

氏 名	あり ま ゆう すけ 有 馬 祐 介
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2761 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 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	Interactions of Proteins and Cells with Well-defined Model Surfaces (性状が明確なモデル表面とタンパク質および細胞との相互作用に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 岩 田 博 夫 教 授 田 畑 泰 彦 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生体材料と生体との相互作用について理解を深めることを目的とし、金薄膜上でのアルカンチオール(self-organized monolayer, SAM)形成を利用して作製された材料モデル表面とタンパク質ならびに細胞との相互作用に関する研究を行ったものであり、序論、本編5章、および概要から成っている。

序論では、生体材料開発のための材料表面と生体との相互作用を理解することの重要性、ならびにアルカンチオールのSAMを用いた生体材料研究の意義について論じている。新規材料を開発するためには、材料—タンパク質—細胞という、逐次反応を理解し制御することが重要であり、その基礎知見を得るためには表面性状の明確なアルカンチオールのSAMを材料モデル表面として利用することが有効であることを述べている。

本編第1章および第2章では、種々の性質を有するSAM表面と血清タンパク質との相互作用に関する研究結果をまとめている。

第1章では、化学的性質が異なるSAM表面へのタンパク吸着の多点同時測定法の確立を目的としている。SAMの光パターンニングを利用して、末端官能基の異なるアルカンチオールのSAMを1枚の基板に配列形成させたパターン化表面を作製した。また、SAM表面へのタンパク吸着挙動を解析する手法として広く利用されている表面プラズモン共鳴(SPR)法を改良したSPRイメージング装置を作製し、SAM表面へのタンパク吸着挙動を2次元画像として捉えた。パターン化表面とSPRイメージング装置を併用することで、25種類の異なる表面へのタンパク吸着挙動の同時・リアルタイム測定を可能とした。

第2章では、ポリエチレングリコール(PEG)修飾した表面への補体活性化について検討している。第1章では、PEG修飾した表面ではBSAの吸着が抑制されることを示したが、本章では、一連のタンパク質群からなる免疫系である補体系に注目し、PEG修飾表面における補体系の活性化について検討している。その結果、末端にヒドロキシル基を有するPEGで修飾された表面では補体系が活性化されることを示した。また、末端がメトキシ基のPEGで修飾した表面では、修飾直後には補体活性化は見られないものの、長期保存中に生成する酸化PEGによって補体活性化が惹起されることを見出した。

本編第3章から第5章では、タンパク吸着層を介したSAM表面への細胞応答についての研究結果をまとめている。

第3章では、SAMの表面官能基と細胞接着の関係について検討している。血清含有培地からのタンパク吸着および細胞接着挙動を、SPRおよび全反射蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察した。SAM表面への細胞接着挙動は、表面の官能基によって大きく異なることを示した。また、カルボキシル基およびアミノ基を有する表面では同様の細胞接着挙動が見られたことから、表面と細胞との静電相互作用は細胞接着に影響しないことを示した。

第4章では、表面の濡れ性および官能基がタンパク質および細胞接着に及ぼす影響について検討している。2種類のアルカンチオールを混合し、濡れ性を系統的に変化させた混合SAM表面をモデル表面として利用した。細胞接着は、水接触角約40-60°で極大となったが、表面官能基および細胞種によっても影響されることを見出した。さらに、細胞の接着する表

面では、初期に吸着するアルブミンと細胞接着性タンパク質との交換吸着が重要であることを見出した。

第5章では、SAM表面上のタンパク質が神経幹細胞（NSC）の接着のみならず、その後の様々な細胞機能にも大きな影響を与えることを示すと同時に、各種タンパク質上での細胞分化に関する分析を通じて、新たな組織工学用材料の開発にとって重要な基礎データの取得を目的とした。第1章と同様のパターン化SAMを用いて多種類の細胞外マトリックス分子および細胞増殖因子を配列固定化したアレイを作製し、このアレイ表面上で培養したNSCの接着、増殖、分化を分析した。NSCの増殖および分化状態は固定化する細胞外マトリックスと増殖因子の組み合わせによって変化し、両者の協同作用がNSCの運命決定に大きく影響することを示した。

概要では、本編5章について得られた成果を要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、金薄膜上でのアルカンチオール自己組織化単分子膜（SAM）形成を利用して作製された材料モデル表面とタンパク質ならびに細胞との相互作用に関する研究を5章にまとめたものである。得られた主な成果は次のとおりである。

- 1) 種々の官能基を有するパターン化SAMおよび表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング装置を用い、各種の化学的性質が異なるSAM表面へのタンパク吸着の多点同時解析が可能な測定法を確立した。
- 2) ポリエチレングリコール（PEG）修飾表面をヒト血清に暴露したときの補体系の活性化について検討し、PEG鎖末端に存在するヒドロキシル基および長期保存中のPEG鎖の酸化物が補体活性化を惹起することを見出した。
- 3) 種々の官能基を有するSAM表面へのタンパク吸着および細胞接着をSPRおよび全反射蛍光顕微鏡を用いて経時的に追跡した。その結果、SAMの表面官能基によって細胞接着挙動が大きく異なること、表面と細胞との静電相互作用は初期細胞接着には影響しないことを示した。
- 4) 混合SAMを用いて表面の濡れ性および表面官能基と細胞接着の関係について検討し、細胞接着は水接触角 $40-60^{\circ}$ を示す表面で極大を示すこと、表面官能基の種類・組成および細胞種にも影響されることを示した。また、初期に吸着したアルブミンと細胞接着性タンパク質の交換が細胞接着に大きく寄与することを見出した。
- 5) パターン化SAMを用いて多種類の細胞外マトリックス分子および細胞増殖因子を配列固定化したアレイを作製し、このアレイ表面上で培養した神経幹細胞（NSC）の接着、増殖、分化を分析した。SAM表面上のタンパク質がNSCの接着のみならず、その後の増殖や分化にも大きな影響を与えることを示した。

本論文は、新規生体材料を開発する上で重要な、材料—タンパク質—細胞間の相互作用に関する基礎的知見を与え、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）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成19年1月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。