The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	培地流れがヒトiPS細胞集塊形状・増殖に及ぼす影響に関する研究
Author(s)	加藤, 雄真
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73546
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　加藤雄真　　）	
論文題名	培地流れがヒトiPS細胞集塊形状・増殖に及ぼす影響に関する研究

論文内容の要旨

ヒトiPS細胞は幅広い分化能を持ち，細胞治療やドラッグスクリーニングへの利用が期待される．ヒトiPS細胞の応用の中でも，分化させた細胞を移植する代表的な治療法では，患者あたり1-2×10^9 cellsもの大量の細胞数が必要とされる．そのため，ヒトiPS細胞を効率良く速やかに増幅することが求められる．本研究では，ヒトiPS細胞の増幅プロセスを経る上で，液流を伴う操作が行われた時の影響を検討した．

一章では，ヒトiPS細胞の樹立と実用化に向けた進捗をまとめた．遺伝子導入して得られたヒトiPS細胞には，不均一性が見られる．また，他家移植治療を行うには，患者に応じた細胞株が必要となり，複数の細胞株のバンキングが進められている．そのため，細胞特性の異なる複数の細胞株が扱われることが想定される．ヒトiPS細胞を培養できる手法は複数あるが，これらの手法の培養特性に応じて異なる影響が細胞に及ぼされる．高い収率が保たれる手法選択・パラメータ制御・装置設計の展望を図るには，異なる細胞特性と培養特性の関係の理解が必要とされる．特に，多くの場合に細胞集塊が形成される懸濁培養では，細胞株ごとに収率が異なる．しかし，細胞集塊の特徴の理解は十分ではなく，液流を受けた細胞集塊の増殖への影響の機構と，細胞株ごとに異なる集塊の特徴の理解が必要とされる．

二章では，二次元静置培養・三次元静置培養・三次元懸濁培養の異なる3つの手法を用いた時の2つのヒトiPS細胞株の増殖を比較した．増殖を比較する際には，播種時からの培養時間に応じて初期・中期・後期に分けて増殖速度が評価し，時間依存的変化を比較した．この時，各培養手法によって，異なる増殖速度の変化が見られた．特に，三次元静置培養と三次元懸濁培養時には，細胞株ごとに顕著な違いが見られた．コラーゲンIの側面への局在が見られシェル構造のECMが形成された細胞株の集塊では，三次元静置培養時に中期まで増殖速度が高く保たれたものの，後期に低下した．しかし，三次元懸濁培養では，初期から後期まで増殖速度の低下は見られなかった．それに対して，シェル構造のECMが形成されなかった細胞株の集塊では，三次元静置培養時には後期まで増殖速度が維持された．しかし，三次元懸濁培養では，初期には増殖したものの中期以降にはほとんど増殖しなくなった．そのため，細胞集塊を覆うシェル構造のECMは，集塊の拡大の妨げになり増殖速度を低下させることが示唆された．一方で，このECM構造は液流による細胞への物理的影響を防ぎ，増殖低下を妨げることが示唆された．

三章では，機械を用いた培地交換操作によって、決まった流束を伴うヒトiPS細胞集塊の培養を行った．機械を用いた培地交換を行って培養することで，手操作の時より、ヒトiPS細胞集塊の形状は均一であった．細胞集塊の形状は，機械による培地交換時の流束を変えて培養を行った際にも，違いが生じた．そのため，細胞集塊は液流を受けることで変形したと考えられる．細胞集塊の変形は，細胞株に応じて異なった．流束が高い液流を受けても安定した形状を保った細胞株の細胞集塊は，細胞集塊中心部より表面に局在したコラーゲンIの層が観察された．そのため，このような細胞集塊は，表面を覆うシェル構造のECMによって，液流に対する安定性が向上したことが示唆された．さらに，細胞集塊の変形には，遅発的な特徴が見られた．そのため，細胞集塊は液流を受けた時，表面を覆うECMが部分的に崩れ，その後にECMが崩れた部分から細胞が遊走することで丸い形状が変化したことが示唆された．

