

博士学位論文審査結果要旨

西暦 2022 年 2 月 9 日

研究科、専攻名 バイオ情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 アルサリーム アブドゥラ

論文題目 Evaluation of the Attachment and viability of Cultured Cells under Addition of Antitumor Reagents Using Quartz Crystal Microbalance and Microscopy

審査結果の要旨

本研究は、水晶振動子センサーを用いた培養細胞の細胞外マトリクスへの接着および抗がん剤に対する細胞応答の連続的なモニタリングを顕微鏡観察と同時に行える装置を製作し、細胞接着や抗がん剤に対する細胞応答の研究を行ったものである。測定装置は、CO₂インキュベーター内で連続して測定と観察を行うことができ、測定温度を急速に変化させる機能も有しており、これまでにはない機能を持っている。細胞応答による細胞の形態変化を水晶振動子の共振周波数変化としてモニタリングするとともに、応答曲線のモデル式を構築し、モデル曲線が測定曲線とよく一致することを示している。このモデル式から得た指標値によって、細胞接着の時定数や抗がん剤に対する細胞応答の平均時間および細胞死の割合を算出できることを示している。

Chapter 1では、緒論として、既存の培養細胞の評価方法について述べた上で、これまでの手法が主に一定時間経過した時点での情報を取得しているのに対して、本研究の水晶振動子法によって、培養細胞の形態変化の連続的なモニタリングが可能になること、経時的な変化について変化量を数値化して評価できることなど、本研究の新規性や意義について述べている。

Chapter 2では、本研究における測定法の原理と解析法について述べている。まず、水晶振動子法の原理として、水晶振動子の共振周波数・共振抵抗から、微小な重量変化や粘弾性変化を調べることができることを述べ、細胞応答の解析については、細胞の力学的モデルから、細胞接着における細胞の変形が、一次遅れ応答となり、水晶振動子表面への細胞の質量効果の変形とともに増大するモデルを示している。この時の質量効果の変化量は、細胞数の合計になり、細胞の増殖によっても増加する。さらに、細胞が、密になった場合には、細胞の垂直方向の変形が制限されるため、細胞同士が接触する確率が細胞の密度によって増加することも考慮して、変化量が制限されるモデルとなっている。さらに、抗がん剤に対する応答では、個々の細胞は一次遅れ応答を示すと想定されるが、応答の誘起時間は統計的な分布を示すと考え、対数正規分布に従って応答が現れるモデルを考え、その平均時間と標準偏差、応答の大きさで応答曲線が表せるとしている。

Chapter 3では、本研究で製作した測定装置について述べている。装置は、水晶振動子を測定セルにセットした状態で固定できるようになっており、水晶振動子の電極としてITO電極を使用することによって、透過照明による細胞の観察が行えるようになっている。このため、小型の対物レンズとCMOSカメラ、フォーカス調製用ステッピングモーター、小型のLED照明などで構成されている。装置は、2チャンネルで同時に2つの測定を並行して行えるようになっ

ており、PNIPAMの実験のため、インキュベーター内でも温度を急速に変更制御できるように、アルミブロックに埋め込まれ、ペルチェ素子によって冷却、加熱が行えるようになっている。製作後、QCM測定と顕微鏡写真の撮影、温度コントロールが正常に行えることを確認している。

Chapter4では、ECMとして、ポリリジン、コラーゲン、温度応答性ポリマー(PNIPAM)を水晶振動子上にコートして、HepG2細胞の培養のモニタリング実験を行った。この結果、細胞接着における細胞の形態変化を水晶振動子の共振周波数変化として検知されることが細胞の観察像と対応して確認された。細胞接着における一次遅れ応答の時定数は、ポリリジンで11 h、コラーゲンで16 h、PNIPAMで38 hと、ポリリジンで最も接着が速いことが数値的に示された。ポリリジンで速くなる理由として、ポリリジンの正電荷に対して細胞の負電荷による接着が起きることと、コラーゲンでは細胞の接着タンパク質が働くことによる接着であることによる差であると考察された。PNIPAMについて、接着応答の変化量も小さく、疎水的な作用で細胞が弱く接着していると考察された。温度を変化させ、PNIPAM膜を疎水性から親水性さらに疎水性に変化させた際の接着状態の変化の評価も行われた。また、細胞の増殖の倍加時間は、65~70 h程度で、モデル曲線と測定曲線が対応することが示された。

Chapter5では、抗がん剤のシスプラチンに対するHepG2細胞の応答の実験が行われ、細胞接着後に、シスプラチンを添加すると、細胞接着によって減少していた共振周波数が、増加に転じたのち、再び減少するという2段階の応答を示すことが示された。細胞の観察では、はじめに、細胞の接着が緩んで、丸い形に近づくものが見られ、次のステップで、細胞が収縮していく現象に対応していることが示され、細胞死のプロセスが、2段階で起きていることが示された。また、対数正規分布のモデル曲線に当てはめるとこの2段階の応答の平均時間は、12 hと60 h程度となり、シスプラチンの濃度には依存せず、応答の大きさは、シスプラチンの濃度に依存することが示された。

本学位論文の研究は、新規な測定装置を製作し、細胞接着や抗がん剤に対する連続的なモニタリングを可能にし、ポリリジン、コラーゲン、PNIPAM膜への細胞接着やシスプラチンに対する細胞モニタリングを可能であることを示した。さらに、モデル式による解析によって、数値的な比較を行えるようにした。この技術は、今後、細胞接着や薬物に対する細胞応答の評価に応用できると考えられる。

本研究は、先行研究にはないオリジナリティーの高い研究であり、この内容は、関連する国際学術誌において英文論文掲載2件、国際会議において1件の発表が行われており、学術的な価値が認められている。本論文の審査、および、公開発表会における審査の結果、博士(バイオニクス)の学位に値するものであると認め、申請者の論文審査および最終試験の結果を合格とする。

審査委員 主査

東京工科大学 教授 杉山 友康