

博士(工学)里見智美

学位論文題名

機能性細胞接着制御システムの創製

学位論文内容の要旨

再生医療とは、失われた細胞や組織を再生して補う医療であり、臓器移植の際の深刻なドナー不足を解消する画期的な医療として、近年注目されている。ES 細胞の発見以降、ES 細胞の分化誘導などの生物学的なアプローチが再生医療においては脚光を浴びていたが、ここには、付随する拒絶反応、生命倫理的問題が存在する。これに対し、材料方面からのアプローチに関する研究も近年急速な進歩をとげている。たとえば、Vacanti 兄弟と R. Langer による「耳マウス」は強烈なインパクトと共に「Tissue Engineering」という言葉を世間に広く知らしめた。実際にヌードマウスの背中に形成された耳は耳として機能するものではないが、それでも、再生医療における材料の重要性は示された。このようにして再生医療において、材料分野と医学との融合は必要不可欠である。前述した耳マウスのように、三次元的に組織を構築するためには、材料は必要不可欠なものであることは言うまでもないが、臨床応用可能な組織培養を確立する以前に、高い分化機能を長期間保持できる細胞ソースとその培養方法の確立は重要な課題である。本研究では、この課題をクリアする方法として、「細胞スフェロイド(塊)」という考え方方に着目した。細胞スフェロイドはその形態から、生来の組織に最も近い機能を保持するものとして注目されていたが、これまでの研究では、細胞スフェロイドはmmオーダーの大変大きなものや、大きさの不均一なものでしか達成されなかった。これらの大きなスフェロイドは、微重力下での細胞培養や、丸底細胞非接着表面上での高密度培養によって達成されるものだが、スフェロイド内部まで酸素や栄養の透過が十分に行われないことから、内部細胞壊死の問題があり、実際に医療に応用することが難しかった。ここで、本研究では、均一な大きさを保つ、微小細胞スフェロイドアレイの創製を試みた。細胞非接着部位にアレイ状の接着部位をパターンニングすることで、細胞接着をひとつのプレートの上で高度に制御するシステムを提案し、結果として、機能細胞をアレイ状に微小細胞スフェロイド化することに成功した。本学位論文では、高度な細胞接着制御に必要不可欠な、細胞非接着表面の構築から、細胞スフェロイドの創製までをまとめた。細胞種としては、再生医療において最も重要視される組織のひとつである軟骨組織中の軟骨細胞に焦点をしづり、作製したパターン化細胞接着制御基板を用い、軟骨細胞スフェロイドを作製し、高い分化機能を持つ細胞ソースの創製に貢献することを目的とした。本研究で確立されたスフェロイド培養技術は、人工的な ECM を用いたり、特定の因子などを添加したりすることなく、軟骨細胞自身による自発的なスフェロイド化およびその後の ECM 増加を伴う成長が起こっており、結果として生来の軟骨組織に近い環境を自身で作り出す、という画期的な培養方法であると考える。幹細胞を人工的に分化さ

せることにより目的の組織の細胞を得たり、人工的に添加された別種別組織由来の ECM や因子が多用される近年の再生医療分野において、一石を投じるツールとなり得ると考える。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 立石哲也

副査 教授 三田村好矩

副査 教授 山本克之

副査 助教授 大塚英典(東京理科大学大学院)

理学研究科)

## 学位論文題名

### 機能性細胞接着制御システムの創製

再生医療とは、失われた細胞や組織を再生して補う医療であり、臓器移植の際の深刻なドナー不足を解消する画期的な医療として、近年注目されている。ES細胞の発見以降、ES細胞の分化誘導などの生物学的なアプローチが再生医療においては脚光を浴びていたが、ここには、付随する拒絶反応、生命倫理的問題が存在する。これに対し、材料方面からのアプローチに関する研究も近年急速な進歩をとげている。たとえば、Vacanti兄弟とR.Langerによる「耳マウス」は強烈なインパクトと共に「Tissue Engineering」という言葉を世間に広く知らしめた。実際にヌードマウスの背中に形成された耳は耳として機能するものではないが、それでも、再生医療における材料の重要性は示された。このようにして再生医療において、材料分野と医学との融合は必要不可欠である。前述した耳マウスのように、三次元的に組織を構築するためには、材料は必要不可欠なものであることは言うまでもないが、臨床応用可能な組織培養を確立する以前に、高い分化機能を長期間保持できる細胞ソースとその培養方法の確立は重要な課題である。

本学位論文では、この課題をクリアする方法として、「細胞スフェロイド(塊)」という考え方着目している。細胞スフェロイドはその形態から、生来の組織に最も近い機能を保持するものとして注目されていたが、これまでの研究では、細胞スフェロイドはmmオーダーの大変大きなものや、大きさの不均一なものでしか達成されなかつた。これらの大変なスフェロイドは、微重力下での細胞培養や、丸底細胞非接着表面上での高密度培養によって達成されるものだが、スフェロイド内部まで酸素や栄養の透過が十分に行われないことから、内部細胞壊死の問題があり、実際に医療に応用することが難しかつた。

ここで、本学位論文では、均一な大きさを保つ、微小細胞スフェロイドアレイの創製を試みている。まずは、2種類の分子量のPoly(ethylene glycol)を埋め草的に表面に固定化することにより、細胞の接着を高度に抑制する(非特異的なタンパク質吸着の抑制)表面の構築に成功した。大きな分子量(Mw:5k)の

PEG を先に金表面上に固定化し、その後、より小さな分子量 ( $M_w:2k$ ) の PEG を固定化することで、大きな分子量のものだけでは自身の排除体積効果により実現できなかった高密度な PEG 表面を作製することができるということが SPR、QCM、接触角測定などの物理化学的評価より明らかとなった。このようにして作製された細胞非接着部位にアレイ状の接着部位をパターニングすることで、細胞接着をひとつのプレートの上で高度に制御するシステムを提案し、結果として、機能細胞をアレイ状に微小細胞スフェロイド化することに成功した。細胞種としては、再生医療において最も重要視される組織のひとつである軟骨組織中の軟骨細胞に焦点をしぼっている。これら細胞スフェロイドの長期培養、形態維持には、そのパターン間隔や細胞非接着部位の非特異的タンパク質吸着抑制能が大きく影響することが明らかとなった。また、作製したパターン化細胞接着制御基板を用い、作製された軟骨細胞スフェロイドは、高い分化機能を持つ細胞ソースの創製に貢献するものであることが、タンパク染色、電子顕微鏡観察、遺伝子解析などの生物学的機能評価により明らかとなった。なかでも、本学位論文で確立されたスフェロイド培養技術は、人工的な ECM を用いたり、特定の因子などを添加したりすることなく、軟骨細胞自身による自発的なスフェロイド化およびその後の ECM 増加を伴う成長が起こっており、結果として生來の軟骨組織に近い環境を自身で作り出す、という画期的な培養方法であることも同時に明らかとなった。

これを要するに、著者は、再生医療における新規の細胞ソースの創製につながる細胞培養方法についての新知見を得たものである。本研究で創出された技術は今後、物質透過性に優れた細胞の 3 次元足場材料技術、血管誘導の技術とも連携を密接に図り、栄養血管を誘導できる再生臓器（肝臓・すい臓）や cell therapy（細胞治療）への応用展開が大いに期待でき、再生医療の発展におい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（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。