

京都大学	博士 (工学)	氏名	Edtar Yuji Egawa
論文題目	Biomaterials for neural cells replacement therapy (神経細胞の移植治療に用いる生体材料)		
(論文内容の要旨)			
<p>This thesis describes the design and preparation of polymeric biomaterials for the application in the neural cell replacement therapy. The thesis consists of a general introduction, five chapters, and summary of obtained results.</p> <p>The General Introduction approaches the neural stem cells (NSCs) replacement therapy as one of the most promising technique for the treatment of neurodegenerative disorders. Although the poor survival of transplanted cells and low cell integration with the host tissue still limit the the results of the therapy. The feasibility to develop polymeric biomaterials as a scaffold for neural stem cells transplantation to overcome the aforementioned limitations are discussed and proposed.</p> <p>In Chapter 1, the preparation and study of a bi-functional His-tagged fusion protein that encompasses epidermal growth factor (EGF), a molecule known for inducing cell proliferation, combined with a collagen binding domain (CBD) derived from the von Willebrand Factor is reported. The designed fusion protein (EGF-CBD-His) could bind to the collagen substrate with its CBD end, presenting then the EGF to the NSCs. The designed system could maintain the initial cell seeding up to one week whereas only 20% of cell survived after 1week in the collagen without the EGF-CBD-His protein.</p> <p>In the Chapter 2, a second bi-functional His-tagged fusion protein is reported. In this chapter the neural cell adhesion molecule (NCAM) was combined with a CBD derived from the decorin protein. The NCAM-CBD-His protein was designed to bind to the collagen fibers via its CBD end providing then a specific anchorage site for the NSCs. Although collagen is suitable for NSCs culture, it lacks specific NSCs adhesion molecules for appropriate cell adhesion. In this chapter it is demonstrated that NCAM-CBD-His improves the NSCs affinity to the collagen substrate without interfering on cell phenotype and improving the cell survival at 46%.</p> <p>In the Chapter 3, another cell binding protein was fused with the CBD adopted in the Chapter 2. The neural cadherin (n-cadherin) is a calcium dependent cell adhesion protein. The n-cadherin-CBD-His protein also improved cell adhesion on collagen substrate, and improved neural stem cells differentiation to neuron cells. Cells cultured in the three-dimensional collagen hydrogels treated with n-cadherin-CBD-His present longer neurites and better cell network formation, which is closer to the native tissue environment.</p> <p>In the Chapter 4, a DNA hybridization system to label NSCs for MRI monitoring post-transplantation is reported. The DNA hybridization system via DNA modified superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles showed to be non-toxic for NSCs at concentrations up to 50 µg/mL. Labeled cells could form aggregates and presented similar phenotype as the non-labeled cells. Both labeled cell aggregates and single cells were detected by MRI in vitro as well in vivo. The DNA hybridization system for NSCs could</p>			

京都大学	博士 (工 学)	氏名	Edtar Yuji Egawa
<p>appropriately label cells in a specific and relatively fast two-step process.</p> <p>In the Chapter 5, human iPS cells derived dopamine releasing neurons were differentiated in a long-term free-floating culture. Cells were expanded in a 96-well plate for 5 days and encapsulated within calcium-alginate microbeads hydrogels. Calcium-alginate hydrogels gelation is reversible with chelating agents such as citrate buffer. Aggregates released from the calcium alginate shell demonstrated to release dopamine at same level as the cells cultured in adherent culture (positive control). Transplanted cells into the rat brain striatum for 1 week survived and were positive for dopamine, demonstrating the feasibility of the proposed method for long-term differentiation of dopamine releasing neurons in calcium-alginate microbeads.</p> <p>In summamry, the thesis describes the preparation of three injectable modified collagen hydrogels as a neural cells scaffold, a method to monitor cells post-transplantation, and a method to obtain in large scale mature neurons from human induced pluripotent stem cells.</p>			

氏 名

Edgar Yuji Egawa

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、神経細胞の移植による神経変性疾患の治療を目的に、それに用いる生体材料の設計に関する研究を5章にまとめたものである。得られた主な成果は次の通りである。

1. 細胞増殖活性を有する上皮増殖因子 (EGF) と von Willebrand factor 由来コラーゲン結合ドメイン (CBD) からなるキメラタンパク質 (EGF-CBD) を作製した。EGF-CBD をコラーゲンゲルと混合することで EGF がゲル内に提示され、ゲル中に埋入された神経幹細胞 (NSC) の生存率を向上させることができた。
2. 細胞間接着因子である neural cell adhesion molecule (NCAM) および decorin 由来 CBD からなるキメラタンパク質 (NCAM-CBD) を作製した。コラーゲンゲルと NSC との接着性を向上させることができ、NSC の分化特性を変えることなく生存率を向上できることが分かった。
3. 細胞間接着因子 N-cadherin と decorin 由来 CBD を複合したキメラタンパク質 (Ncad-CBD) を作製した。Ncad の導入によってコラーゲンゲルに対する NSC の接着性を向上させることができ、NSC は凝集塊を形成することなく均一に接着させることができた。
4. 磁気共鳴イメージング (MRI) を用いた移植 NSC の経過観察を可能とするため、超常磁性酸化鉄 (SPIO) ナノ粒子による NSC の標識を試みた。NSC 表面を単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体で修飾することで DNA を導入し、相補 DNA で修飾した SPIO を NSC 表面に固定化できた。この手法による細胞毒性や分化能の変化は見られず、また SPIO 修飾 NSC およびその凝集体は *in vitro* および *in vivo* において MRI 観察することができた。
5. iPS 細胞から分化誘導される神経細胞を浮遊培養によって大量確保する際に生じる細胞凝集体同士の接着による肥大化を防ぐため、アルギン酸ゲルマイクロビーズ中に iPS 細胞の凝集体を封入し分化誘導を試みた。ゲルマイクロビーズ内で分化誘導された細胞は十分量のドーパミンを産生した。また、ゲルを除去しラットへ移植後 1 週間においてもドーパミン産生細胞は生存していることが分かった。

以上、本論文では神経変性疾患の細胞移植治療に必要とされる様々な生体材料を提案した。本論文は、細胞移植治療の実現へ向けて新規かつ重要な知見を与えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。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。また、平成 27 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。