

氏 名	井 上 幸 子
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2948 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 高 分 子 化 学 専 攻
学位論文題目	Preparation of two- and three-dimensional substrates with different surface properties to culture human fat-derived stem cells (ヒト脂肪由来幹細胞の培養のための表面性状の異なる2次元, 3次元基材の作製)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 畑 泰 彦 教 授 岩 田 博 夫 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、細胞培養のための表面性状の異なる2次元および3次元基材を作製し、それらの基材の性質および培養方法などが、ヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、および分化挙動に与える影響について調べ、その研究成果をまとめたものであり、2部6章からなっている。

緒言では、これまで研究されてきた細胞培養用の基材と培養方法、脂肪由来幹細胞の特性、および脂肪由来幹細胞と基材の関係を調べる実験の必要性を概説し、研究目的とその背景、および本論文の概説が述べられている。

第1部では、表面性状の異なる2次元の基材を作製し、細胞の挙動に与える影響について調べている。

第1章では、ガラス、コラーゲンや塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)をコーティングした培養皿、または水濡れ性の異なる高分子フィルムなどの2次元基材上で細胞を培養した。高分子フィルム上では、水に対する接触角が60–80℃付近の基材上で細胞の増殖は最大となった。また、基材の種類が細胞の脂肪分化に影響を与えることを明らかにした。

第2章では、アルカンチオールの自己組織化単分子膜(SAM)により表面修飾したpoly(ethylene terephthalate)(PET)フィルム上で細胞を培養した。アミノ基およびカルボキシル基を有するSAM上では、細胞の伸展および増殖が促進され、またメチル基を有する2次元のSAM上では、脂肪分化が促進されることを示した。リン酸を調べた実験と阻害実験から、細胞内シグナルのextracellular signal-regulated kinase(ERK)のリン酸化が増殖促進および脂肪分化抑制に関与していることを明らかにした。

第3章では、培養基材へのコーティングあるいは培養液中へ添加という異なるbFGFの存在様式が細胞の脂肪分化に与える影響について調べた。その結果、ERKのリン酸化度とリン酸化時間が脂肪分化度に影響を与えることを明らかにした。

第4章では、置換SAM技術を利用して、PETフィルム表面にカルボキシル基の密度勾配を形成させた後、そのカルボキシル基を利用して細胞接着ペプチドArg-Gly-Asp(RGD)を化学固定した。2次元基材表面のRGD密度による接着細胞数には違いがなかったが、細胞の伸展率および生存率はRGD密度の増加とともに上昇することを明らかにした。

第2部では、表面性状の異なる3次元の基材を作製し、それらの基材の性質および培養方法などが細胞の挙動に与える影響について調べている。また2次元基材と3次元基材の比較を行った。

第5章では、空隙率および繊維径の異なる3次元基材としてPET不織布を用いて、静置、振とう、および旋回などの様々な方法で細胞を培養した。細胞の接着および増殖において、最適な繊維径と培養方法があることを明らかにした。振とうおよび旋回培養を利用することにより、3次元基材上で均一に細胞を接着および増殖させることができた。

第6章では、NaOH処理により導入したカルボキシル基を介して、RGDを化学固定したPET不織布を作製した。この3次元基材を用いて、静置または振とう方法で細胞を培養、2次元PETフィルム基材による培養結果と比較検討した。3次元に比べて、2次元基材への接着細胞数は増大したが、両者の基材上での細胞の増殖率は同じであった。RGD固定化によ

り3次元基材への細胞接着数が増大すること、Focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化が増大することがわかった。振とう培養により細胞増殖が促進することがわかった。

2次元基材の表面修飾は、ヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖および分化を促進する手段として有効であることがわかった。2次元と3次元基材間で細胞の接着、増殖を比較した場合、培養基材としての利点は細胞培養の条件により異なった。3次元基材上への細胞の接着には基材表面の修飾は有効であったが、細胞の増殖には表面性状よりも培養方法の方が大きく影響を与えることがわかった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、表面性状の異なる2次元、3次元基材を作製し、ヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、および分化などの挙動を調べることで、細胞を効率よく増殖および分化させるための培養基材についての基礎的研究をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

- 1) 2次元の水濡れ性の異なる基材は、脂肪由来幹細胞の増殖と脂肪分化に影響を与えることを示した。
- 2) アミノ基およびカルボキシル基を有する2次元の基材上では、細胞の伸展および増殖が促進され、増殖に細胞内シグナルのextracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が関与することを示した。また、メチル基を有する2次元の基材上では、脂肪分化が促進され、ERKのリン酸化が抑制されることを明らかにした。
- 3) 2次元の培養基材へのコーティングあるいは培養液中へ添加という異なる塩基性線維芽細胞増殖因子の存在様式が細胞の脂肪分化に影響を与えることを示した。ERKのリン酸化度とリン酸化時間が脂肪分化抑制に影響を与えていることを明らかにした。
- 4) 2次元基材表面の細胞接着ペプチドArg-Gly-Aspの密度の増加とともに、細胞の伸展率および生存率が上昇することを明らかにした。
- 5) 3次元基材としてポリエチレンテレフタレート不織布上では、細胞の接着および増殖において、最適な繊維径と培養方法があることを明らかにした。
- 6) 3次元に比べて、2次元基材への接着細胞数は増大したが、両者の基材上での細胞の増殖率は同じであった。RGD固定化により3次元基材への細胞接着数が増大することが増大することを示した。振とう培養により細胞増殖が促進することを明らかにした。

以上、本論文は脂肪前駆細胞を増殖および分化させるための基材の研究において、重要な現象とそのメカニズムを得たものであり、学術上、実際に寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学術論文として価値があるものと認める。また、平成20年2月22日、論文内容とそれに関連した事項についての試問を行った結果、合格と認めた。