

京都大学	博士 (工 学)	氏名	Ian Torao Hoffecker
論文題目	Decoupling Interdependent Cytoskeletal Processes to Control Cell Adhesion Dynamics (互いに密接に関連する細胞内外の機構の個別操作による細胞接着挙動の制御)		
(論文内容の要旨)			
<p>This thesis addresses the issue of controlling cell behavior through its cytoskeleton. One might wish to control one of several behaviors such as migration, adhesion, or traction force alone, and it may be desired to control that particular variable without affecting the others. Three different approaches for achieving selective control of a particular cell behavior: cytoskeletal response-constraining patterned substrates to separate traction forces from rigidity sensing, membrane chemical modification with ssDNA-PEG-lipids to separate integrin-based adhesion from physical attachment to substrates, and pharmacological inhibitors for eliciting changes in relative adhesion between two different cell types. The thesis is divided into 6 chapters, the first of which is a general introduction.</p> <p>The first chapter provides an introduction to the basic components of the cytoskeleton, their interactions, and their role in higher order cell mechanical behavior. Also discussed are challenges inherent in attempting to study a single aspect of the cytoskeleton when few variables can be modified independently of one another. Finally, the various tools and techniques that have been developed for controlling and studying cytoskeletal processes by isolating and selectively modulating individual components are discussed.</p> <p>In the second chapter, an elastic gel substrate cell traction force examination is designed with discrete rigid islands, thus separating the behaviors of cells exerting traction forces positively reinforced by the sensing of cell-scale resistance from a cell that could hypothetically respond to the intrinsic micro-scale rigidity of the material. The findings support the notion that cells sense rigidity by exerting cell-scale forces and not by sensing intrinsic rigidity.</p> <p>In the third chapter, mesenchymal stem cell (MSC)-islet-cell multicellular spheroids are formed and collective sorting into minimally contacting spheroidal compartments of MSCs and islet cells was observed. When the spheroids were formed in the presence of ROCK inhibitor, a drug that disrupts cytoskeletal force generation while simultaneously stabilizing cadherins, the spheroids sorted into core-shell shapes.</p> <p>In the fourth chapter, glass substrates are patterned with ssDNA and then patterned with ssDNA-bearing cells using an inkjet printer. The glass substrates permit microscopic observation which showed that adherent-type cells migrated away from points of DNA attachment by establishing integrin connections with adsorbed proteins.</p>			

京都大学	博士 (工 学)	氏名	Ian Torao Hoffecker
<p data-bbox="172 320 1422 439">In the fifth chapter, restriction enzymes are used to sever the connections between substrates and cellular aggregates tethered by ssDNA-PEG-lipids. Both sequence specific restriction enzymes and nonspecific nucleases were used.</p> <p data-bbox="172 495 1422 651">In the final chapter, the Hertz contact model is used to estimate the strength of ssDNA-PEG-lipid adhesion between cells. The estimation works by measuring the deformation of cell membranes when adhesive contacts are formed, and by knowing the elastic properties of cells, the adhesion energy can be inferred.</p> <p data-bbox="172 707 1422 864">In summary, the thesis explores three types of cytoskeletal manipulation which can be used to constrain the behavior of cells in different contexts. By separating normally coupled cytoskeletal variables such as adhesion vs migration or traction force vs rigidity sensing, a variety of unique forms of cellular behavior can be controlled.</p>			

氏 名	Ian Torao Hoffecker
-----	---------------------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、互いに密接に関連する細胞内外の機構を個別に操作することで細胞接着挙動を制御することを目指した研究を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. 弾性率可変のゲル上に固い微細な島状の細胞接着部位が分散した基材を作製し、基材の力学特性に対する細胞の応答が細胞接着部位の局所的な硬さではなく、ゲルにより細胞全体にわたって生じる張力によるものであることを明らかにした。
2. 間葉系幹細胞 (MSC) と膝島細胞からなる細胞凝集体を形成した後の細胞配置を検討し、異種細胞間の接触が極小となるよう上記2種の細胞が分離した配置をとることを見いだした。また、ROCK 阻害剤の添加によって MSC-膝島細胞間のカドヘリンを介する相互作用が安定化され、MSC をコアとするコア-シェル構造をとることを示した。
3. ガラス基板上に形成された単鎖 DNA (ssDNA) のパターンへ、相補配列を有する単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体 (ssDNA-PEG-lipid) で修飾した細胞が接着した後の細胞挙動を調べた。血清含有培地中で培養を続けると、接着系細胞では表面上に吸着したタンパク質とインテグリンとの相互作用により新たな細胞-基材間接着が生じ、さらに初期接着箇所から細胞が移動することが分かった。
4. 制限酵素を用いて DNA を介した細胞-基材間および細胞-細胞間接着の切断を試みた。制限酵素およびヌクレアーゼを用いることで、DNA 配列特異的な切断に基づく細胞の選択的脱離、および全 DNA の分解による接着細胞の除去を実現した。
5. ssDNA-PEG-lipid による細胞間接着力の推定を目的とし、Hertz 接触モデルを用いた解析を行った。細胞の力学特性を仮定の下、細胞間接着による細胞膜の変形を計測することで、細胞間の接着エネルギーを推定することができた。

以上、本論文では細胞内外の機構の人工的操作による細胞挙動の制御について3種類の方法を提案した。本論文は、人工材料による細胞挙動の制御について新規かつ重要な基礎的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26年10月23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。