

京都大学	博士 (工 学)	氏名	小長谷 周平
論文題目	Design of cell culture substrates for large-scale preparation of neural cells (神経系細胞を大量調製するための培養基材の設計)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、細胞移植治療の早期実現に向けて、神経系細胞を大量調製するための培養基材の設計に関する研究をまとめたものであり、序論、5章、および概要から成っている。</p> <p>序論では、中枢神経系疾患の新たな治療法として有望視されている細胞移植治療の概要および問題点を挙げ、臨床応用に向けて均一な移植細胞を大量に調製するための培養技術の確立が不可欠であると論じている。これまでに研究されてきた細胞培養基材について概説するとともに、本論文の概要を述べている。</p> <p>第1章では、基板表面に固定化された細胞増殖因子・神経栄養因子が神経前駆細胞(neural progenitor cell, NPC)の増殖・分化に及ぼす影響について検討されている。種々の細胞増殖因子や神経栄養因子について、同時平行機能解析が可能なアレイを作製し、NPCの増殖および分化環境についてスクリーニングを行った。NPCの機能制御能をもつとされている5種の細胞増殖因子や神経栄養因子(上皮細胞増殖因子; epidermal growth factor, EGF、塩基性線維芽細胞増殖因子; basic growth factor, bFGF、毛様体由来神経栄養因子; ciliary neurotrophic factor, CNTF、脳由来神経栄養因子; brain-derived neurotrophic factor, BDNF、インシュリン様増殖因子-1; insulin-like growth factor-1, IGF1)を同一基板上に並列固定したアレイ基材を作製し、その基板上でラット胎児脳組織より得たNPCを培養した。EGF固定表面あるいはEGF/bFGF共固定表面においては、細胞増殖が良好であり、それらの細胞は、高頻度にNPCマーカーのnestin発現していた。一方、CNTF、BDNFを固定した表面では、それぞれアストロサイトとニューロンへの分化が促進された。NPCを選択的に増幅するためには、EGFまたはbFGFを固定した表面が有効であることを見出した。</p> <p>第2章では、NPCを大量調製するための培養基材の設計について述べている。EGFを配向固定した培養基材を試作し、NPCを大量調製するための培養基材としての性能をNPCの増殖速度と未分化性の維持を指標として評価した。基材表面との親和性をもつペプチド配列として、オリゴヒスチジンタグ(His-tag)またはポリスチレン親和性配列をEGFのC末端に融合したキメラタンパク質を合成し、それぞれをNi²⁺を導入したガラス基板とポリスチレン製細胞培養皿へ配向固定を行った。作製した培養基材上でラット胎児脳組織由来のNPCを培養したところ、分化細胞マーカーのβ-tubulin IIIを発現する細胞はわずかしか観察されず、NPCマーカーのnestinを発現する細胞を選択的に増殖することが可能であった。また、nestin陽性細胞率は95%程度、細胞増殖速度は従来法であるニューロスフェア培養法に比べ2倍程度大きかった。高純度のNPCを調製するための培養基材を作製することができた。</p> <p>第3章では、細胞増殖因子を配向固定した基材上でのヒトNPCの選択的な増殖について述べている。EGFおよびbFGFのC末端にHis-tagを融合したキメラタンパク</p>			

