

審査の結果の要旨

氏名 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なヒト iPS 細胞の大量培養プロセスの構築を目指して、ヒト iPS 細胞の浮遊懸濁培養における 2 種の異なる細胞凝集抑制法を確立し比較検討することで、これまで困難であった低攪拌条件下での安定な浮遊懸濁培養の実現可能性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、本研究の背景と目的を述べている。まず、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指摘すると共に、現行の大量培養技術を紹介している。特に、iPS 細胞が形成する細胞凝集体を、スピナーフラスコや培養バッグを用いて浮遊懸濁培養する方法は、装置の構造が単純であり均一な培養条件を保った高密度培養が比較的容易に達成可能であることから、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。一方で、特に低攪拌条件下で顕著となる過度の細胞凝集の抑制が、浮遊懸濁培養における効率的な細胞増幅とそのスケールアップを達成する上で、解決すべき重要な課題の 1 つであることを指摘している。最後に、この問題の解決のために有望と思われる安定的かつ容易な凝集抑制手法を提案し、本論文のアプローチを示している。

第 2 章では、マイクロカプセル固定化培養を用いた iPS 細胞の凝集抑制法の確立について述べている。まず、二重円管ノズルを用いたアルギン酸カルシウムゲルからなるカプセルの形成手法について、従来は経験的に決定されてきたアルギン酸ナトリウムや塩化カルシウムの濃度、窒素流量といった形成パラメータの関係を、高速度動画撮影によってより深く理解することに成功している。続いて、マウス iPS 細胞をカプセルに包括固定化培養し、カプセル外への細胞の漏出を防ぐためには、カプセル表層にポリカチオンと形成されるポリイオンコンプレックスゲル被膜が不可欠であること、このカプセルでは 10 日間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ている。さらに、カプセル内で培養されたマウス iPS 細胞凝集体では、直接浮遊懸濁培養に比べて未分化状態をより維持した増幅が可能であること、これは分化のきっかけとなる原始内胚葉層がカプセル培養では形成されないためであることを明らかとしている。

第3章では、凝集抑制因子の培養液への直接添加によるヒト iPS 細胞の凝集抑制法に関する結果を報告している。すなわち、カドヘリンを介した特異的細胞接着と、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) を選定すると共にそれらの凝集抑制効果を明らかとしている。E-カドヘリン-Fc キメラによる凝集抑制は限定的である一方で、KSR を用いた凝集抑制は培養液・細胞株に関係なく 1~20% の濃度で安定した効果が得られたことを示している。また、適切な濃度(2%)の KSR 添加によって過度の凝集を防ぐことで、培養 5 日間における増殖効率を 3 倍以上に改善可能であることを述べている。さらに、KSR に含まれる複数のタンパク質のうち、脂質を担持したアルブミンに専ら凝集抑制効果があることを突き止めている。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のために最も有効であると結論付けている。

第4章では、確立したカプセル包括固定化法と KSR 添加法の 2 種の凝集抑制法について、ヒト iPS 細胞を用いて比較検討した結果を報告している。増殖については、カプセル固定化培養がやや優位であったが、細胞のカプセル化と回収操作が必要となる上、ヒト iPS 細胞ではマウス iPS 細胞のカプセル培養で見られた未分化維持が十分でなかったことから、KSR 等を用いて脂質を十分に供給する浮遊懸濁培養の方が大量培養法としては有望であると結論付けている。

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、幹細胞大量培養技術の確立におけ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、アルギン酸カルシウムゲルを用いたマイクロカプセル包括固定化と KSR 等を用いて脂質を十分に供給する手法の 2 種類の凝集抑制法を確立すると共に比較検討を行うことで、これまで達成できなかった低攪拌条件下での浮遊懸濁培養が可能となり、未分化性を保持したままの高い細胞増幅に成功している。この成果は、再生医療の実現に必要なヒト iPS 細胞の大量培養技術の確立にとって極めて重要なものであり、再生医療工学・幹細胞工学・生物化学工学・バイオエンジニアリングの発展に大きく寄与するものと考えられる。

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。