

Title	ヒト細胞集塊を用いた回転浮遊培養の特性に関する研究
Author(s)	橋田, 礼博
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/88008">https://doi.org/10.18910/88008</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 橋田 礼博 )

論文題名 ヒト細胞集塊を用いた回転浮遊培養の特性に関する研究

## 論文内容の要旨

ヒト細胞の多くは足場依存性細胞に分類されるため、接着培養を行うのが基本となるが、細胞の増幅、分化を効率よく行う、より生体内に近い細胞機能を発揮させることを目的として立体構造を有する細胞集塊を形成させて浮遊培養を行う事がある。当該培養手法は細胞集塊の浮遊のさせ方の観点から代表的なものとして浮遊静置培養、浮遊懸濁培養、回転浮遊培養の3つに分類される。その中で回転浮遊培養は1970年代にアメリカ航空宇宙局により開発された培養手法であり、「細胞集塊の重力沈降と釣り合わせるような培地流れを与え続けることにより細胞集塊の浮遊を維持する」というユニークな特性を有する。その一方で、培養における当該特性の本質的な意味や扱いは開発されて以来、今もなお不明のままであった。本研究では回転浮遊培養の持つ装置の特性と生物学的現象を結びつけるという観点に着目し、今まで未解明であった回転浮遊培養の特性とその工学的意義について明らかにした。

第1章では、回転浮遊培養の歴史と原理、そしてヒト細胞集塊の浮遊培養における位置づけについて述べた上で、当該手法の装置の特性と生物学的現象の関係が明らかになっていないことを指摘した。そして、本研究では典型的な例として複数細胞集塊群および単一細胞集塊の培養を対象とし、培養過程における現象解明を行う事で、回転浮遊培養の特性とその工学的意義について明らかにするという目的とその戦略について述べた。

第2章では複数細胞集塊群に起こる現象を明らかにするため、ヒトiPS細胞集塊の浮遊培養を研究対象とした。培地中で浮遊しているヒトiPS細胞は隣接する細胞との間で接着を持つと立体構造を有する細胞集塊を形成することが知られている。そしてこれらの細胞集塊は細胞分裂、合一、分割、崩壊といった一連の挙動によりサイズを変化させるとともに、これらの挙動は細胞増殖に影響を及ぼす重要な因子と考えられている。本章では回転浮遊培養においてヒトiPS細胞集塊群に起こる現象を反応速度論的に解釈することで、集塊挙動の特性とそれが細胞増殖に及ぼす影響を明らかにした。今回2種類のヒトiPS細胞株(253G1株, 201B7株)を用いて調査を行った結果、合一による過剰な集塊サイズ拡大および崩壊によるシングルセルの発生が細胞増殖を阻害する重要な因子であることが示唆された。さらに合一や崩壊の発生に寄与しているE-cadherinおよび細胞外マトリックスのCollagen type IおよびFibronectinの集塊外縁部における局在性が細胞株間で顕著に異なることが明らかになった。これらの結果から、合一や崩壊といった現象は集塊同士の接触や集塊構造の不安定性に起因して発生するものであり、特に前者は細胞増殖に影響を及ぼすという点で複数細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の重要な特性の1つとして考えられた。

続く第3章では単一細胞集塊に起こる現象を明らかにするためヒトiPS細胞由来心筋組織の成熟化培養を対象とした。先行研究では回転浮遊培養にてヒトiPS細胞由来心筋組織の成熟化培養を行うと、浮遊静置培養と比較して成熟化の進んだ重厚な組織が得られることが明らかになっているが、詳細のメカニズムについては不明のままであった。本章では成熟化に伴って生じる組織形態、構造変化の特性に着目し、これを切り口として回転浮遊培養における心筋成熟のメカニズムとそのトリガーとなる因子について調査を行った。その結果、回転浮遊培養では組織が縮む現象が発生し、その後遅発的に心筋成熟が進行し始めることが示唆された。この縮んだ組織の構造観察を行った結果、回転浮遊培養では培地流れが当たる組織表面にF-actinの筋状の構造および扁平した形状の核が多く認められ、さらに核ラミナのLamin A/Cの形成が顕著であることが明らかになった。これらの結果から、培地流れの影響による組織構造の空間的不均一が発生し、これをトリガーとして組織が縮む現象およびそれに続く心筋成熟が進行したことが考えられた。

