

審査の結果の要旨

氏名 山平 真也

本論文は接着性・非接着性細胞の一細胞研究に有用な研究ツールの創出のために、細胞の自発的な接着性を必要とせずに一細胞の配置・操作を可能とする PEG 脂質を骨格としたスマートマテリアルの開発を行った研究であり、全五章から構成されている。

第一章は序論であり、一細胞解析・操作の必要性、一細胞解析のための細胞の固定化方法や固定化材料に関する既往の研究、知見について概観し、本研究の背景と意義を述べ、本研究の目的と本論文の構成を示している。

第二章では、接着性・非接着性のいずれの細胞にも適用可能な一細胞アレイ作製の基板表面修飾剤として、光分解性リンカーを含む PEG 脂質を骨格としたスマートマテリアルの開発を行っている。すなわち、細胞膜と相互作用するオレイル基、光分解性メトキシベンジルリンカー、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖、活性カルボン酸が直列につながった光分解性 PEG 脂質を設計し、合成法を確立している。高解像度の光照射パターンを実現するために、フォトマスクを用いたコンタクト露光法による一細胞アレイ作製技術の開発を行っている。その際、光分解性 PEG 脂質を修飾するガラス基板表面の種類 (BSA 吸着ガラス表面、アミノ化ガラス表面、コラーゲンコートガラス表面)、基板表面修飾時の光分解性 PEG 脂質濃度、基板上への細胞播種から洗浄操作までのインキュベーション時間、非照射領域のスポットサイズなどのパラメータの影響を検討している。その結果、(1) コンタクト露光法には物理的接触により剥離し易い BSA 吸着ガラス表面は適さないこと、(2) 接着性細胞の細胞アレイには、接着受容体と接着シグナル分子との相互作用が可能なコラーゲンコートガラス表面が適すること、(3) 接着性細胞の光照射領域 PEG/コラーゲン表面への接着を抑制し、光未照射領域 PEG 脂質/コラーゲンコート表面へ選択的に固定化するためには、光分解性 PEG 脂質濃度 $10\mu\text{M}$ 以上、細胞播種後のインキュベーション時間 10 分程度が好ましいこと、(4) 非照射領域のスポットサイズを細胞平均径の約 $\pm 20\%$ とすることにより、接着性・非接着性のいずれの細胞においても、スポットの約 80% に一個の細胞がアレイ化された高密度の単一細胞アレイを作製できることを明らかにしている。さらに、このような一細胞アレイを用いて細胞の伸展・運動・細胞間接触などをタイムラプス観察し、非接着性細胞のリガンド-受容体

相互作用依存的な形態変化や接着性細胞のランダムウォークの定量化などに有効に利用できることを示している。

第三章では、光照射により一細胞アレイから特定の細胞をハイスループットに回収する技術の開発を行っている。すなわち、光分解性 PEG 脂質表面に一細胞アレイを作製し、望みの細胞に光照射して光分解性 PEG 脂質を分解し、選択的に基板から細胞を遊離させるハイスループットな細胞回収法の開発を行っている。光解離性 PEG 脂質を修飾したコラーゲンコートガラス基板を用いた一細胞アレイの場合には、接着性細胞と基板表面のコラーゲン間の相互作用により接着性細胞の選択的な光遊離は困難であったため、細胞の吸着性が極めて低い高分子である 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)を光分解性 PEG 脂質に導入した新規のスマート材料を設計・合成している。このスマート材料を 0.1 w/v %の濃度でコートしたガラス基板表面では、コンタクト露光による一細胞アレイ作製が可能であり、さらに、光照射量 $3\text{J}/\text{cm}^2$ の条件下で、マイクロ流路を用いて $6.0\sim 7.5\text{cm}/\text{s}$ 程度の線流速で均一なせん断応力を負荷することにより、細胞を完全に光遊離させることが可能であることを確認している。また、このような技術を用いて、一細胞単位で同時並列的に標的とした複数の細胞を光遊離させることができたと述べている。

第四章では、再生医療や組織モデルの構築への応用を目指して光活性化 PEG 脂質を新たに設計、合成し、これを用いた複数種の細胞のパターニングと一細胞アレイの開発を行っている。すなわち、オレイル基が二本結合した PEG 脂質表面には細胞が固定化されないという知見に基づいて、光分解性 PEG 脂質の光分解性メトキシベンジルリンカーと PEG 鎖の間に光分解されない二本目のオレイル基を導入し、光照射によって二本のオレイル基の一方が解離してオレイル基が一本となり細胞固定化機能が回復するケージド PEG 脂質を設計・合成している。これを修飾したコラーゲンコートガラス基板に光照射と細胞播種を繰り返すことにより、複数種の細胞のパターニングや一細胞アレイを構築することに成功している。

第五章は本論文の総括と今後の展望を述べている。

以上、本論文は接着性・非接着性のいずれの細胞にも適用可能な一細胞機能解析用の高密度細胞アレイ作製技術、解析後の標的細胞の回収技術の開発を目的として、光解離性リンカーを含む PEG 脂質を骨格とした各種の細胞固定化用スマート材料の開発を行ったものである。さらに、一細胞アレイ作製条件、細胞固定化条件、細胞回収のための光照射・回収液線流速条件などの最適化を行い、一細胞機能研究に有用な研究用ツールの開発を行ったものである。これらの研究成果は、一細胞の多項目機能解析に基づく薬剤候補物質の薬効や毒性評価系の構築、組織工学分野でのモデル組織の構築などへの展開が期待され、ケミカルバイオエンジニアリングの発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。