博士論文（要約）

Study on the control of aggregation and growth of induced pluripotent stem cells (iPS cells) in suspension culture

（iPS 細胞の浮遊懸濁培養における凝集・増殖制御に関する研究）

堀口　一樹

本論文は，Study on the control of aggregation and growth of induced pluripotent stem cells (iPS cells) in suspension culture （iPS 細胞の浮遊懸濁培養における凝集・増殖制御に関する研究）と題し，再生医療の実現に必要不可欠なヒト iPS 細胞の大量培養プロセスの設計を最終目的とし，ヒト iPS 細胞の浮遊懸濁培養における 2 種類の異なる iPS 細胞の凝集抑制法を確立・比較検討することで，これまで困難であった低撹拌速度での安定な浮遊懸濁培養の実現を示したものであり，全５章からなる．

第 1 章は緒言であり，ヒト iPS 細胞を用いた再生医療における大量培養技術の必要性を示し，現行の大量培養技術を，細胞を基質に接着させる接着培養および細胞を培養液中に分散させる浮遊培養の２つに分類して紹介している．特に，スピナーフラスコや培養バッグに代表される浮遊培養は装置を単純にできるため，スケールアップにおいては有利であることを述べている．その一方で，細胞障害が発生しないレベルの撹拌条件下での浮遊培養において発生する過剰な凝集は，細胞の収量を低下させるため，効率的な凝集抑制法が浮遊培養のスケールアップには重要であると指摘している．また，従来のマイクロウェルや培地の粘度・比重の調整による凝集抑制では，スケールアップに対応できないことも指摘している．最後に，以上のような指摘のもと，安定かつ容易に凝集抑制を達成でき，なおかつスケールアップに堪えうる技術として，アルギン酸ゲルカプセルによる固定化培養と凝集抑制因子の添加について述べ，本論文のアプローチとして示している．

第２章では，前章で示したアプローチのうちの１つであるアルギン酸ゲルによるカプセル固定化培養を用いた iPS 細胞の培養法の確立について述べている．はじめに，二重円管ノズルを用いてカプセル形成技術の確立について述べている．適切な流量の窒素を二重円管ノズル外管から流し，ノズル内管からアルギン酸ナトリウムを窒素流にのせて滴下することで液滴を作成し，塩化カルシウム溶液中に回収することで，600 μm 以上のサイズで均一なアルギン酸ゲルカプセルを大量に作製できることを示した．続いて，ヒト iPS 細胞のカプセル固定化培養に先立って，マウス iPS 細胞を，この手法を用いてアルギン酸ゲルカプセル中で培養し，iPS 細胞のカプセル固定化培養にはポリ-L-リジンなどを用いた被膜の形成が不可欠であること，１０日間の培養で直接浮遊懸濁培養と同程度の細胞収量が得られることを示した．さらに，RT-qPCR や免疫染色の結果から，被膜をもつゲルカプセル中で培養されたマウス iPS 細胞凝集体は分化マーカーの発現が著しく抑制されており，高い未分化状態を維持しながら培養できる可能性を示した．

第３章では，もう一方のアプローチである，凝集抑制因子の探索について述べている．本章では，凝集のメカニズムとして，カドヘリンを介した細胞接着と，静電相互作用や親水疎水作用による細胞同士の非特異的接着に着目し，それぞれを抑制する因子としてE-カドヘリン-Fc キメラ，KnockOut 血清代替品（KSR）を採用し，それぞれの凝集抑制効果について報告している．低細胞接着処理を施した１２ウェルプレート上でヒトiPS 細胞を，凝集抑制候補因子を添加した上で浮遊培養し，形態や５日間における細胞収量を評価することで，凝集抑制候補因子の効果を評価している．結果，E-カドヘリン-Fc キメラによる凝集抑制は培養液によっては部分的に効果が得られたが，再現性が低く，制御が難しいことを明らかとした．一方で，KSR を用いた凝集抑制は培養液・細胞株に関係なく 1～20%の濃度で効果が得られたことを示した．また，適切な濃度（2%）の KSR 添加によって培養５日間における増殖効率が３倍以上に改善されたことを示している．さらに，KSR に含まれているタンパク質についても同様の検討を行っており，脂質が多く含まれているアルブミン（AlbuMax）が 0.1～2%の濃度領域で有効に凝集抑制効果を果たしていることを示している．この濃度領域は KSR の有効濃度領域に含まれる AlbuMax と同程度であり，KSR による凝集抑制は当初予想していた細胞同士の非特異的吸着の抑制ではなく，KSR に含まれる脂質が寄与していることを明らかにした．以上の検討により，脂質成分の供給が，低コストかつ安定的に凝集抑制を達成できる可能性を提示している．

第４章では，第２章および第３章で検討したカプセル固定化による凝集抑制と凝集抑制因子の添加の２種の凝集抑制法の比較検討について述べている．検討にあたって，グルコース消費量や培養７日後の DNA 収量などを中心とした増殖と，RT-qPCR や免疫染色を中心とした未分化性の２つの観点から比較している．DNA 量評価による増殖の評価では，ややカプセル固定化培養が優位であるという結果が出たが，凍結切片による免疫染色では凝集体中に細胞死による空隙が見られるなどカプセル中の凝集体の状態は良好ではなく，さらに DNA 量測定では正確に生細胞と死細胞を区別することはできないため，この優位性に関しては，トリパンブルー染色や MTT アッセイといった他の評価による確認が不可欠であることを示した．未分化性の観点では，ヒト iPS 細胞では，マウス iPS 細胞で見られた分化の抑制が見られず，KSR を用いた直接浮遊懸濁培養大差がなかった．総括すると，カプセル固定化と KSR を用いた直接浮遊懸濁培養では，カプセル固定化の方がやや優位と考えられるが，細胞をカプセル化する工程，回収する工程が必要という問題点を覆すことはできないと考察し，未分化維持大量培養という観点では，第３章で検討した凝集抑制因子の添加の方が優位であると結論づけた．

第５章は結言であり，本論文全体のまとめと到達点を示すとともに，再生医療のための大量培養技術の発展に対する本研究の寄与可能性および課題について述べている．

以上本論文は，ヒト iPS 細胞の浮遊懸濁培養において，アルギン酸ゲルを用いたカプセル固定化と KSR を添加した凝集抑制の２種類の凝集抑制法を確立し，比較検討を行うことで，これまで達成できなかった，細胞障害の起こらない低い撹拌速度での浮遊懸濁培養を可能とし，それによって効率的に酸素供給しつつ，剪断応力による細胞障害を最小限に留めた状態での培養をはじめて可能とした．以上の結論は，再生医療の実現に必要なヒト iPS 細胞の大量培養技術の発展にとって極めて重要な知見であり，化学工学，バイオエンジニアリング，再生医学の発展に大きく寄与するものと考えられる．