第4章では第2章、第3章で明らかになった現象を元に回転浮遊培養の特性とその工学的意義についてまとめた。今回得られた結果から「細胞集塊同士の接触」や「培地流れの影響による集塊構造の空間的不均一の発生」といった因子が細胞の増幅、分化に影響を及ぼす回転浮遊培養の重要な特性であることが示唆された。当該知見は、今後回転浮遊培養における生物学的現象の解明のみならず当該特性を利用した培養技術開発にも貢献しうる点で、基礎・応用ともに今後の培養工学分野の発展に大きく寄与するものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 橋 田 礼 博 )	
	(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

本論文では、ヒト多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）を用い、回転浮遊培養にて、細胞集塊挙動の速度論的解析を行い、培養特性を解明している。ここで、回転浮遊培養は1970年代にアメリカ航空宇宙局により開発された培養手法であり、「細胞集塊の重力沈降と釣り合わせるような培地流れを与え続けることにより細胞集塊の浮遊を維持する」という特性を有する。さらに、回転浮遊培養の持つ装置的特性と生物学的現象を結びつけるという観点に着目し、今まで未解明であった回転浮遊培養の特性とその工学的意義について明らかにしている。

第1章では、回転浮遊培養の歴史と原理、そしてヒト細胞集塊の浮遊培養における位置づけについて述べた上で、当該手法の装置的特性と生物学的現象の関係が明らかになっていないことを指摘している。そして、本研究では典型的な例として複数細胞集塊群および単一細胞集塊の培養を対象とし、培養過程における現象解明を行う事で、回転浮遊培養の特性とその工学的意義について明らかにするという目的とその戦略について述べている。

第2章では複数細胞集塊群に起こる現象を明らかにするため、細胞集塊の細胞分裂、合一、分割、崩壊といった一連の挙動によりサイズが変化することに着目し、反応速度論的に解釈することで、集塊挙動の特性とそれが細胞増殖に及ぼす影響を明らかにしている。2種類のヒトiPS細胞株（253G1株、201B7株）を用いて検討を行い、合一による過剰な集塊サイズ拡大および崩壊によるシングルセルの発生が細胞増殖を阻害する重要な因子であることが示唆している。さらに、集塊の合一や崩壊の発生に寄与しているE-カドヘリンおよび細胞外マトリックスのI型コラーゲンおよびフィブロネクチンの集塊外縁部における局在性が細胞株間で顕著に異なることを明らかにしている。これらの結果から、合一や崩壊といった現象は集塊同士の接触や集塊構造の不安定性に起因して発生するものであり、特に前者は細胞増殖に影響を及ぼすという点で、複数細胞集塊群の培養における回転浮遊培養の重要な特性の1つであると結論付けている。

第3章では、単一細胞集塊に起こる現象を明らかにするためヒトiPS細胞由来心筋組織の成熟化培養を対象としている。成熟化に伴って生じる組織形態、構造変化の特性に着目し、回転浮遊培養における心筋成熟のメカニズムとそのトリガーとなる因子について検討を行っている。回転浮遊培養では組織が縮む現象が発生し、その後遅発的に心筋成熟が進行し始めることを示している。この縮んだ組織の構造観察により、回転浮遊培養では培地流れが当たる組織表面にF-アクチンの筋状の構造および扁平した形状の核が多く認められ、さらに核ラミナのラミンA/Cの形成が顕著であることを明らかにしている。以上より、培地流れの影響による組織構造の空間的不均一が発生し、これをトリガーとして組織が縮む現象およびそれに続く心筋成熟が進行したと結論付けている。

第4章では、第2章、第3章で明らかになった現象を元に回転浮遊培養の特性とその工学的意義についてまとめ、「細

胞集塊同士の接触」や「培地流れの影響による集塊構造の空間的不均一の発生」といった因子が細胞の増幅、分化に影響を及ぼす回転浮遊培養の重要な特性であることを示唆している。

以上により得られた知見、考え方は、回転浮遊培養における生物学的現象の解明のみならず当該特性を利用した培養技術開発にも貢献する点で、基礎・応用ともに今後の培養工学分野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論文として価値あるものと認める。