

三次元培養法を利用した多能性幹細胞由来血液系細胞生産プロセス構築のための諸検討

中野, 優

<https://hdl.handle.net/2324/1937168>

出版情報：九州大学, 2018, 博士（システム生命科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

氏 名 : 中野 優

論 文 名 : 三次元培養法を利用した多能性幹細胞由来血液系細胞生産プロセス構築
のための諸検討

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

わが国では外科手術補助、事故等による失血に対する治療に輸血療法が広く用いられており、その実施予測患者数は年間で100万人を超えている。また血液疾患、悪性腫瘍等の治療にはこの輸血療法に加え、血球の源となる細胞である造血幹細胞を用いた造血幹細胞移植治療が効果的に用いられており、移植件数は年間で約5500件に及ぶ。このように我が国において血液、血球そして造血幹細胞は臨床現場において欠かすことのできない重要な細胞材料となっている。しかしながら、輸血療法、造血幹細胞移植療法ともに供給がドナーに依存しており、安定供給の難しさが問題として挙げられている。

本研究では血液機能を担う細胞を取得する手段として、多能性幹細胞であるES細胞、iPS細胞からの分化誘導に着目した。そして、全ての血液細胞の源である造血幹細胞をターゲットとし、*in vitro*において造血幹細胞を取得可能な培養プロセスの構築を目的とした。培養法として、多能性幹細胞が凝集体を形成することにより、自発的分化の促進が期待される三次元培養法に着目し、多能性幹細胞分化誘導のための三次元培養法として一般的である胚様体培養、並びに中空糸を用いた独自の三次元培養の2つの培養法を用いた。まず、マウスES細胞を用い、それぞれの培養法を用いた分化誘導過程における造血幹細胞分画の発現傾向を評価すると共に、取得可能数を定量的に評価することによりそれぞれの培養法の有効性を評価した。次に、臨床応用を念頭に、ヒトiPS細胞を用いた検討を行い、両培養法における造血幹細胞分画への分化傾向を明らかにした。さらに、生産性向上を指向した培養プロセスの改良に取り組んだ。

第1章では、本研究の背景として輸血療法および造血幹細胞移植療法に関する現状を述べると共に、本研究の目的及び目的達成のための研究方針を示した。また、本研究のオリジナリティについて示し、本研究の位置付けを明確にした。

第2章では、輸血療法および造血幹細胞移植療法について概説し、特に本研究の目的細胞である造血幹細胞についてその生体内での性質を述べた。さらに、造血幹細胞の供給源について示し、特に本研究で細胞源候補として着目した多能性幹細胞から造血幹細胞および血球細胞への分化誘導の既往の研究について示した。

第3章では、中空糸内三次元培養法および胚様体培養法を用いてマウスES細胞から造血幹細胞への分化誘導を行った。培養経過に伴う細胞形態変化、細胞数、造血幹細胞マーカー発現を評価した結果、造血幹細胞分画の収量において、中空糸培養法では従来法である胚様体培養法と比較し約40倍という高い収量を得られることが示された。これは培養に用いたマウスES細胞の約6倍に相当する数であった。また、中空糸培養法を用いたマウスES細胞の造血幹細胞への分化誘導において、播種細胞密度および酸素濃度に着目し、それぞれの因子が分化誘導に及ぼす影響を評価し、中

中空培養法の最適化を図った。

第4章では、ヒト iPS 細胞を用いて造血幹細胞への分化誘導に取り組んだ。まず、ヒト iPS 細胞を用いた三次元培養のための基礎的検討として、種々の酵素を用いたヒト iPS 細胞の分散と凝集体形成能を形態変化観察および細胞数変化によって評価した。次にそこで得た条件を用いて、胚様体培養法および中空糸培養法を用いて造血幹細胞への分化誘導を行った。この際、それぞれの培養法に対し最適な播種細胞数を検討することにより、マウス ES 細胞の場合と同等の分化誘導率を得ることが可能であった。一方、ヒト iPS 細胞の増殖能はマウス ES 細胞に比べて非常に低く、造血幹細胞分画の獲得効率はマウス ES 細胞を用いた場合の 10 分の 1 以下であった。そこで続いて、培養初期に細胞増殖期間を設ける 2 段階培養に取り組み、造血幹細胞分画の獲得効率の向上を目指した。検討の結果、胚様体培養に 2 段階培養を組み合わせることにより、分化誘導率、細胞増殖率ともに向上し、最も高い効率で造血幹細胞分画を獲得できることが示された。この結果、培養に用いた iPS 細胞の約 4 倍に相当する造血幹細胞分画の取得が可能であった。

第5章では、本論文の総括を行うと共に、本研究の今後の課題と展望について述べた。