

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 ファド ガンジ トリザル

本論文は, Development of high-density 3D dynamic suspension culture for human induced pluripotent stem cells expansion and hepatic differentiation (ヒト人工多能性幹細胞凝集体の増殖と肝分化のための高密度三次元動的懸濁培養法の開発) と題し, ヒト iPS)細胞凝集体の低コストかつ効率的な増幅および肝分化のための浮遊懸濁培養法の開発を最終目的として行った研究成果をまとめたもので, 全 5 章からなる.

第 1 章は緒言であり, ヒト iPS 細胞が再生医療や創薬スクリーニング用の肝細胞ソースとして高く期待されているが, 増幅および分化誘導に必要な増殖因子が極めて高価であり, その使用量を大幅に低減する効率的な培養方法の開発が必要であること, そのためには細胞凝集体の浮遊懸濁培養の高密度化が最も有効であると述べている. そして, 高密度化の達成のためには, 懸濁培養にて細胞凝集体が受ける力学的障害の抑制と, 培養液組成の維持が重要であると述べ, 培養液への高分子多糖の添加と透析操作の組み合わせによる高密度培養の達成という本研究の目的とアプローチを述べている.

第 2 章では, 高分子多糖 (ジェランガム) を添加した透析培養における iPS 細胞の未分化維持増幅に関する成果を述べている. まず, ジェランガムの添加が凝集体の高密度懸濁培養における細胞への力学的障害を顕著に低下させることを述べている. 一方, 市販の膜型培養器の多孔質膜を透析膜に交換し, 容量の大きなウェルを持つプレートと組み合わせ, プレートごと旋回培養するという小型かつ多数の条件の検討を可能とする培養システムを考案している. また, このシステムにおいては, 高分子である増殖因子は細胞培養コンパートメントに保持されるが, 透析膜を介して接触する透析コンパートメントによって低分子の栄養素の供給と老廃物の除去とが効率的に達成され, しかもこれらの物質の膜透過性は, ジェランガム添加で変化しないことを確かめている. さらに, iPS 細胞凝集体の増幅を実施し, 同じ増殖因子の使用量で, 従来の標準的な条件と比較して約 8 倍の最終到達密度を得ることに成功している. この結果に基づき, 培養液の価格は増殖因子のそれによりほぼ決定されるため, 同数の細胞を得るためのコストを 1/8 にすることが可能となると考察している. また, 高密度培養では, 自己分泌性の増殖因子も細胞培養コンパートメントに蓄積されることで, 未分化マーカーの向上が見られたことが, 大幅な細胞数増加にも関わらず増殖因子供給量の増大が不要であった主要な理由であると考察している.

第 3 章では, 懸濁培養で増幅した未分化 iPS 細胞凝集体について, 肝分化を開始する際の最適な凝集体の大きさについての研究成果を述べている. まず, 凝集体をそのまま懸濁培養にて肝分化誘導すると, 一定割合で肝細胞を含まない中空の球状組織が形成

され、肝細胞収量の低下を招くという問題を指摘している。そして、この現象が肝分化誘導開始時の凝集体の大きさに依存することを明らかにするために、マイクロウェルへ播種する細胞数を変えることで様々な大きさの凝集体を形成後に肝分化誘導を施し、小型の凝集体からは肝細胞を含まない中空の球状組織が専ら形成され、一定以上の大きさの凝集体からはほぼ肝細胞からなる高密度の凝集体が形成されることを、形態学的および機能学的に示している。また、大きな凝集体では、未熟な肝細胞の胆管上皮細胞への分化も著しく抑制され、結果的に肝分化効率の向上に寄与すると述べている。

第4章では、第2章および第3章の成果に基づき、ジェランガムを添加した透析培養におけるiPS細胞の肝分化誘導に関する成果を述べている。まず、ジェランガム添加の有無が肝分化に及ぼす影響について検討し、主に力学的障害の抑制を通じて、肝細胞の最終的な収量を高めることができることを述べている。次に、第2章で開発した小型の透析培養系にて肝分化の第一段階である内胚葉系への高密度分化を行い、使用増殖因子の総量を増やすことなく良好な増殖と分化が達成され、細胞密度を従来の約7倍へと高め得ることを報告している。今後、肝分化の最終段階まででの確認は必要であるが、培養液の価格はほぼ増殖因子の価格で決定されることを考慮すれば、このことは、分化誘導のコストを1/7に低減できる可能性を示すものであり、分化誘導の細胞数あたりのコストが未分化増幅の数十倍であることを考慮すれば、そのコスト低減効果は極めて大きなものになると述べている。また、細胞密度を高めることで分化マーカーの亢進が見られたことから、高密度培養では内因性の増殖因子の効果を有効に利用できる可能性を示唆している。

第5章は結論および展望であり、本論文全体の到達点を示すとともに、小型培養システムで得られた高密度培養に関する成果を基に、実際の再生医療や創薬スクリーニングに必要な多量の臓器細胞の増幅分化を達成する上での未解決の課題および解決への展望を述べている。

以上、本論文は、多糖による力学的細胞障害の抑制と透析操作による良好な培養液組成の維持とによって、従来の7-8倍の高細胞密度での増幅および肝分化に成功している。これは、再生医療や創薬スクリーニングへの利用が期待されるiPS細胞由来の臓器細胞の生産コストの大幅な低減の可能性を示すものである。また、細胞を高密度状態においても良好な環境で培養することで、細胞の持つ自律的能力を十分に活用し得るという幹細胞培養システムの設計における新たな指針をも示すもので、バイオエンジニアリング・生物化学工学・生体組織工学・再生医療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。