

氏名	池田 和弘		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	博甲 第 8379 号		
学位授与年月日	平成 29 年 9 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	A 3D Culture System for Pluripotent Stem Cells by the Cell Fiber Technology (細胞ファイバ技術を用いた多能性幹細胞の三次元培養法)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田 健一郎
副査	筑波大学教授	博士（農学）	三浦 謙治

論 文 の 要 旨

iPS細胞は多能性幹細胞の1種であり、個体から単離した体細胞に*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*などを導入することによって自己複製能と分化多能性を獲得させた細胞である。このようなiPS細胞は、幹細胞に関する基礎研究や効率的な薬剤スクリーニングへの活用にとどまらず、再生医療への応用がおおいに期待されている。しかし、iPS細胞を用いた再生医療を実現するためには、移植に必要な細胞をiPS細胞から大量に調整することが必須となる。例えば、心筋梗塞やI型糖尿病患者への移植治療には10の9乗個、肝疾患に関しては10の10乗個の分化した体細胞がそれぞれ必要とされている。これだけの細胞数を従来の二次元培養法で確保するには患者1人に対して数100～数1000枚の培養皿が必要となる。また、二次元培養法では三次元的な構造である生体内の臓器や組織を再現するには限界がある。

細胞を細胞塊として培養できる三次元培養法は大量の細胞を調整できる方法である。iPS細胞をアルギン酸ハイドロゲルビーズ内に包埋して三次元的に培養するアルギン酸包埋培養は移植に必要な大量の細胞を培養できる方法として注目されている。しかし、この方法ではiPS細胞をアルギン酸ビーズに包埋してしまうため、増殖したiPS細胞が凝集し、結果として、増殖能の低下と細胞死の誘導が起こってしまう。また、培養中のiPS細胞を継代しながら連続培養することも極めて困難である。このような問題を解決するために、本論文の著者は細胞ファイバ技術を応用する発想に至った。著者は、iPS細胞をコアシェル型マイクロファイバ内（細胞外基質をコア+アルギン酸ハイドロゲルをシェル）で培養することにより、過剰な細胞凝集による細胞死を防ぎ、増殖効率のよい三次元培養系の確立を目指した。

まず、iPS細胞をコアシェル型マイクロファイバ内で3次元培養可能か、否かを検討するために、著者はヒトiPS細胞より培養が容易なマウスiPS細胞を用いて初期培養条件の検討を行った。その結果、マウスiPS細胞はファイバ中で増殖し、細胞塊を形成し、培養3日後であっても未分化マーカーであるNanogの発現が維持されていることが分かった。また、細胞外基質の検討においてはアテロコラーゲンの使用がマウスiPS細胞の増殖に有効であることも分かった。これらの基礎条件をもとに、著者はヒトiPS細胞をコアシェル型マイクロファイバ内で3次元培養することを試みた。

ヒトiPS細胞はマウスiPS細胞とは異なり、単一細胞から培養を開始するとほぼすべての細胞が死滅してしまうことが知られている。このため、著者は前処理培養としてヒトiPS細胞を浮遊培養して細胞塊を形成させ、それからコアシェル型マイクロファイバ内に封入して培養する方法を考案した。この方法により、球状だったヒトiPS細胞塊がファイバ状に増殖できるようになった。次に、著者は培養開始細胞数、培養素材、培養環境等の詳細な検討を行った。その結果、培養開始時のヒトiPS細胞の密度を 10^7 cells/mLにした場合、二次元培養では4日間の培養で約7倍の増殖に留まるのに対し、コラーゲンを用いたコアシェル型マイクロファイバ内では4日間の培養で約13倍に増殖できる培養条件を見出すことに成功した。

一方、コアシェル型マイクロファイバ内でヒトiPS細胞を長期間培養し続けると、マイクロファイバの破綻や細胞死が誘導されやすくなるため、著者はコアシェル型マイクロファイバ内で培養したiPS細胞の継代培養を試みた。その結果、著者は最長2ヶ月以上にわたってヒトiPS細胞を培養することに成功した。長期継代培養したヒトiPS細胞は、二次元培養法によって培養されたヒトiPS細胞と同様に、未分化マーカーのRNA (NANOG, OCT4, SOX2, ZFP42, TDGF1, TERT, ECAD) ならびにタンパク質 (OCT3/4, NANOG, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) の発現を維持しており、また、長期培養したヒトiPS細胞の90%以上がOCT3/4陽性であり、正常な核型を呈していることを証明した。最後に、著者は長期培養したヒトiPS細胞を含むファイバを切り出し、血清を含む培地内で再培養することで、自発的な分化誘導を試みた。その結果、誘導培養16日目の細胞群においてTuj1 (外胚葉マーカー)、 α SMA (中胚葉マーカー)、AFP (内胚葉マーカー) の発現が免疫染色にて確認することができた。

審 査 の 要 旨

体細胞から樹立することができるiPS細胞は多様な病気に対する効果的な薬剤のスクリーニングや再生医療への応用が期待されている。しかし、再生医療への応用に際しては自己複製能と多分化能を維持した大量のiPS細胞が必要となるため、iPS細胞を大量に調整することができる培養法の確立が重要な課題となっている。このような状況の中、本論文の著者はヒトiPS細胞の自己複製能と多分化能を維持した状態で長期間培養できる方法として細胞ファイバ技術を応用したコアシェル型マイクロファイバ培養法の確立に成功した。また、著者が確立したコアシェル型マイクロファイバ培養法ではファイバを切り出すことで3次元的に増殖したヒトiPS細胞塊に分化を誘導することができるため、再生医療への応用はもとより、生体の臓器や組織の3次元構築の基本原理を探求するための幹細胞材料としての活用も期待される。これらのことから、本論文の成果はiPS細胞の分子細胞生物学的な研究への貢献、ならびに、iPS細胞の再生医療への活用基盤として学問的価値が極めて高い。

平成29年7月4日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。