーから成るパターン化フィルムを作製した。

第二節では、パターン化フィルム上での肝細胞培養および肝細胞の形態や機能に与えるパターン表面の物理的影響を調べた。その結果、肝細胞はパターン化フィルム上と平膜上とは明らかに異なる形態(Fig.2)を示し、肝細胞機能にも影響が見られた。このことからサブセルラースケールのパターン構造の有無が肝細胞の挙動に大きく影響することが解った。第三節では、パターン化フィルムのフィルム部分と空孔部分とで接着性の異なる基板を作製し、その基板上での肝細胞の培養を試みた。その結果、肝細胞はフィルムの空孔部分の接着性の違いに応じて形態が異なり、

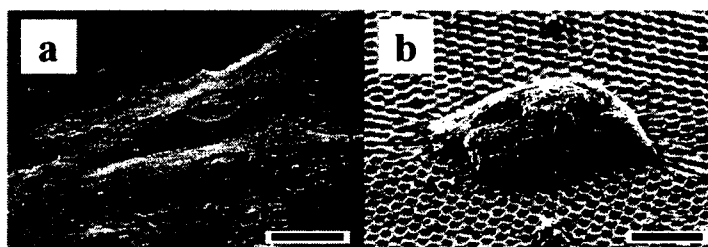


Fig. 2 Morphology of hepatocytes on (a) the unpatterned film and (b) the honeycomb patterned film (bar: 25 μ m)

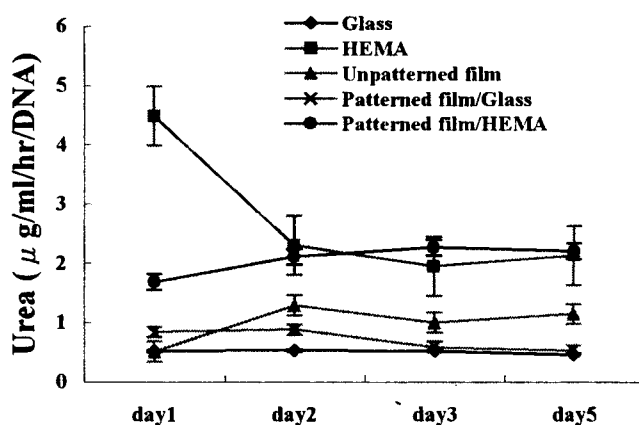


Fig.3 Urea synthesis

その形態を反映した機能が発現されていた(Fig.3)。これは肝細胞がパターン化フィルムの空孔部分の化学的性質の違いを認識することにより誘導されたことを示している。

以上の結果から、高湿度キャスト法はサブセルラースケールのハニカムパターン状多孔構造を導入する微細加工法として用いることが出来ること、さらにパターン化フィルムを用いた物理的および化学的な性質が接着依存性細胞の挙動に影響を与えることが明らかになった。このことから、この微細加工法による材料の物理的・化学的な両特性を活かした新規生体材料の開発が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 下 村 政 嗣

副 査 教 授 喜 多 村 昇

副 査 教 授 田 村 守

副 査 助 教 授 居 城 邦 治

学 位 論 文 題 名

Cell adhesion behavior on patterned substrates

(パターン化された基板上での細胞接着挙動)

医用材料や人工臓器、組織工学などを支えるバイオマテリアルの開発において、材料の表面と生体物質や細胞との界面であるバイオインターフェースの設計は、材料表面の化学構造や物性が細胞の接着、増殖、形態や機能などに著しく影響を与えることから、極めて重要である。具体的には、材料表面の塗れ性、潤滑性、抗血栓性などの生体適合性の向上や付与、細胞接着因子の積極的な導入などが数多く報告されてきた。一方、培養基板の表面形状や微細構造が細胞の接着、形態や機能発現に大きく影響することが注目されはじめており、材料表面の化学的な性質のみならず、材料表面の起伏のようなマイクロあるいはサブマイクロメートルレベルにおける物理的な形状もバイオインターフェースを特徴づけるものであることが明らかになってきた。

本論文は、溶媒の蒸発などの非平衡プロセスで生じる規則構造を利用してサブセルラーレベルで規則的なメゾスコピックパターン構造を有する高分子からなる新たな細胞培養基材を作製し、基材表面のトポロジカルな性質が細胞培養におよぼす効果を明らかにしたものである。著者は、糖鎖あるいは親水基を有するアクリルアミド系の両親媒性高分子の希薄溶液を高湿度下で固体基板上にキャストすることで、直径数マイクロメートルの孔がハニカム状に規則正しく開いた多孔性薄膜を得た。ハニカムフィルム上での内皮細胞の接着と培養を検討した結果、サブセルラーレベルの凹凸があっても細胞が接着することを見いだした。また、ラットの肝細胞の培養にハニカム構造フィルムを用いたところ、肝実質細胞がハニカム形成によりマイクロパターン化された細胞接着領域と非接着領域を認識し、その接着性、伸展挙動が影響を受けることを見出した。さらに、パターン化されていないフラットな表面では肝細胞は単層接着し良く伸展するのに対し、ハニカムフィルム上ではいくつかの細胞が塊状に集合したスフェロイドを形成することを見いだした。

これを要するに、著者は、サブセルラーレベルの基材表面微細構造と細胞形態・機能の関連性を得たものであり、ハニカム構造高分子が細胞と細胞培養基材の相互作用、とりわけトポロジカルな効果を科学的に検討できる材料であることを明らかにしたものと、

材料化学に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格のあるものと認める。