本論文において，ヒトiPS細胞集塊の液流に対する安定性は，表面に局在したシェル構造のECM形成により左右されることが示唆された．集塊表面に形成されるECMが薄かった場合，液流を受けることでECMが崩れ，細胞遊走を経て遅発的に変形する．さらに，この変形と液流による直接の影響で，細胞同士・ECMとの接着が失われ，増殖速度が低下する．そのため，安定した高効率なヒトiPS細胞増幅には，適切なECM形成の制御が必要とされる．また，機械を用いた安定した操作により、ECM形成に対応した培養が可能となる．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　加藤　雄真　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	紀ノ岡　正博
	副 査　教授	福崎　英一郎
	副 査　教授	渡邉　肇
	副 査　教授	内山　進
	副 査　教授	村中　俊哉
	副 査　教授	大政　健史
	副 査　教授	藤山　和仁
	副 査　教授	永井　健治

論文審査の結果の要旨

ヒト iPS 細胞は、再生医療やドラッグスクリーニングなど幅広い医療分野への利用が期待される。しかし、ヒト iPS 細胞には株に応じて不均一な細胞状態が見られており、目的細胞の収率の違いが課題として挙げられる。現在でも、幅広い株に対して細胞収率が高い培養を行うことを目的として、ヒト iPS 細胞の状態に応じた培養プロセスの設計は行われていない。そこで、株に応じた制御が必要な要素を検討するために、株ごとに異なる細胞挙動と収率への培養操作の影響の理解が求められる。本研究では、ヒト iPS 細胞集塊に対する、培養工程で生じた液流による影響が着目されている。ヒト iPS 細胞集塊の増幅培養時における、株ごとに異なる細胞状態に基づいて、液流に対する安定性が比較されている。

第 2 章では、異なる培養手法を用いて 2 つのヒト iPS 細胞株が培養され、増殖速度の変化が比較されている。二次元静置培養では、ラミニンフラグメントでコート処理された培養皿中でコロニーが形成され、細胞が増殖する。2 つの細胞株は、どちらも培養初期と比較して、中期・後期に増殖速度が増加している。それに対して、細胞集塊が形成される三次元静置培養・三次元懸濁培養における増殖速度の変化が、株ごとに異なっている。三次元静置培養時には、Tic 株の増殖速度は培養後期に低下したのに対して、253G1 株は培養初期から後期にかけて増殖速度の変化が見られない。三次元懸濁培養時には、Tic 株は培養後期まで増殖し続けている。一方で、253G1 株は培養中期に増殖速度が低下し、それ以降、細胞数が増加していない。2 つの細胞株の集塊は、ECM 形成が異なっている。そのため、細胞集塊上に形成された ECM によって、集塊の拡大と液流に対する安定性に違いが生じ、増殖に影響することが示唆されている。

第 3 章では、機械を用いることで一定の流束を伴う培地交換操作が行われている。マルチウェルプレート内での培養では、機械操作の培地交換を行う事で、手操作の時と比較して均一な形状のヒト iPS 細胞集塊が得られている。さらに、機械操作時の液吐出・吸引速度を調整し、低・高流束での培地交換が行われている。低流束の培地交換で培養された細胞集塊は、高流束時より均一な形状の細胞集塊が形成されている。そのため、培地交換の液流によって細胞集塊の形状に影響が生じたことが明らかにされている。また、液流を受けた直後には変形しない細胞集塊であっても、その後 24 h の静置条件下の間に、遅発的に変形する特徴がみられている。細胞集塊の遅発的な変形は、液流によって ECM が崩れた後、細胞が遊走することで生じることが示唆されている。

以上のように、本論文はヒト iPS 細胞集塊の液流に対する安定性を評価し、集塊形状と増殖への影響を明らかにしている。これらの知見に基づくことで、不均一性が見られるヒト iPS 細胞の状態に応じた培養プロセスの設計を促進することができるため、細胞工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。