



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 傳 博

審査担当者	主査	教授	大利 徹
	副査	特任教授	高木 睦
	副査	教授	坂口 和靖
	副査	教授	松本 謙一郎

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、同じロットの他人の細胞（同種 MSC）を大量培養して多数の患者に移植する同種移植が可能であると考えられている。しかし、MSC を用いた同種移植は同一ロットで 1×10^{10} 個以上の大量的な 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。

そこで我々は通常のディッシュ様の平面担体ではなく、3 次元担体である不織布に注目した。不織布とは、1 本ごとに分散した繊維が熱による接着によって形成された 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を有するため、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 章は不織布ディスク（直径：15.1 mm、厚さ：0.1 mm）への MSC の播種方法を検討した。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 μ L 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、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 μ L 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 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/cm²-NWF）。

第 3 章では、不織布を用いて培養した細胞の品質を CD90 陽性率と分化能の点から評価した。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（67.9 %）より高いことが観察された。また、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上に、明らかに高い骨分化能が有することが観察された。したがって、不織布で培養した MSC は 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 が高い骨分化能を持つ要因について細胞周囲の ECM 量に注目し、検討した。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 タンパク質量を定量できることを明らかにした。この方法を用いて、21 日間のディッシュと不織布の培養におけるタンパク質量を測定し、培養後期 (14-21 日) を除くと、不織布の ECM タンパク質密度の方がディッシュ上の密度に比べて有意に高いことを明らかにした。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、ECM タンパク質量が多いほど、MSC の骨分化能が高くなることが示された。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。

これを要するに、著者は、移植用のヒト間葉系幹細胞の不織布担体を用いた大量増殖方法およびその利点について新知見を得たものであり、再生医療の実用化に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。