

(論文内容の要旨)

本論文は、幹細胞の増殖および分化を人為的に制御するための人工材料ならびに細胞周辺の微小環境の設計に関して行った研究の結果をまとめたものであり、序論、2部5章、および概要から成っている。

序論では、生体の組織内で、「幹細胞ニッチ」と呼ばれる幹細胞周辺の微小環境が幹細胞の挙動や機能に与える影響について述べ、幹細胞ニッチの理解が幹細胞の機能制御、さらには幹細胞の臨床応用において重要であると論じている。さらに、幹細胞の中でも、血液系細胞の幹細胞である造血幹細胞、ならびに造血幹細胞の近傍に存在する間葉系幹細胞は、幹細胞ニッチに着目した技術開発を行う上で、重要なターゲットであると述べている。

第1部では、造血幹細胞の増殖制御について検討されている。生体の骨髄内において、造血幹細胞の増殖は、近傍に存在する間葉系細胞によって制御される。そこで、*in vitro*において造血幹細胞を効率よく増殖させるため、生体内にみられる細胞周囲の微小環境を模倣する試みを行った。

第1章では、ヘテロな細胞集団である初代間葉系幹細胞に、不死化遺伝子を導入し、シングルセルレベルでクローン化した株化間葉系幹細胞16種類について、造血幹細胞の増殖補助能と骨芽細胞への分化能を解析している。各クローンとヒト臍帯血由来CD34⁺細胞を共培養し、未分化造血幹細胞であるCD34⁺CD38⁻細胞の数を定量することで増殖補助能を*in vitro*により評価した。その結果、クローンによって*in vitro*での増殖補助能が異なることを見出している。また、増殖補助能の高いクローンでは、Jagged-1という膜タンパク質を高発現し、かつ骨芽細胞への分化能が高いことを明らかにしている。

造血幹細胞と造血支持細胞の共培養において、それらが直接接触することが、移植の安全性という面で問題となる。そこで第2章では、前章で見出された間葉系幹細胞をアガロースゲルからなるマイクロカプセルに封入し、そのカプセルを含む培地中でヒト臍帯血由来CD34⁺細胞を培養した。比較のため、従来から高い造血支持能をもつことが知られているマウスストロマ細胞株も同様にカプセル化して実験に供した。その結果、いずれのマイクロカプセルの存在下においても、CD34⁺CD38⁻細胞が効果的に増殖することを見出した。また、その効果は、間葉系幹細胞の馴化培地を用いた場合よりも高かった。以上の結果から、マイクロカプセル化法は、造血幹細胞と支持細胞を完全に隔離した状態で、封入された支持細胞から液性因子を連続的に供給できる培養方法であることが結論付けられた。

第3章においては、造血幹細胞の増殖能を定量する簡便・迅速な手法がないことに着目し、造血微小環境を模した細胞アレイデバイスを設計した。すなわち、微細加工したシリコンシートを利用して、多数の微小ウェルをもつアレイを作製し、各ウェル内に造血幹細胞と造血支持細胞を播種した。細胞増殖阻害剤5-FUの存在

下で2日間培養することによって、増殖期にある細胞のみを薬剤で死滅させ、その後、5-FUの非存在下で培養を継続した。幹細胞は、そのニッチにおいて細胞周期が静止またはゆっくりした状態にあるため、ニッチを模した共培養環境下では5-FU処理の後にも残存し、残存した細胞をサイトカイン刺激で増殖させることで、幹細胞のみを増幅させることが可能であった。以上の結果、共培養の特性を活かすことで、造血幹細胞のみを選択的に増殖させることが可能であり、従来の方法より短期間にアッセイできることが示された。さらに顕微鏡画像解析を組み合わせることで、細胞増殖能を簡便に定量化することが可能であると述べている。

第2部では、間葉系幹細胞から派生する骨芽細胞は造血幹細胞の増殖補助能が高いこと、また、間葉系幹細胞は伸展した形態をとると骨芽細胞へと分化することから、基材表面の微細構造により間葉系幹細胞の形態制御を試みている。

