

# ヒトiPS細胞由来内胚葉前駆細胞の分離取得と肝分化誘導への応用

松下, 沙希子

<https://hdl.handle.net/2324/4784431>

---

出版情報 : Kyushu University, 2021, 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：松下 沙希子

論文名：ヒト iPS 細胞由来内胚葉前駆細胞の分離取得と肝分化誘導への応用

区 分：甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

肝臓は再生能力・代謝能力に優れた生体内で最大の臓器であり、合成、解毒、貯蔵などその働きは多岐にわたる。このような肝臓の機能を人工的な装置で全て補うことは中長期的にみても極めて困難であり、重篤な肝不全患者に対して現状では有用な治療法とされているのは肝移植のみである。そこで近年注目されている治療法として肝再生医療が挙げられる。肝再生医療の実現には臨床用細胞源の確保が最重要課題である。本来ならば、標的となる臓器・組織を構成する細胞を用いることが好ましいが、肝細胞に代表されるように、ドナーが不足する、あるいは増殖能に乏しい場合、大量供給が困難である。そこで、これらの問題を回避できる新たな細胞として、人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells: iPS 細胞) が注目されている。患者自身から樹立した iPS 細胞を細胞源として使用することができれば、拒絶反応の無い移植用組織や臓器の作製が可能になると期待されており、再生医療の更なる発展に向けて注目が集まっている。

本研究では、肝再生医療の細胞源を確保する手段としてヒト iPS 細胞に着目し、iPS から分化誘導された肝細胞を大量に取得可能な新規培養プロセスの確立を目的とした。まず、大量培養へと応用可能な培養法として、半透性の膜から構成される中空糸の内腔を培養空間として、そこで iPS 細胞の三次元培養を行うことに着目した。次に、iPS 細胞から肝細胞への分化誘導について、現在、様々な肝分化誘導法が報告されているが、その分化誘導効率は必ずしも 100%ではない。この場合、分化誘導率を高めるか、目的以外の細胞を除去することが必要となる。そこで、本研究では中空糸を用いた独自の三次元培養法により iPS 細胞を培養する過程において、まずは未分化状態で高密度培養を達成し、その後分化誘導を行い、肝細胞へと運命付けられた細胞集団を分離取得し、その細胞集団を成熟化させる多段階の培養プロセスの有効性について検討した。さらに、iPS 細胞が中空糸内部で形成する細胞凝集塊の形状が iPS 細胞の運命決定因子として作用する可能性に着目し、中空糸径による iPS 細胞の分化傾向について検討を行うことにより、iPS 細胞の分化誘導法としての中空糸培養の有効性の評価に取り組んだ。

第 1 章では、本研究の目的・背景を述べるとともに、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を示し、本研究の位置付けを明確にした。

第 2 章では、本研究の標的臓器である肝臓について概説し、肝再生医療の現状を示した。さらに、肝再生医療の細胞源となり得る細胞について示し、本研究で細胞源候補として着目した多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導の既往の研究について示した。また、多能性幹細胞の大量培養法についての既往の研究についても示した。

第 3 章では、中空糸培養法を用いてヒト iPS 細胞の三次元培養を実施するとともに、肝細胞への自発的分化誘導過程における内胚葉系細胞の分離取得を行った。ヒト iPS 細胞は中空糸内で良好に増殖し、高密度培養の達成が可能であった。また自発的分化誘導過程における目的細胞の分離取得のためのマーカーとして内胚葉マーカーである CXCR4 を選択し、培養過程における CXCR4 の発

現の推移を評価するとともに、従来法である単層培養法との比較を行った。その結果、高密度条件下にもかかわらず従来法である単層培養と比較して約2倍の分化誘導率が示された。さらに、培養過程における特異的細胞集団の分離取得として、磁気細胞分離法に着目し、CXCR4をマーカーとした磁気細胞分離を実施することによりCXCR4発現細胞の分離取得とその特性評価を行った。

第4章では、分化誘導過程におけるiPS細胞の運命決定因子として、iPS細胞が形成する凝集塊の径に着目し、内径の異なる2種類の中空糸（ $\phi 145\mu\text{m}$ 、 $\phi 366\mu\text{m}$ ）を用いてヒトiPS細胞の自発的な分化培養を行い、分化傾向の違いを評価した。この結果、 $\phi 366\mu\text{m}$ では内胚葉・中胚葉へ、 $\phi 145\mu\text{m}$ では外胚葉へと分化しやすい傾向を見出した。従って、中空糸の内径が内部で形成されるヒトiPS細胞凝集塊の分化傾向に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、中空糸径による分化傾向の違いを利用して、ヒトiPS細胞の肝分化培養を行った。

第5章では、本論文の総括を行うとともに、本研究の成果を基に今後の課題と展望について述べた。