

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		
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 工藤 奨
	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

肝臓は再生能力・代謝能力に優れた臓器であり、その機能全て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る。現在重篤な肝不全患者に対して有効な治療法とされているのは肝移植であるが、深刻なドナー不足の状態にある。そのため、肝移植の代替医療として、加工した細胞を利用する肝再生医療の実現が期待されている。肝再生医療の実現には臨床用細胞源の十分量の確保が必要となる。本来ならば、肝臓から取得した肝細胞の利用が望ましいが、ドナー不足の問題とともに生体外での増殖能に乏しいことから大量供給は困難である。このため細胞源の探索とその供給プロセスの確立が最重要課題である。

本研究では、肝再生医療の細胞源を確保する手段として、人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells : iPS 細胞) に着目し、iPS 細胞から分化誘導された内胚葉細胞、並びにそこから成熟し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、iPS 細胞の三次元培養を行うことに着目した。次に、iPS 細胞から純度の高い肝細胞集団を取得する手段として、分化誘導率の向上と、目的以外の細胞の除去の 2 つに着目した。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。

まず、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手段として、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した。遺伝子発現解析の結果、分離後の陽性細胞集団は *CXCR4* 遺伝子の発現が分離前並びに分離後の陰性集団と比べて高く、磁気細胞分離法は有効な細胞分離手法であることが示された。

一方、中空糸内三次元培養下での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（145 μ m、366 μ 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、内径 366 μ m の中空糸を用いた場合には内胚葉・中胚葉へ、内径 145 μ m の中空糸を用いた場合には外胚葉へと分化しやすい傾向を見出した。このように、中空糸の内径によってヒト iPS 細胞の分化傾向が異なることを初めて明らかにし、iPS 細胞の凝集塊形状が分化傾向に影響を及ぼす要素である可能性を示した。さらに、中空糸培養を用いて自発的分化誘導の後に肝細胞への成熟化培養を試みた。この結果、培養 21 日目より肝特異的機能の一つであるアンモニア除去能の発現が認められた。一方、その発現レベルは初代肝細胞と比べると大幅に低く、培養初期からの積極的な内胚葉への分化誘導促進やそのための添加因子条件を含めた中空糸径の最適化の必要性が示された。

以上要するに、本研究は中空糸内三次元培養による iPS 細胞由来内胚葉細胞の大量培養プロセスの基盤技術を確立するとともに、iPS 細胞の効率的な分化誘導プロセス構築において考慮すべき要因を提案するものであり、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。