

細胞シートを肝細胞シートに重層化することの有効性について三次元構造制御の観点から詳細に議論し、肝臓の組織工学的作製についてのきわめて新しい基盤を作ることに成功した。これにより本論文は学位論文として十分な内容であると判断された。

氏名	アリ 有	サカ 坂	ヨシ 慶	ノリ 紀
学位の種類	博士（医学）			
学位授与の番号	甲第 558 号			
学位授与の日付	平成 25 年 3 月 15 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（医学研究科専攻，博士課程修了者）			
学位論文題目	Switching of cell growth/detachment on heparin-functionalized thermoresponsive surface for rapid cell sheet fabrication and manipulation (迅速な細胞シート作製を目指したヘパリン機能化温度応答性表面上での細胞増殖/細胞剥離の制御)			
主論文公表誌	Biomaterials 投稿中			
論文審査委員	(主査) 教授 岡野 光夫 (副査) 教授 江崎 太一, 萩原 誠久			

論文内容の要旨

〔目的〕

本研究では、迅速な細胞シートの作製を達成するために、細胞増殖および脱着を可能とする新規温度応答性細胞培養基材の表面設計を行った。具体的には、ヘパリンが塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と複合体を形成することによって bFGF 活性が維持されることに着目し、bFGF をアフィニティー結合により表面導入するためのヘパリン固定化温度応答性表面を開発した。この表面を用いて、ヘパリンの表面固定化量と bFGF の結合量が細胞シート培養時間に与える影響を検討した。さらに、固定化ヘパリンと bFGF の表面組成を最適化することにより、細胞シート作製の加速化と、培養温度を低下させたときの細胞シート脱着を同時に達成するための検討を行った。

〔方法〕

Poly (N-isopropylacrylamide-co-2-carboxyisopropylacrylamide) 修飾培養表面上にヘパリンを共有結合的に固定化し、ヘパリンとのアフィニティー結合により bFGF を表面に導入した。さらに、マウス線維芽細胞 (NIH/3T3) を用いて、温度応答性培養表面上での細胞増殖能および細胞脱着能の評価を行った。

〔結果・考察〕

培養温度 37°C の bFGF 結合ヘパリン固定化温度応答性表面上では、培地中への bFGF 添加もしくは物理吸着の温度応答性培養表面と比較して、細胞数は 3 日間の培養で 2~3 倍程度、細胞シート作製時間は 2 日間短縮され 3 日であった。物理吸着させた bFGF は、変性等によって活性低下が引き起こされる一方、アフィニティー結合した bFGF は活性が維持され、その結果細胞増殖が加速したためと考える。さらに、培養温度を 20°C に低下すると、細胞シートの剥離とともに、bFGF が培養表面から脱着することがわかった。温度応答性高分子鎖の膨潤とそれにとまうヘパリン分子の運動性の増加によって、bFGF/表面固定ヘパリン間のアフィニティー結合が減少したためと考えられる。以上の結果より、温度応答性高分子鎖の膨潤/収縮変化を利用することで、bFGF/表面固定ヘパリン間のアフィニティー結合力を制御できることをあきらかにした。

〔結論〕

アフィニティー結合を利用した bFGF の表面導入による細胞増殖の効果的な促進および 20°C への低温処理によ

る細胞シートの脱着の両方を可能とするヘパリン固定化温度応答性培養表面の開発を行った。この新規温度応答性表面を用いた培養システムは、細胞シート作製の加速化手法として有用であり、迅速な細胞シート治療を達成するための応用が期待される。

論文審査の要旨

申請者は、温度応答性培養表面上にヘパリンを効果的に導入した新しい表面を作製した。これにより、ヘパリンと塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) との強い相互作用を利用して表面に有効な bFGF の固定化を行った。この表面上で、細胞増殖の促進に加え、温度低下によって速やかに細胞を脱着させることを表面の活性点の構造制御を動的構造観点から世界に先駆けて成功させた。すなわち、線維芽細胞シートの作製時間を著しく短縮し、しかも表面から剝離を行う手法を成功させた。この表面構造の分子設計によって、細胞増殖の加速と 37℃ から 20℃ に温度を低下することで機能を持った剝離の実現、表面と細胞シートの両方の構造および機能を詳細に解析した。これにより細胞シートの迅速な作製を可能にする表面構造特性を明確にし、細胞シート工学の基盤を確立した。以上により、申請者の主論文は学位論文に相応しいものと判断された。

54

氏名	渡 辺 頼 勝
学位の種類	博士 (医学)
学位授与の番号	甲第 559 号
学位授与の日付	平成 25 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻, 博士課程修了者)
学位論文題目	Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect (脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いたラット顔面神経再生)
主論文公表誌	Tissue Engineering 投稿予定
論文審査委員	(主査) 教授 岡野 光夫 (副査) 教授 櫻井 裕之, 松岡 雅人

論文内容の要旨

〔目的〕

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (adipose-derived mesenchymal stem cell : ASC) は、脂肪、骨、軟骨、筋肉、さらには神経への分化・誘導が可能であり、現実的に採取が大量かつ簡便なため、临床上利用可能な細胞ソースである。本研究では、未分化な undifferentiated ASC (uASC) から末梢神経再生に不可欠な Schwann 細胞 (differentiated ASC : dASC) を分化誘導させ、uASC と dASC の末梢神経再生能力を in vitro, in vivo 実験にて検証した。

〔実験方法〕

〔uASC の継代培養と多系統分化能の確認〕 生後 8 週ラットの皮下脂肪組織から uASC を選択培養し、第 2, 5 継代目で脂肪、骨、軟骨分化誘導培地を用いて 3 週間培養を行った。各組織に分化誘導された細胞は、Oil red O (脂肪細胞), alizarin red (骨芽細胞), toluidine blue (軟骨細胞) でそれぞれ染色した。〔dASC への分化誘導〕 uASC の第 2, 5 継代目で、Schwann 細胞 (SC) 系統へ約 1 週間かけて分化誘導を行った。〔dASC および uASC の免疫細胞染色〕 それぞれの培養細胞を、間葉系幹細胞マーカー Stro-1, 神経前駆細胞マーカー Nestin, SC マーカー S100, NGF p-75 receptor 抗体で蛍光染色した。〔Dorsal root ganglia との in vitro 共培養による neurite outgrowth 分析〕 uASC および dASC のそれぞれの神経再生促進能を測定するために、脊髄後根神経節にある一