



Title	Spatial Heterogeneity Analysis of Seeding of Human Induced Pluripotent Stem Cells for Neuroectodermal Differentiation
Author(s)	Qatan, Ali Ahmed Issa
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105410
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (QATAN ALI AHMED ISSA)

Title

Spatial Heterogeneity Analysis of Seeding of Human Induced Pluripotent Stem Cells for Neuroectodermal Differentiation
(神経外胚葉分化を目的としたヒト人工多能性幹細胞播種過程における空間的不均一性解析に関する研究)

Abstract of Thesis

General Introduction

Human induced pluripotent stem cells (hiPSC) are central to regenerative medicine, disease modeling, and the development of cell-based products. However, achieving reproducible outcomes in adherent high-density cultures remains difficult, as early seeding determines how cells attach across the culture surface. The resulting spatial heterogeneity—arising at local and vessel-wide scales—affects cell–cell contact, mechanotransduction, nutrient distribution, and ultimately lineage commitment. Despite its importance, cell distribution is not usually measured; common descriptors such as mean density or qualitative microscopy do not capture multiscale variation or the effects of specific handling steps.

As hiPSC manufacturing moves toward greater standardization and automation, quantitative evaluation of cell distribution becomes essential. This dissertation develops a structured framework for quantifying spatial heterogeneity from fluorescence images, examines how operational seeding behaviors shape early spatial patterns, and demonstrates how these patterns influence neuroectodermal differentiation outcomes. By integrating operational conditions, spatial indices, and biological performance, this work positions spatial heterogeneity as a measurable and controllable parameter within hiPSC culture systems.

Chapter 1 – Development of Spatial Heterogeneity Analysis Method

This chapter establishes a quantitative method for evaluating spatial heterogeneity in adherent hiPSC cultures. Four hierarchical scales—single-cell, local, regional, and global—were defined to describe the spatial organization of cell culture. Two indices were introduced: Local Heterogeneity (H_L), reflecting variation within regional areas, and Global Heterogeneity (H_G), capturing differences between regions across the vessel. Nuclear centroids were detected using a custom image-processing method, and kernel-based density maps were generated from the centroid coordinates.

The analytical scales were derived from biological measurements of hiPSC migration and elongation-based encounters, reflecting realistic interaction distances for the size of local areas. A multi-regional sampling approach, using 25 sampling positions, which was set to obtain representative estimates of vessel-level heterogeneity. In comparison with conventional descriptors, H_L and H_G provide reproducible, scale-specific measures appropriate for adherent hiPSC systems. This chapter forms the analytical foundation for the subsequent evaluation of seeding behavior.

Chapter 2 – Effect of Seeding Operation on Spatial Heterogeneity

This chapter evaluates how vessel size, early culture time, and operational handling affect

spatial heterogeneity. 6-well plates gave the most uniform distributions, while 12-well plates and 100-mm dishes showed higher H_G driven by well geometry and fluid dynamics. As cultures progressed from 2 h to 24 h, H_L decreased likely due to cell growth and migration, while H_G remained unchanged, showing that vessel-wide structure is fixed during seeding. Modifications to cell seeding operation produced distinct spatial patterns. Prolonged suspension before seeding increased H_L due to cell settling and clustering, while tilting the culture vessel after seeding increased H_G by creating directional gradients. These findings show that even small handling differences can strongly influence cell distribution, highlighting the need for careful control of seeding operations when aiming for uniform high-density cultures.

Chapter 3 – Effect of Seeding Operation on hiPSC-Neuroectodermal Differentiation

This chapter investigates how early spatial patterns influence hiPSC differentiation towards neuroectodermal lineage. Flow cytometric analysis was conducted at day 7 to assess commitment towards target cells expressed by paired box protein 6 (PAX6) marker and low expression of cytokeratin 18 (CK18). Conditions with increased H_L or H_G yielded fewer target cells and greater variability in PAX6 and CK18 expression between replicates, whereas conventional seeding produced more consistent differentiation. Although mean values were similar across conditions, the variability in marker expression shows that differentiation is sensitive to the initial cell distribution. These observations follow density-dependent mechanisms, particularly the influence of local clustering and mechanical cues on YAP/TAZ signaling and lineage fate. H_L and H_G therefore provide early indicators of process robustness and improve differentiation reproducibility.

General Conclusion and Perspective

Quality control indices were developed to quantify spatial heterogeneity after high-density seeding. This framework links seeding behavior, spatial distribution, and neuroectodermal outcomes within a Quality by Design view. Early spatial heterogeneity measures help detect operational errors and predict differentiation performance. These indices can also be integrated into automated cell manufacturing and guide interventions that improve cell distribution and process reproducibility.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (QATAN ALI AHMED ISSA)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	内山 進

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヒト誘導性多能性幹細胞（hiPSC）は、再生医療、疾患モデル構築、細胞ベース製品の開発において中核的な役割を担うが、接着性高密度培養において再現性のある結果を得ることは困難であることを問題提示している。その解決を、分化誘導時の初期播種が培養表面全体における細胞の空間分布が不均一性であることが、細胞間接触により、メカノトランスダクションが不均一に誘導され、最終的には分化決定に影響を及ぼすことを仮定している。本論文は蛍光画像から空間的異質性を定量化する構造化フレームワークを構築し、操作上の播種操作が初期空間パターンを如何に形成するか検証するとともに、これらのパターンが神経外胚葉分化結果に与える影響を実証している。

第 1 章 では、接着性 hiPSC 培養における空間不均一性を評価する定量的手法を確立し、単一細胞、局所、領域、全領域の 4 階層スケールを定義している。領域内の変動を反映する局所不均一性と、容器全体における領域間の差異を捉える全領域不均一性と 2 つの指標を導入している。局所不均一性の指標は、局所領域のサイズに即した現実的な相互作用距離を反映する、hiPSC の遊走・伸長に基づく遭遇の生物学的測定値から導出され、容器レベルの不均一性の指標は、25 箇所の画像取得位置を用いた多領域サンプリング手法を設定している。

第 2 章では、容器サイズ、初期培養時間、操作上の取り扱い方法が空間的異質性に与える影響を評価している。6 ウェルプレートでは最も均一な分布が得られたが、12 ウェルプレートと 100mm ディッシュではウェル形状と流体力学の影響により容器全体の不均一性が高く、均一な播種が困難であることを導いている。さらに、細胞播種操作の操作変更は明確に空間パターンを変化させていることを見出している。播種前の懸濁液保持時間の延長は細胞沈降・凝集により局所の不均一性を増加させ、播種後の培養容器傾斜は容器全体の不均一性を生じさせることを示している。これらの知見は、わずかな操作差異でも細胞分布に強く影響し、均一な高密度培養を目指す際には播種操作の厳密な制御が必要であることを証明している。

第 3 章では、初期の空間パターンが hiPSC の神経外胚葉系分化に与える影響を検討している。標的細胞への分化を PAX6 と目的外分化を CK18 のマーカーに注目し、局所ならびに容器全体での不均一性は、PAX6 陽性細胞の頻度が低下し、CK18 陽性細胞が増えることを示している。さらに、再現性についても検討し、均一な播種は PAX6 陽性細胞の頻度に対する変動性を低く抑えることが示された。これらの結果は密度依存性メカニズム、特に局所的クラスタリングとメカノトランスダクションが YAP/TAZ シグナル伝達および細胞運命に及ぼす影響であることを示唆している。

以上、本論文では、高密度播種後の空間的不均一性を定量化することで、その後の細胞分化誘導の不均質性に影響を及ぼすことを示し、播種後の不均一性は、工程管理指標となりうることを示した学術的に高い価値を有するものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。