京都大学	博士 (工 学)	氏名	小長谷 周平
<p>質を合成し、His-tag と基板表面に導入した Ni²⁺イオンとのキレート形成反応により、それぞれの増殖因子を単独あるいは共固定した培養基材を作製した。ヒト胎児脳組織由来の NPC を用いた細胞培養試験を行ったところ、ヒト NPC の選択的な増幅には、EGF/bFGF 共固定表面が最も適していることを見出した。EGF を単独で固定した場合、細胞接着性に乏しく、また細胞増殖速度が小さかった。一方、bFGF を単独で固定した場合、ニューロン等の分化細胞が多く出現した。EGF/bFGF 共固定表面では 90% 程度の細胞が NPC マーカーの nestin を発現し、また、ニューロスフェア培養法に比べて細胞の増殖速度が 2 倍程度大きいことを見出した。</p> <p>第 4 章では、細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM)が iPS 細胞由来の NPC の増殖に及ぼす影響について検討されている。iPS 細胞から分化誘導した NPC を効率よく増幅する <i>in vitro</i> の培養環境の構築を目指して、培養基材としての ECM の影響を調べた。9 種類の ECM (collagen I、collagen IV、gelatin、laminin-1、laminin-5、Matrigel、fibronectin、vitronectin、ProNectin F)を同一表面上に固定したアレイ基材上でマウス iPS 細胞から分化誘導した NPC を培養した。laminin-1、laminin-5 および Matrigel 上で細胞接着および細胞増殖が良好であり、それらの ECM 上で増殖した細胞は NPC マーカーの nestin を 90%程度発現していた。さらに、ヒト iPS 細胞から分化誘導した NPC が laminin 基材上で、NPC マーカーの nestin および sox1 を発現しながら増殖することを見出した。</p> <p>第 5 章では、パーキンソン病治療に対するドーパミン神経移植を念頭に置き、ドーパミン神経を大量に調製するための培養基材の設計について述べている。人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS)細胞由来ドーパミン神経前駆細胞のアガロースマイクロカプセル内での分化誘導を行った。ヒト iPS 細胞から分化誘導したドーパミン神経細胞凝集体のアガロースマイクロカプセル化を行い、<i>in vitro</i> での分化誘導と長期間の機能維持について評価した。ドーパミン神経の前駆細胞から成る細胞凝集体をアガロースゲル内へカプセル化した。カプセル化後、ドーパミン神経を成熟させた。免疫染色法により分化状態を調べると、66%の細胞がドーパミン神経マーカーの tyrosine hydroxylase 陽性であり、未分化 iPS 細胞マーカーの Oct3/4, SSEA-4 を陽性の細胞は観察されなかった。また、カプセル化細胞は、長期間にわたってドーパミン生産能を維持していた。さらには、ガラス化法を用いて、カプセル化ドーパミン神経の凍結保存が可能であった。アガロースカプセル化により、iPS 細胞から誘導したドーパミン神経が長期間にわたって <i>in vitro</i> でドーパミン産生能を維持することを見出した。</p> <p>概要では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞移植治療の早期実現に向けて、神経系細胞を大量調製するための培養基材の設計に関する研究をまとめたものであり、5章から成っている。

神経前駆細胞(neural progenitor cell, NPC)およびドーパミン神経細胞を大量調製するための培養基材の設計を目的とした。NPCの未分化性の維持および細胞増殖速度の向上に有効な培養基材として、細胞増殖因子または、細胞外マトリックスを基材表面に固定した材料設計が行われた。また、ドーパミン神経細胞の大量調製法として、ドーパミン神経細胞のアガロースマイクロカプセル化が行われた。得られた結果を以下にまとめる。

- [1] 多種の細胞増殖因子および神経栄養因子を固定したスポットをアレイ化した基板を作製し、NSCの増殖および分化環境のスクリーニングを行った。NSCの選択的な増殖には上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor, EGF)および塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)が有効であるということを見出した。
- [2] NSCを大量調製するための培養基材として、EGFを配向固定した培養基材を作製した。ラット胎児脳組織由来NPCを用いた大量培養試験を行った結果、ラットNSCがEGFを固定した基材上で選択的に増殖し、また、細胞増殖速度は従来法であるニューロスフェア培養法に比べ2倍程度大きいことを見出した。
- [3] より臨床へ近づけるために、増殖因子配向固定化技術をヒト胎児由来のNPCの選択的な増殖に応用した。EGFおよびbFGFを共固定した基材を用いることで、ヒトNPCが選択的に増殖することを可能にした。
- [4] 人工多能性幹(induced pluripotent stem, iPS)細胞由来NPCの増殖に関して、細胞外マトリックスの培養基材としての性能について検討した。ヒトiPS細胞から分化誘導したNPCが、laminin-1固定基材上で高効率に増殖することを見出した。
- [5] パーキンソン病治療に対するドーパミン神経移植を念頭に置き、ドーパミン神経を大量に調製するための培養基材の設計を試み、ヒトiPS細胞から分化誘導したドーパミン神経細胞をアガロースマイクロビーズ内へカプセル化した。カプセル化技術によりドーパミン神経の大量調製、ドーパミン産生能の長期間維持、さらには凍結保存を可能にした。

以上、本論文は神経再生に必要な細胞の大量調整に必要な環境を提供する生体高分子に関する有用な基礎的また応用的な知見を与え、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成25年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。