九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

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：

（様式６－２）

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
論文調査委員	主　査　　九州大学　　准教授　　水本 博 副　査　　九州大学　　教授　　片山 佳樹 副　査　　九州大学　　教授　　井嶋 博之(工学府)

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

外科手術補助や事故等による失血に対する輸血療法、あるいは血液系疾患や悪性腫瘍等に対する骨髄移植・造血幹細胞移植等、我が国において血球系細胞移植は最も進んだ細胞移植治療の一つである。一方、これらの血球系細胞の供給はドナーに依存している。従って、感染の問題、稀少血液型への対応、安定供給の難しさ等、解決すべき問題は未だ多く、代替となる血球系細胞の提供プロセスの確立が望まれている。そのような方法として、造血幹細胞の生体外利用は古くから注目されてきた。造血幹細胞は全ての血球系細胞の源となる幹細胞である。一方、造血幹細胞は生体中での存在比が非常に小さく、また生体外での増幅も困難であることから、造血幹細胞の大量取得は困難な状況である。

本研究では造血幹細胞の取得法として、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､生体外において造血幹細胞を取得可能な多能性幹細胞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。胚様体培養では、予備的知見を基に粒径が 1000μm 程度となるような条件で培養を開始した。その結果、胚様体の半径方向への成長や細胞増殖は観察されず、酸素・栄養の供給の観点からこの粒径が成長可能な限界径であることが示唆された。次に同じ細胞数を用いて中空糸培養を行った結果、細胞は中空糸内部で円柱状組織体を形成し、その組織体が長さ方向に成長する様式で細胞増殖が示された。このときの両培養系における造血幹細胞分画の発現率はほぼ同程度であった。従って、両培養系における造血幹細胞分画の収量を評価した結果、中空糸培養では胚様体培養法と比較し約 40 倍という高い効率を得られることが示され、培養 5 日間において培養に用いた ES 細胞の約 6 倍に相当する造血幹細胞分画を取得することが可能であった。

次に、臨床応用を念頭に、ヒト iPS 細胞を用いて造血幹細胞分画への分化誘導に取り組んだ。まず､胚様体培養法および中空糸培養法に対し､播種細胞数等の培養条件の最適化を図ることにより、マウス ES 細胞の場合と同等の造血幹細胞分画へ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、培養初期に未分化状態での増殖期間を設ける 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。その結果、中空

糸培養では 2 段階培養の明確な効果は得られなかった。一方、胚様体培養では、未分化状態での培養期間において良好な胚様体形成とその成長が示された。その状態から分化培養へとスイッチすることにより、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することが可能であった。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。

以上要するに、本研究は、多能性幹細胞を細胞源とする造血系細胞への分化誘導培養プロセスの基盤技術を構築し、従来の血球系細胞提供法の代替となり得る新しい造血系細胞生産プロセス構築の可能性を示したものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本論文は博士（システム生命科学）の学位を受ける資格があるものと認める。