



Title	Development of Ex Vivo Expansion Processes of Neural Stem Cells toward Clinical Application
Author(s)	森, 英樹
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47333
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

氏 名	もり 森 英 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 2 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学 位 論 文 名	Development of Ex Vivo Expansion Processes of Neural Stem Cells toward Clinical Application (臨床応用を指向した神経幹細胞増幅プロセスの開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田谷 正仁 (副査) 教 授 荒木 勉 教 授 野村 泰伸 助教授 紀ノ岡正博

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト神経幹細胞 (NSPCs) は、中枢神経疾患・損傷を治療するための移植用ドナー細胞として有望であるが、その臨床応用のためには、安全かつ安定な培養法による細胞量の確保が重要な課題である。本研究では、NSPCs を *in vitro* で安定に増幅させるための条件を確立し、さらにその増幅過程を観察、測定することにより得られた評価パラメーターに基づき、ヒト神経幹細胞の効率的な増幅プロセスの開発を行なった。

第一章では、ヒト NSPCs の培養における増殖条件の最適化を目指し、増殖因子の有効濃度の評価をおこなった。増殖因子の量的バランスを操作することでヒト NSPCs の効率的増殖を達成した。

第二章では、およそ 300 日間の培養におけるヒト NSPCs の増殖能の変化、およびニューロンへの分化能の変化を調べた。ヒト NSPCs の増殖能はかなり変化するものの分化能は維持され、長期培養が可能であることが示された。

第三章では、神経幹細胞の新規マーカー候補としてヒト NSPCs における ABCB1、ABCG2 たんぱく質の発現・機能評価を行った。ABCB1、ABCG2 が神経幹細胞マーカーとして利用できることが示された。

第四章では、ヒト NSPCs が形成する細胞集塊構造に着目し、新たに、細胞集塊の形態および細胞集塊内部における細胞分布の特徴を画像解析的手法により評価した。その結果、細胞集塊内部における細胞密度分布の不均一性が示された。

第五章では、細胞集塊の大きさの影響を考慮し、ヒト NSPCs の細胞集塊の大きさと細胞の倍加時間の相関関係を求めた。その結果、細胞集塊の直径の増加に伴って倍加時間の短縮が見られた。

第六章では、細胞集塊形成を速やかに誘導する培養を行ない、増殖の促進効果を試験した。その結果、細胞集塊を速やかに誘導したヒト NSPCs では増殖効率が向上した。細胞集塊形成・拡大に伴う増殖促進には Notch シグナルの関与が示唆された。

以上のように、本研究では、ヒト NSPCs の *ex vivo* 増幅における培養条件の最適化および、細胞特性の定量的評価に基づいて、新たな培養プロセスの開発へと展開した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト神経幹細胞（hNSPCs）の医療応用を最終的な目的として、hNSPCs を *ex vivo* で安定に増幅させるための条件を確立し、さらにその増幅過程から得られる評価パラメーターに基づき、hNSPCs の効率的な増幅プロセスの開発を行なったものである。

まず初めに、hNSPCs の培養に適した増殖条件の確立を目指し、種々の増殖因子を決定した。培養中における増殖因子の有効濃度を測定・制御することで hNSPCs の効率的な増殖を達成した。この結果に基づき、約 300 日間の培養における hNSPCs の増殖能の変化とニューロンへの分化能の変化を調べたところ、hNSPCs の分化能が長期にわたって維持しうることが明らかとなった。また、hNSPCs における ABCB1、ABCG2 タンパク質の発現・機能様式を解析し、これらのタンパク質が神経幹細胞の新規マーカーとして有効であることを示した。

さらに、hNSPCs の培養中に形成される細胞集塊構造に着目した。細胞集塊の形態および細胞集塊内部における細胞分布の動態を画像解析システムにより評価し、集塊内部で不均一性を示す細胞密度や細胞分化の程度を明確にする手法を確立した。また、培養中に種々のサイズの細胞集塊が形成されることから、細胞集塊の大きさと細胞の倍加時間の関係を求めた。その結果、細胞集塊の直径に依存して hNSPCs の倍加時間が変化することが分り、細胞の増殖が促進される細胞集塊サイズを規定することができた。これらの結果をふまえ、速やかに細胞集塊形成を誘導する容器を用いた培養を行い、その増殖促進効果を試験した。その結果、この培養系では hNSPCs の増殖速度が向上し、遺伝子発現解析から、この増殖促進効果には Notch シグナルが関与しているものと考察した。

以上のように、本研究は hNSPCs の *ex vivo* 増幅のための長期培養システムを確立し、さらに、細胞特性の定量的評価に基づいて培養プロセス安定化・効率化へと展開したものであり、博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。