第4章では、ナノスケールの表面微細加工を施した高分子基板上での細胞挙動の変化を観察している。超臨界二酸化炭素によって、ポリカーボネート基板表面を可塑化させ、ここにニッケル鋳型をプレスすることでナノスケールの微細加工を施した。これにより、表面化学的組成の均一な高分子表面を、微細構造のスケールによらず同一の手法で、離型剤を用いずに作製できたと述べている。作製した表面で間葉系幹細胞を培養した結果、10 μm 四方の凹型および凸型マイクロレンズ構造上において細胞の伸展が抑制された。一方、90 nm以上の高さを有するナノグループ構造上では細胞がナノグループに沿って配向することを見出した。また、接着斑の観察結果より、これらの現象には、細胞内骨格構造および接着斑の配向が重要な役割を果たすことが示唆された。以上の結果は材料表面のナノ加工が、細胞接着挙動を直接制御する方法として有効であることを示すと述べられている。

第5章では、ナノグループ構造上で間葉系幹細胞が配向する機序について詳細に調べるため、接着過程にある間葉系幹細胞の形態をタイムラプス顕微鏡を用いて逐次観察した。その結果、細胞配向は、細胞突起の伸展と退縮の繰り返しにより形成されることが見出された。また、細胞と基材が接着している接着斑部位の観察結果より、細胞と足場の接着性の異方性が細胞配向に大きく寄与していると述べている。これまで、微細構造上での細胞伸展の機構について、フィロポディアが接着面の微細構造を検知するという説明、あるいは、細胞の接着性が物理的形狀により変化すると説明などがなされてきたが、本章で述べられた結果は、フィロポディアの動きと細胞配向との間には直接の関連性がないことを示唆する。

概要では、本編について得られた成果を要約している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、幹細胞の増殖および分化を人為的に制御するための人工材料ならびに細胞周辺の微小環境の設計に関して行った研究の結果をまとめたものであり、2部5章から成っている。

第1部では、血液系の幹細胞である造血幹細胞の増殖制御について検討されている。生体の骨髄内において、造血幹細胞の増殖は、近傍に存在する間葉系細胞によって制御される。そこで、*in vitro*において造血幹細胞を効率よく増殖させるため、生体内にみられる細胞周囲の微小環境を模倣する試みが行われた。得られた主な結果は次の通りである。

(1) 不死化ヒト間葉系幹細胞 16 株の造血幹細胞の増殖補助能を調べたところ、その増殖補助能が細胞株により大きく異なることを明らかにした。また、その増殖補助能とその細胞株の骨芽細胞への分化能に正の相関があることを見出した。

(2) 移植する造血幹細胞に不死化ヒト間葉系幹細胞の混入は避けなければならない。前章で見出された間葉系幹細胞株をアガロースゲルからなるマイクロカプセル内に封入した後、造血幹細胞との共培養を行ったところ、カプセル化細胞から供給される液性因子が造血幹細胞を増殖させることを見出した。また、カプセル化細胞は造血幹細胞から容易に分離でき、造血幹細胞を臨床応用する上で有利である。

(3) 提供された臍帯血中の造血幹細胞の数を迅速に定量する方法として、多数の微小ウェルをもつアレイを用いた造血支持細胞との共培養法と、細胞周期阻害剤 5-FU による処理との組み合わせを提案した。本方法により、増殖能をもつ造血幹細胞を簡便かつ迅速に定量化することが可能であることを示した。

間葉系幹細胞から派生する骨芽細胞は造血幹細胞の増殖補助能が高いこと、また、間葉系幹細胞は伸展した形態をとると骨芽細胞へと分化することから、第2部では、基材表面の微細構造により間葉系幹細胞の形態制御を試みた。得られた主な結果は次の通りである。

(4) 間葉系幹細胞は、ナノスケールの周期的な凹凸 (ナノグループ) をもつポリカーボネート基板上において、グループの走行方向に沿って伸展することが示された。これには、細胞内骨格構造および接着斑の配向が関与することが示唆された。

(5) 細胞形態のタイムラプス観察を行ったところ、間葉系幹細胞は、突起の伸展と退縮を繰り返しながらナノグループ方向に配列することを見出した。その過程では、細胞と足場の接着性の異方性が大きな役割をもつことが示唆された。

以上、本論文は、幹細胞をとりまく微小環境に着目し、幹細胞の機能を制御する材料の開発に重要な基礎的知見を与え、学術上、実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 20 年 11 月 26 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。