

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 川田 治良

本論文は、多能性幹細胞の分化状態を時空間的に制御する新しい方法を提案し、そのために必要なマイクロ流体デバイスの設計から機能評価、細胞培養実験での検証に至るまでの一連の成果をとりまとめたものである。

本論文は全8章から構成されている。

第1章では、本研究の背景として、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞研究を概観し、細胞の分化誘導による組織形成プロセスの理解が、再生医療への応用や発生学研究において重要であることを述べている。体内では空間的に不均一な環境で分化が進むのに対し、既存の実験系では、そのような培養環境を十分に再現できていないことを指摘している。これに対し、マイクロ流体デバイスを用いて、空間特異的に分化因子を細胞に作用させることが可能な技術を開発し、その機能を評価・検討することを通じて新たな実験技術を確立しようとする本論文の目的について述べている。

第2章では、二次元と三次元の二種類の培養状態に対応して、物質の空間的な分布を制御しながら培養する方法を提案している。マイクロ流路内で層流によって形成された物質濃度分布を、膜を介して細胞に作用させるデバイスと、膜上に孔を設けて胚様体を固定することにより、胚様体の一部のみに特定の物質を作用させることができる培養方法の二種類をそれぞれ提案している。

第3章では、第2章で提案された原理に基づく具体的なデバイスの設計と製作方法が示されている。二次元分化制御デバイスは、膜で仕切られた上下二層の流路を有するマイクロ流体デバイスで、PDMSの型どりによって製作する。三次元分化制御デバイスとしては、流路型とインサート型が提案されている。

第4章では、製作したデバイスの機能について、詳細な検討を加えている。二次元分化制御デバイスでは、下層流路に形成した層流による物質濃度分布が鈍ったかたちで上層流路に反映されるとともに、その物質分布が長時間にわたって維持できること、また、上層流路では10%程度の小さい流速に流れが抑えられることなどを確認している。さらに細胞が取り込む物質量の計測結果を踏まえて、下層流路から物質が直接細胞に作用する経路と上層流路内に形成され

る分布を通して作用する 2 つの経路が、物質が細胞に作用する経路として存在する可能性を指摘している。一方、三次元分化制御デバイスの流路型デバイスについては、胚様体を安定して固定しておくことが難しく、歩留まりの高い実験が困難であるのに対して、インサート型デバイスでは直径 $100\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ の孔を用いれば、胚様体を安定して固定することが可能であり、実際に胚様体の一部のみに物質を取り込ませることに成功している。

第 5 章では、二次元分化制御デバイスを用いてマウス iPS 細胞に対して部位特異的な分化制御を試みている。分化培地と未分化培地による層流を形成して、流路内の一部の細胞のみを分化誘導することに成功しており、パターンを変えても同様に制御可能である。さらに、初期の誘導を 72 時間行った場合には、その後、未分化培地で培養を続けても流路内の細胞全体が分化方向へ誘導されるという興味深い現象を見出し、これについて、二種類の仮説を提起している。

第 6 章では、インサート型三次元分化制御デバイスを用いて、マウス iPS 細胞由来の胚様体の一部のみを分化させることや、マウス ES 細胞の胚様体を部位特異的に神経前駆細胞へ分化させることに成功している。さらにマウス ES 細胞を用いて、部位特異的に網膜前駆細胞に分化させることも試みており、膜の下部のみに網膜前駆細胞マーカーの蛍光は見られるものの形態的には網膜様の層状構造が観察できなかったことを報告している。

第 7 章では、本論文で行った一連の実験について、詳細な考察を加えている。二次元分化制御実験における各因子の濃度分布を明らかにすると同時に、それらが複合して分化制御が行えていることを確認している。また、第 5 章で提起した仮説を検証するために、ウェルプレートでの実験を行い、デバイス実験と比較することによって、細胞間相互作用の存在は否定できないが、その効果はさほど大きくないと結論づけている。さらに、インサート型三次元分化制御デバイス上に胚様体が固定される際の流れや、胚様体に対する物質の作用の空間的な広がりについて考察している。

第 8 章では、本研究で得られた成果をまとめ、開発したデバイスを用いることによって初めて、分化の空間特異性に関する議論が行えるようになったと結論づけるとともに、残された課題と今後の展開について述べている。

以上のように本論文では、多能性幹細胞の分化誘導を行う新しい技術として、分化制御デバイスを考案し、その有効性を実証している。本論文の成果は、新しい学問的な議論を行う基盤的な実験技術をもたらすもので、バイオエンジニアリングの学術的発展に貢献するものである。

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。