

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 吉岡 純矢

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は、様々な細胞へと分化することができる多分化能と自己複製能をあわせ持つため再生医療分野において有用であり、一般的には回収した骨髄の組織から密度勾配遠心分離法によってサイズや密度を利用して分離される。しかし、密度勾配遠心分離法は得られる細胞の存在割合や再現性に課題があるため、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を分離するための高い選択性を有する技術の開発が望まれている。そこで、本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と同組織由来の前骨髄球の混合物から、鋸型電極を有する誘電泳動デバイスを使用して、迅速で非標識に間葉系幹細胞を分離することを目的としている。

本論文は序論、鋸型電極を有する誘電泳動デバイス、誘電泳動デバイスを使用した間葉系幹細胞の迅速な分離、結論の 4 つの章で構成されている。

序論では、研究において使用した物理現象である誘電泳動の原理や使用例を挙げ、さらに、間葉系幹細胞を臨床で使用するための課題について説明し、研究目的を明確にしている。

鋸型電極を有する誘電泳動デバイスの章では、間葉系幹細胞を分離・純化するために、フォトリソグラフィ技術とエッチング技術を用いて独自に設計した鋸型電極を有する誘電泳動デバイスを作製している。有限要素解析の結果は、作製した鋸型電極は先行研究においてしばしば使用される直線型の電極に比べ電場密度勾配が大きく、効率的に誘電泳動を生じさせられる可能性があることを示している。鋸型電極を有する誘電泳動デバイス作製の際には、フォトマスクを通した UV 光の露光時間によって現像後のポジティブフォトリソレジストの電極模様の太さに変化が見られ、露光時間の最適化をおこなっている。また、ITO 電極を加工する操作であるエッチング時には、超音波洗浄機の稼働時間によってエッチング液の温度が上昇しエッチング時間が短くなる現象について、エッチング時の温度と所要時間の関係性を報告している。

誘電泳動デバイスを使用した間葉系幹細胞の迅速な分離の章では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞のモデル細胞 UE7T-13 とヒト骨髄由来前骨髄球 HL-60 の混合細胞溶液を前章で構築した流路に流し、デバイスに電圧を印加することで UE7T-13、HL-60 にそれぞれ正の誘電泳動、負の誘電泳動をおこなっている。その際、比較的細胞サイズが大きい UE7T-13 が鋸型電極上に多く集まっているのに対し、比較的細胞サイズが小さい HL-60 は鋸型電極の間に集まっていることが確認され、デバイス内に水流を加え負の誘電泳動がかかっている HL-60 のみを選択的に流路外へ流し出すことに成功している。細胞を流路内に導入してから分離が終わるまでの時間はおよそ 5 分程度であり、細胞をデバイスに注入する前の細胞懸濁液の置換を含めた全行程も 40 分以内

に完了することができており、本デバイスは既存の方法と比べ迅速に細胞を分離できる可能性があることを示した。分離前の UE7T-13 の存在割合が 33.3 % であったのに対し、分離後の UE7T-13 の存在割合は $83.5 \pm 7.1\%$ に向上した。なお、プロトプラストモデルによるシミュレーションを使用し、細胞を分離できた要因を調べた結果、各細胞の半径と膜容量の違いが異なる誘電泳動挙動を発現させた要因であることを考察している。また、誘電泳動後もほとんどの UE7T-13 が生存し、誘電泳動前と同レベルの接着・伸展する能力、さらに遺伝子発現量を有していることを確認している。以上より、誘電泳動デバイスを使用する間葉系幹細胞の分離は迅速、非侵襲、非標識であり、既存の方法と比べ本デバイスが優れた性質を有していることを示している。

結論では、本研究で得られた成果と今後の課題や展望について述べている。

本研究は間葉系幹細胞の分離において課題であった細胞分離に対して誘電泳動の応用可能性を示したものである。本研究の成果は、幹細胞を使用する研究や医療分野において大きく寄与することが期待できる。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。