



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Studies on engineered microenvironment for manipulating functional cells in tissue regeneration   |
| Author(s)    | Azizi, Bin Miskon   |
| Citation     | 大阪大学, 2009, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49592">https://hdl.handle.net/11094/49592</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |  |  |  |
|---------------|--|--|--|
| 氏 名           | アジジ ビン ミスコン<br>Azizi Bin Miskon  |  |  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (工 学)  |  |  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 2 9 1 9 号  |  |  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 21 年 3 月 24 日   |  |  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>工学研究科応用化学専攻  |  |  |
| 学 位 論 文 名     | Studies on engineered microenvironment for manipulating functional cells in tissue regeneration<br><br>(組織再生工学における細胞機能操作のための微小環境制御に関する研究)  |  |  |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 宇 山 浩<br><br>(副査)<br>教 授 平 尾 俊 一 教 授 井 上 豪 教 授 桑 畑 進<br>教 授 林 高 史 教 授 大 島 巧 教 授 今 中 信 人<br>教 授 町 田 憲 一 教 授 田 川 精 一 教 授 安 藤 陽 一 |  |  |

## 論文内容の要旨

This thesis concludes the achievement of studies on engineered microenvironment for manipulating functional cells in tissue regeneration. This thesis includes general introduction, 2 main parts and 5 chapters, and summary. The results obtained through this study are summarized as follows:

In part I, chapter 1 and 2, the effect of ECM proteins (gelatin, collagen type-I, and fibronectin) on beating duration of rat neonatal cardiomyocytes and on differentiation of P19.CL6 carcinoma stem cell to cardiomyocytes was studied. Both of the beating duration and differentiation were greatly improved on gelatin in contrast to the case on collagen type-I and fibronectin. Mechanical property (elasticity) and biological activity of substrate affect the elongated cells beating duration and differentiation. The highly elastic feature of the matrices of gelatin, fibronectin bound onto gelatin and developed fibrin matrices may allow easier contraction of cardiomyocytes, which results in the larger action potential and longer beating duration on gelatin. These results show that, gelatin was the best substrate for cardiac cell manipulation.

In chapter 3, the effects of inducer, substrates, and cell geometry during induction on differentiation of cell-MS C to beating cardiac cells were evaluated. The mixture of 5-azacytidine, vitamin C, and bFGF is the most effective in leading to cardiac marker and cardiac differentiation marker expression. As it is different from the conventional monolayer culture method, mesenchymal stem cells (MSCs) were treated in suspension condition for 2 hours and cultured on gelatin, collagen type-I, and fibronectin substrates. A large number of beating cells was found on gelatin substrate after 4 weeks induction. This result was similar in preliminary study in chapter 1 and 2. The differentiation efficiency was enhanced by suspension induction, may be related to the proliferation activity which has not yet started in the suspension condition. The cell proliferation in suspension induction was suppressed compared to the conventional monolayer induction. The suppression of cell proliferation is related to the high expressions of cardiac differentiation marker troponin C type-2 and cardiac marker troponin T type-1 in suspension induction. These results clearly show that, gelatin substrate, the mixture of inducers (5-azacytidine,

vitamin C, and bFGF), and cell geometry in suspension condition were the best microenvironments for cardiac differentiation of MSC.

In part II, chapter 4, hepatocytes were cultured in bioreactor. Copolymer of poly ( $\gamma$ -methyl-L-glutamate) (PMLG) and the polyurethane (PAU) were used to enhance the hydrophilicity of polytetrafluoroethylene (PTFE) non-woven fabric: bioreactor membrane. To enhance the mass transfer, radial flow was introduced into this bioreactor for supplying fixed pH culture medium, fixed oxygen rate, and nutrients to the hepatocytes. The radial flow allows the medium culture to flow in the bioreactor entirely. As a result, the ammonium metabolism rate and albumin production were maintaining at high value for 1 week.

