

論文の内容の要旨

論文題目 Development of a Fluorous Gel as Cell Culture Substrate
(細胞培養基質としてのフルオラスゲルの開発)

氏 名 宮島 浩樹

再生医療の発展から、細胞を立体的に培養し、複雑な組織を構築する技術が研究されている。しかしながら、組織構築のために細胞を高度に積層、凝集させると、その凝集体内部における酸素不足のために細胞死が生じてしまう。よって、細胞への酸素供給を可能にできる材料を開発できれば、将来の再生医療の発展にも寄与できるような新しい細胞培養基質として期待できる。そこで、フルオラス溶媒の高い酸素溶解性に着目した。フルオラス溶媒は、分子間のファンデルワールス力が小さいため、溶媒中への高い酸素溶解性を有することが知られており、水と比較して約15-20倍の酸素を溶解することが報告されている。本論文では、フルオラス溶媒由来のゲル(フルオラスゲル)を作製し、細胞培養における酸素供給源となるような材料の開発に取り組んだ。細胞培養への応用を目的としたフルオラスゲルは、これまでにない細胞培養基質として期待できる。

第一章では、細胞培養のためのゲルに関わる研究や組織培養における課題を研究背景として、フルオラス溶媒の酸素供給源としての応用について記述し、本論文で目的とした細胞培養基質となるようなフルオラスゲルの開発の動機について論じた。

第二章では、細胞培養での応用の可能性が報告されているフルオラス溶媒のドデカフルオロ-1-ヘプタノール(DFH)を溶媒としたゲル作製を目指した。DFHはフルオラスアルコール類であるため、ゲル化剤として2,3-*n*-ジデシルオキシアントラセン(DDOA)を選択し、合成を行った。DDOAゲル化剤はメタノールなどのアルコール類のゲル化剤としてすでに報告されており、芳香環部位の π - π スタッキング相互作用および長鎖アルキル部位のファンデルワールス力によって、繊維を形成し、溶媒を閉じ込めてゲルが生じる。合成したDDOAを濃度2.0-4.0 mMになるようにDFHへ添加し、加熱、溶解した。その後、常温で約10分間放冷することで、目的のDFHを溶媒としたフルオラスゲル(DFHゲル)を作製した。DFHゲルは、温度応答性を示し、加熱することでゾル化し、冷却することで

ゲル化する。ゲル化温度やゾル化温度をコントロールできれば、目的の温度において、ゲルを用いた細胞の内包や放出が期待できる。DDOAゲル化剤を用いたゲルでは、ゲル化剤濃度を制御することで、容易にそのゾル-ゲル転移の温度制御が可能であることが報告されている。よって、本論文におけるDFHゲルについて、様々な濃度のDDOAを用いてゾル化温度を測定した。その結果、DDOAを低濃度に調製することで、ゾル化温度を43 °Cまで低下させることが可能であった。さらにゲル化剤の濃度を低下させると、ゲルの流動性が増大する結果となった。目的とするゲルは、細胞培養基質としての応用を目指しているため、ゲルの溶解は37 °C近傍が望ましいと考え、ゾル化温度をさらに低下させる試みを検討した。

そこで、DDOAよりもアルキル鎖の短い2,3-ジメトキシアントラセン(DMOA)をDDOAゲル化剤と混合したゲルを作製した。DMOAは長鎖アルキル基を有していないため、ゲル化剤として機能はしない。しかし、アントラセン骨格を有していることから、 π - π スタッキング相互作用によってDDOAと相互作用することで、DDOAゲル化剤の安定的な繊維の形成が妨げられ、その結果、より低温でのゾル化が可能となることを期待した。DDOAとDMOAを混合し、その総量を4.0 mMに統一して、その中でDDOAおよびDMOAの各混合量を変えたゲルを作製し、それらのゲルについてのゾル化温度の測定を行った。その結果、DMOAの割合を増大すると、ゾル化温度の低下が確認でき、その混合比によって27-40 °Cでのゾル化が可能であった。したがって、DDOAゲル化剤のみでは43 °Cまでしか低下できなかったゾル化温度が、DMOAの混合によって、さらに低温で微細にゾル化温度をコントロールすることに成功した。

第三章では、作製したDFHゲルが、細胞培養において酸素供給源として機能できるかどうかを評価した。細胞培養のための培地とDFHゲルとの界面において、マウスメラノーマB16細胞を培養し、DFHゲル存在下および非存在下(培地のみ)での培地中の溶存酸素量の変化を測定した。その結果、培養96時間後、フルオラスゲル非存在下(培地のみ)の系では、溶存酸素量の大きな低下が確認された。一方、フルオラスゲル存在下では、溶存酸素量の大きな低下は見られなかった。これらの結果から、細胞によって消費される酸素をフルオラスゲルが補い、溶存酸素量の著しい低下を抑制したことが示唆された。以上より、フルオラスゲルは、細胞が消費する酸素を供給できる材料であることが明らかとなった。

