

細胞-基材接着界面における高分子の役割に着目した 細胞接着制御とその応用

政池, 彩雅

<https://hdl.handle.net/2324/6787564>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 政池 彩雅

論 文 名 : 細胞-基材接着界面における高分子の役割に着目した
細胞接着制御とその応用

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

細胞の接着状態は、生存率や増殖、運動性、分化など、様々な細胞機能と密接に関わっている。そのため、目的の細胞機能を実現するバイオマテリアルの設計において細胞接着制御は重要な課題のひとつとなる。材料表面への細胞接着は細胞接着性リガンドとインテグリンとの結合に始まり、インテグリンのクラスター化と、タリンやビンキュリン、アクチンなどのタンパク質の自己組織化が進行する。近年、細胞外環境の変形特性が接着斑の活性や結合安定性に対して重要な役割を担うことが明らかになってきた。細胞が足場の変形特性を感知する機構はアクチン-インテグリン間をつなぐクラッチ分子と接着足場との力感受性のバランスによって説明がなされ、水溶性高分子層を用いたモデル系で実証されている。一方、実用化を想定した場合、水を含まない固体表面の方が長期的な保管も可能で汎用性も高いのだが、疎水性凝縮表面の力学特性が細胞接着に与える影響については未だ明確になっていない。

また、細胞膜上の糖鎖の立体構造も材料表面とインテグリン間の結合形成に大きく関与する。細胞膜を覆う糖衣は数十～数百nmの厚みがあるのに対してインテグリンは直径 20 nm 程度しかなく、インテグリンが基材表面に結合するには嵩高くて厚みのある糖鎖をかき分け、糖衣の外まで表出する必要がある。このとき糖鎖は圧縮変形を受けて高密度化する。以上のことから糖衣の厚さや糖鎖の密度情報は細胞接着状態を知る手がかりとなり得るが、糖衣の厚さは通常の顕微鏡の回折限界を超えており、糖鎖の不均一性や構造安定性の乏しさから正確な標識は難しく、これらの直接観察は困難である。糖鎖は負電荷に富むため、糖鎖の圧縮変形・高密度化領域は多くのプロトンを引き寄せるはずである。したがって、細胞接着界面のpHを可視化できれば糖衣の密度分布がわかるはずである。

このように細胞-基材接着界面に存在する高分子層は細胞接着と大きく関与していることから、本研究では接着界面の高分子鎖が細胞接着に及ぼす役割の解明とその応用を目的とした。

第2章では細胞培養材料側の高分子層が細胞の接着性に及ぼす力学的な効果について調査した。疎水性凝縮界面のモデル系として温度応答性高分子PNIPAAmのグラフト表面を採用した。

PNIPAAmは分子内に親水基と疎水基を併せ持ち、37°Cの溶液中で疎水性凝縮状態であっても適度な変形性を示す。表面開始グラフト重合法にて重合度が系統的に異なるPNIPAAmグラフト基材を作製し、表面の化学的性質と物理的性質について評価した。XPS測定や接触角測定、フィブロネクチンの表面吸着量評価の結果は、重合度による化学的性質の差を示さなかった。一方で、PNIPAAmのグラフト重合度が大きいほど細胞の接着性は低下し、細胞は表面の化学特性以外の環境要因を感知していることがわかった。表面修飾PNIPAAmの長さは高分子鎖の可動域を決定する。LFM測定により、PNIPAAmグラフト表面は細胞牽引力程度の負荷で引伸変形を生じることを明らかにした。高分子鎖の水平変形量は重合度と相関し、細胞接着が抑制される重合度では特に長距離の高分子鎖の引き伸ばしが確認された。

第3章では細胞-基材接着界面におけるpHの可視化を試みた。pH応答性色素であるFITCを修飾した基材上での生細胞の観察において接着界面のほぼ全体でFITCの輝度が低下し、その領域内部では濃淡の分布が見られた。伸長方向の仮足前方で酸性化を意味する強い消光が確認された。これについて、細胞は進行方向の前方で活発に接着斑を形成することから妥当であり、細胞接着界面のpH可視化に成功したといえる。生細胞の観察ではイオンチャネルなどを介したH⁺変動も生じるはずであり、特に接着斑近傍ではNHE1の活性化も知られるため、これらの効果も含んでいる。一方、細胞を固定するとNHE1の機能が停止し糖衣の効果のみを取り出せる。固定後の細胞観察では、生細胞での観察時よりもFITCの輝度低下領域が縮小しており、おおよそFA近傍のみに限定された。また、正常細胞とがん細胞とで比較したところ、正常細胞より嵩高い糖鎖を有するがん細胞の方がより強い酸性化を示した。つまりFITC修飾基材上で細胞固定を行うと、インテグリン-基質結合形成に伴う糖鎖の密度変化がpH応答として検出可能であり、その検出感度は細胞膜上の糖衣の厚さに依存するようである。

第4章では細胞接着制御可能な培養基材の応用展開について検討した。PNIPAAm修飾基材を用いて温度刺激によりタンパク質吸着量を切り替え、細胞接着強度を変化させた。MSCは長期間に渡って同じ培養環境下におかれると幹細胞性を失う。そこで定期的に細胞接着強度を切り替える培養法にて幹細胞性の保持を試みた。6時間毎に接着強度を切り替える培養法は幹細胞の運命決定に関連するYAPの細胞内局在の変化を達成した。幹細胞性を失うとYAPの細胞内局在は不可逆に固定されることから、この結果は本手法がMSCの幹細胞性保持に有効である可能性を示唆する。さらに、この細胞接着強度を繰り返し切り替える培養法は細胞増殖を活性化させることを確認した。

最後に、第5章で本論文の内容を総括した。

〔作成要領〕

1. 用紙はA4判上質紙を使用すること。
2. 原則として、文字サイズ10.5ポイントとする。
3. 左右2センチ，上下2.5センチ程度をあげ，ページ数は記入しないこと。
4. 要旨は2,000字程度にまとめること。
(英文の場合は，2ページ以内にまとめること。)
5. 図表・図式等は随意に使用のこと。
6. ワードプロ浄書すること(手書きする場合は楷書体)。
この様式で提出された書類は，「九州大学博士学位論文内容の要旨及び審査結果の要旨」
の原稿として写真印刷するので，鮮明な原稿をクリップ止めで提出すること。