In chapter 5, the effect of epigallocatechin-3-gallate on preservation of hepatocyte functions was studied. Different concentrations of EGCG were added to the culture medium and monolayer cultured cell was kept at room temperature for 4 days. The best concentration of EGCG to preserve hepatocyte functions was 0.25 mg/mL. At concentration of 0.25 mg/mL, albumin production was fully recovered but, the ammonium metabolism was not recovered in monolayer at post-preservation. In the bioreactor, the ammonium metabolism and albumin production were fully recovered at post preservation at concentration of 0.25 mg/mL. This result shows that, the hepatocyte functions could be preserved by controlling the microenvironments especially the medium, chemical concentration, cell geometry, and temperature.

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、組織再生工学における細胞機能操作のための微小環境制御に関する研究成果をまとめたものである。主な結果を要約すると以下の通りである。

- 心筋細胞の拍動期間に対する足場材料の影響について検討している。ゼラチン上で培養した場合、心筋細胞の活動電位は、フィブロネクチン、コラーゲンタイプ 1、ポリスチレンそれぞれの足場材料上で培養した場合に比べて高く、また拍動期間も長くなることを明らかにしている。その要因は、細胞の産生したフィブロネクチンが他の足場材料よりもゼラチンと強く結合することで効率よく線維形成するために、心筋細胞の拍動期間が長くなり、活動電位も高くなると考察している。
- 種々の細胞外マトリクスを足場材料に用いて、P19.CL6 胚芽腫細胞の分化挙動を検討している。分化の指標として、心筋マーカー（トロポニン T タイプ 2、トロポニン C タイプ 1）、および心筋分化マーカー（トロポニン C タイプ 2）の発現を検討している。心筋マーカーと心筋分化マーカーの発現結果から、P19.CL6 胚芽腫細胞は、コラーゲンタイプ 1 あるいはポリスチレンより、ゼラチンあるいはフィブロネクチン上で培養した方が効率よく心筋細胞へ分化することを明らかにしている。ゼラチンとフィブロネクチンが伸縮性材料であるために、細胞の増殖が抑制され、また分化効率が高くなると考察している。
- 分化誘導因子、足場材料、培養システムなどの微小環境を制御することで骨髄間葉系幹細胞の心筋細胞への分化誘導を試みている。まず、フィブロネクチン上で骨髄間葉系幹細胞の分化を検討したところ、5-azacytidine、b-FGF、vitamin-C の混合物によって分化を誘導した場合にのみ心筋分化マーカーであるトロポニン C タイプ 2 が発現することを明らかにしている。また、懸濁状態で、この混合物により分化誘導した場合、拍動心筋細胞が発生することを見出している。さらに、同条件で分化誘導した骨髄間葉系幹細胞の、種々の足場材料上での拍動心筋細胞への分化について検討したところ、ゼラチン上で最も多くの拍動心筋細胞を確認している。これらの結果より、分化誘導因子、足場材料、培養状態が骨髄間葉系幹細胞の心筋分化に及ぼす影響を総合的に考察している。
- ポリアミノ酸ウレタン共重合体をコートしたポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 不織布を用いた人工肝補助装置用ラジアルフロー型バイオリアクタを作製し、肝細胞を培養することによって、肝細胞に対する微小環境（足場材料と培地供給法）の影響を検討している。親水化した PTFE 不織布上で、スフェロイド形状になった肝細胞にラジアルフローで培地を供給することによって、肝細胞の機能を長期間、高く維持できることを明らかにしている。
- エピガロカテキン-3-ガレートを用いたブタ肝細胞の室温保存を検討している。まず、単層培養において最適なエピガロカテキン-3-ガレート濃度を検討している。単層培養では、4 日間の保存後、肝細胞のアンモニア代謝の機能は見られず、アルブミン分泌のみしか保持できない。一方、3 次元バイオリアクタ内でエピガロカテキン-3-ガ

レートを用い、肝細胞を4日間保存したところ、アンモニア代謝およびアルブミン分泌能を保持していることを明らかにしている。

以上のように本論文は、足場材料、化学誘導因子、培養状態などの微小環境が、細胞機能、あるいは細胞分化に与える影響を総合的に評価するのみならず、従来法では困難であった心筋細胞や肝細胞の機能維持を可能にしている。さらには間葉系幹細胞からの自己拍動心筋の誘導に始めて成功するなど重要な現象も見出されている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。