また、本論文におけるフルオラスゲルは細胞培養のための材料としての応用を目指しているため、正常細胞を培養することで材料の毒性を評価した。作製したゲルの構成成分について99 wt%以上がDFH(溶媒)であることから、毒性評価の第一段階としてDFH(溶媒)を用いた細胞培養を行った。用いた細胞種は、株化細胞であるNIH3T3細胞を選択した。加えて、マウス胎児から採取した初代神経細胞の培養も行った。各細胞種について、培地中で24時間の前培養をした後、培地を除去し、DFHに置換して培養を行った。その

結果、DFHを用いた培養の結果として、両細胞種においてDFHに置換24時間後の生細胞数の顕著な低下が観察された。特に、神経細胞の場合においては、生細胞数の低下が顕著であった。

そこで、既往の細胞培養の報告例からフルオラス溶媒のパーフルオロデカリン(PFD)を選択し、同様の培養実験を行った。PFDを用いた結果、24時間後でも生細胞数の大きな減少は見られなかった。DFHはフルオラスアルコールであり、疎水性部位(フルオラス鎖)と親水性部位(ヒドロキシ基)を有した両親媒性化合物であるため、細胞膜(脂質二分子膜)へ作用し、顕著な毒性につながった可能性が示唆された。その一方で、PFDはフルオロアルキル鎖のみから構成される環状の化学構造を有し、無極性である。よって、細胞膜への影響が小さいため、低い細胞毒性につながったと考えられる。以上の細胞培養の結果から、フルオラス溶媒のPFD中では、初代神経細胞の培養も可能であることが明らかとなった。

第四章では、第三章の細胞培養の結果を受け、低毒性なフルオラスゲルとして、PFDを溶媒としたフルオラスゲル(PFDゲル)の作製に取り組んだ。目的のゲル作製のため、第二章で用いたDDOAゲル化剤をPFDに添加し、ゲル作製を試みた。しかしながら、PFDに対するDDOAの溶解度が極めて低く、目的のPFDゲルを作製できなかった。これまで用いてきたフルオラス溶媒 (DFH)はアルコール部位を有していたため、ゲル化剤DDOAのエーテル部位と相互作用することでDFHに溶解でき、その後ゲル化が生じたと考えられる。しかし、PFDはフルオロアルキル鎖のみからなるフルオラス溶媒であるため、DDOAはPFDとの親和性に乏しく、溶解できないことが課題と考えた。そこで、PFDへの溶解性の向上のための戦略として、フルオラス溶媒と親和性を示す部位をDDOAに導入する目的で、DDOAのアルキル鎖の末端にフルオロアルキル鎖を導入した新規化合物を合成した。ゲル化剤の設計戦略として、 π - π スタッキング相互作用のためのアントラセン環、ファンデルワールス力のためのアルキル鎖、PFD(溶媒)との相互作用を可能にする部位としてのフルオロアルキル鎖を考慮した。その結果、長鎖アルキル部位(デシル基)にフルオロアルキル鎖(パーフルオロブチル基またはパーフルオロヘキシル基)を導入した化合物は、加熱することでPFDへ溶解し、常温で放冷後にPFDのゲル化が確認できた。よって、フルオロアルキル鎖を有したアントラセンゲル化剤を新規合成し、フルオラス溶媒であるPFDのゲル作製に成功した。

第五章では、第四章で作製したPFDゲルを細胞培養に応用した。PFDゲルの毒性評価のため、第三章で用いたNIH3T3細胞についてPFDゲルを用いた細胞培養を行った。PFDゲルを用いた培養24時間後の結果において、PFDゲルの顕著な細胞毒性は確認されなかった。したがって、PFDゲルは、低毒性なフルオラスゲルであることが示唆された。

さらに、PFDゲルを用いた細胞塊(スフェロイド)の培養も行った。NIH3T3細胞からスフェロイドを調製し、PFDゲルと培地の界面で培養を行った。その結果からもPFDゲルの顕著な毒性は見られなかった。よって、細胞および細胞塊の培養において、低毒性を示すフルオラスゲルの作製に成功した。

第六章では、研究の総括および本研究の発展の可能性、工学的な寄与について述べた。本論文では、細胞への酸素供給を可能にできるような新しい細胞培養基質として、フルオラスゲルの開発を行った。DFHゲルでは、ゲル化剤として機能しない化合物の添加によってゲルの温度応答性の制御を達成した。また、細胞培養の過程におけるゲルの酸素供給能も明らかとなった。さらに、低毒性なフルオラス溶媒であるPFDをゲル化することに成功し、細胞や細胞塊の培養での応用が可能であった。フルオラスゲルは、従来の細胞培養のためのゲルとは異なる酸素供給可能な細胞培養基質であり、将来の細胞工学や再生医療での応用につながる技術として期待できる。