HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	不織布担体を用いた間葉系幹細胞の増殖培養におけるプロセス工学的研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	傅, 博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第14474号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81308
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	FU_Bo_abstract.pdf, 論文内容の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（工学）　氏名　傅　博

学 位 論 文 題 名

不織布担体を用いた間葉系幹細胞の増殖培養におけるプロセス工学的研究

近年、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）、胚性幹細胞（ES 細胞）、間葉系幹細胞（MSC）などの幹細胞を利用した再生医療、すなわち、幹細胞を増殖、分化、三次元化して得られた組織や臓器を用いた治療方法が期待されている。これら幹細胞の中で、MSC は体内から採取しやすく、高い増殖能と多くの組織の細胞に分化できる能力（多分化能）を持つことから、有望な再生医療用の細胞源として考えられている。また、MSC は移植された患者の免疫により破壊される免疫拒絶を受けにくいため、自家細胞とは異なり、同じロットの他人の細胞（同種 MSC）を大量増殖して保存しておき、多数の患者に移植し、大幅に治療期間を短縮する大量生産型の同種移植システムが可能であると考えられている。したがって、工業的事業として成立する可能性が高い再生医療の主なものには、MSC 自体及び MSC 由来の軟骨細胞を用いた同種移植が有望と考えられている。しかし、MSC を用いた同種移植では同一ロットの 1×10^{10} 個以上の大量の MSC が必要と考えられた。そこで、MSC の同種移植を実現するためには、品質を維持しながら、ドナーから採取される約 1×10^{4} 個 MSC を元にして、大量増殖培養することが重要になる。通常の実験室で使用されている直径 10 cm のポリスチレンディッシュ 1 枚で平面培養できる MSC の数が約 5.5×10^{5} 個であることを考えると、約 1×10^{10} 個の大量の細胞を提供するには約 18,000 枚のディッシュが必要なので、容易でないことが分かる。

MSC を大量増殖培養するには MSC を高密度に培養可能な培養方法が必要となる。そこで、我々は 3 次元担体である不織布に注目した。不織布は織物や編物と異なり、一本ごとに分散した繊維を熱で接着して形成され、空隙を多く含む構造がある 3 次元の繊維集合体である。不織布は体積当たりに高い表面積（旭化成製 Y-15050 の表面積：1360 cm^2/g）を有すること、また繊維と繊維との間に細胞が架橋できる空間と培地が流れる空隙があることなどの特徴があるため、不織布内で MSC は高密度に増殖できると考えた。

本研究では、高い増殖培養成績に必須な高い接着効率と高い増殖倍率を得るための不織布担体への MSC の播種方法を検討すると共に、本培養方法で得られた細胞の MSC としての品質及びそれが得られた要因を明らかにすることを目的とした。

本論文は序論および総括を含む 5 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的を明らかにした。

第 2 章は不織布を利用して MSC を大量増殖するための第一段階として、MSC を不織布ディスク（直径：15.1 mm、厚さ：0.1 mm）に播種する方法の検討を行った。その結果、播種細胞懸濁液量を不織布ディスクの空隙体積に近い 10 μL としたところ、接着効率は最も高い 64% に達した。しかし、播種した細胞が不織布ディスクの中心部に集まり、分布が不均一になり、細胞が不織布の全体に増殖できないため、増殖倍率が低かったと考えられた。この不均一を改善するために、播種 1 h 後に培地 10 μL を追加添加して、中心部に集まる細胞をより均一的に分

散させた。こうして不織布内の細胞分布を均一化することにより、増殖倍率を改善し、増殖倍率を 16 倍から 48 倍まで上げることができた（播種密度：0.15×10^3 cells/cm^2-NWF）。この時、不織布の周辺部まで細胞の分布の大きな偏りなく、細胞は繊維と繊維の間に架橋しながら、増殖している様子が SEM で観察された。

第 3 章では、MSC の大量生産に重要な要素である細胞品質を確認するため、MSC 特異表面抗原と分化能の点から、不織布培養した MSC の品質をディッシュ培養した MSC の品質と比較した。具体的には、不織布を用いて第 2 章で得られた条件で培養した細胞において、細胞表面抗原マーカーのうち、CD90 と CD166 の陽性率を確認することにした。また、その細胞の骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を確認することにした。そして、その陽性率と分化能を従来のディッシュ培養した細胞の場合と比較することにした。その結果、不織布を用いて培養した MSC の方が未分化維持に関連するマーカーである CD90 の陽性率（97.9%）が明らかにディッシュ培養した MSC の方（67.9%）より高いことが観察された。分化能について、不織布を用いて培養した MSC はディッシュ培養した MSC とほぼ同じレベルの脂肪、軟骨分化能が有するが、骨分化能については明らかに高いことが観察された。また、ディッシュと不織布で増殖した MSC のサイズを比較したところ、不織布で増殖した細胞の方が有意に小さいことから、老化が進んでいる可能性は低いと推測された。したがって、不織布で培養した MSC は増殖培養後も MSC としての品質を維持していると考えられた。

第 4 章では、不織布で培養した MSC が高い CD90 陽性率と骨分化能を持つ要因について細胞周囲の細胞外マトリックス（ECM）の量に注目し、検討した。初めにディッシュと不織布各々で培養した MSC を用いて、Triton X-100 による細胞融解、PBS 洗浄後、ECM のトリプシン分解、SDS 抽出と BCA 法によるタンパク質定量という一連の操作により、MSC 周辺の ECM 量を定量できることを明らかにした。次に、以上の ECM 定量法を利用してディッシュと不織布で増殖培養した MSC 周囲の ECM の量を定量した。培養初期と対数増殖期（0～14 日）では、不織布での繊維面積あたりの ECM 量も、細胞あたりの ECM 量も、ディッシュの場合より多かった。培養後期（14～21 日）では、ディッシュで培養した細胞周囲の ECM 量は更に増加し、不織布より高くなった。この傾向は、細胞を播種しないディッシュと不織布へ培地から吸着したタンパク質の量の経時変化と傾向が一致した。つまり、不織布で培養した細胞が長時間に豊かな ECM 環境で増殖することを明らかにした。さらに、ディッシュの底面に ECM あるいは I 型コラーゲンをコーティングし、その上で MSC を培養し、骨分化を測定した結果は、ECM あるいは I 型コラーゲンの量が多いほど、MSC の骨分化能が高くなることが強く示唆された。以上の結果より、不織布で増殖した MSC が、ディッシュで増殖した MSC と比べて著しく高い CD90 陽性率と骨分化能を持っている要因の一つとして、不織布で増殖中の細胞周囲の ECM の量がディッシュより高いことが考えられた。

第 5 章では、総括として本研究で得られた成果についてのまとめおよび今後の展望を述べた。

本研究では、細胞接着担体として不織布を利用して MSC を大量増殖培養する際に、高接着効率、高増殖倍率を得るに適した、不織布への細胞播種法を提案した。さらに、本培養方法では CD90 陽性率と骨分化能が比較的高い高品質な細胞が得られ、その要因の 1 つが細胞周辺に高密度となった ECM であることも示された。