

(様式 3 号)

学 位 論 文 の 要 旨

氏名 永井 寛之

〔題名〕 ヒト骨髄単核球の播種密度の最適化による高品質な間葉系幹細胞培養法の確立

〔要旨〕

間葉系幹細胞 (MSC) は、再生医療において有用な細胞である。MSC の培養工程の初期に、組織から抽出した単核球を培養容器に播種し、MSC の単離を行う。単離工程において、単核球の播種密度を最適化することで、単離後の MSC の収量や分化能が向上することが報告されている。しかし、単核球の播種密度が MSC の品質に影響する機構は明らかになっていない。

我々はその機構を明らかにする為、ヒト骨髄単核球を様々な播種密度 (4.0×10^4 、 1.25×10^5 、 2.5×10^5 、 6.3×10^5 、 1.25×10^6 cells/cm²) で培養し、単核球の播種密度と MSC のコロニー形成過程との関係を解析した。播種密度が高い条件 (6.3×10^5 、 1.25×10^6 cells/cm²) では、培養容器に接着した MSC 同士の距離が小さく、互いの増殖スペースが制限される為、早期に高密度に達した。一方、低い播種密度 (4.0×10^4 、 1.25×10^5 cells/cm²) では、MSC は単一細胞由来のコロニーを形成し、コロニーの直径や密度は様々な形態を示した。コロニーを継時観察したところ、高い増殖能力を持つ MSC は、培養時間の経過に伴い、全体におけるその割合が増加した。それに対して、増殖能力が低い MSC は肥大化し、老化が進行した。老化細胞は剥離処理の時間を調整することで除去できることを見出した。単核球の播種密度が低い条件で、上記機構により、増殖能が高い MSC の純度が向上することが明らかになった。この機構をもとに単離工程のパラメータを最適化し、得られた MSC の増殖能と分化能を評価した。単核球の播種密度が高い条件 (1.25×10^6 cells/cm²) と比較し、最適化した条件 (播種密度: 1.25×10^5 cells/cm²) から得られた MSC は、高い増殖能を示し、骨以外の脂肪や軟骨への分化能が有意に上昇した。

本研究により、高品質な MSC の純度を向上させる方法として、(1) 単一細胞由来のコロニーを形成させる為に単核球の播種密度を最適化すること、(2) 高い増殖能を持つ MSC の割合を増やす為に培養期間を調整すること、(3) 老化細胞を除去できる剥離処理の時間を設定することを提案する。

作成要領

1. 要旨は、800字以内で、1枚でまとめること。
2. 題名が欧文の場合は、和訳を () 書きで記載すること。

学位論文審査の結果の要旨

令和 5年 2月 17日

報告番号	甲 第 1675 号	氏 名	永井 寛之
論文審査担当者	主査教授	西川 潤	
	副査教授	山本 健	
	副査教授	野島 順三	
	副査教授	高見 太郎	
学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) ヒト骨髄単核球の播種密度の最適化による高品質な間葉系幹細胞培養法の確立			
学位論文の関連論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) Optimizing the Seeding Density of Human Mononuclear Cells to Improve the Purity of Highly Proliferative Mesenchymal Stem Cells (ヒト単核球の播種密度の最適化により高い増殖能を持つ間葉系幹細胞の純度が向上する) 掲載雑誌名 Bioengineering 第10巻 第1号 P.102 (2023年 1月掲載) 著者名 Hiroyuki Nagai, Akihiro Miwa, Kenji Yoneda, Koichi Fujisawa, Taro Takami			
(論文審査の要旨) <p>間葉系幹細胞 (MSC) は、再生医療において有用な細胞である。MSC の培養工程の初期に、組織から抽出した単核球を培養容器に播種し、MSC の単離を行う。単離工程において、単核球の播種密度を最適化することで、単離後の MSC の収量や分化能が向上することが報告されている。しかし、単核球の播種密度が MSC の品質に影響する機構は明らかになっていない。</p> <p>我々はその機構を明らかにする為、ヒト骨髄単核球を様々な播種密度 (4.0×10^4、1.25×10^5、2.5×10^5、6.3×10^5、1.25×10^6 cells/cm²) で培養し、単核球の播種密度と MSC のコロニー形成過程との関係を解析した。播種密度が高い条件 (6.3×10^5、1.25×10^6 cells/cm²) では、培養容器に接着した MSC 同士の距離が小さく、互いの増殖スペースが制限される為、早期に高密度に達した。一方、低い播種密度 (4.0×10^4、1.25×10^5 cells/cm²) では、MSC は単一細胞由来のコロニーを形成し、コロニーの直径や密度は様々な形態を示した。コロニーを継時観察したところ、高い増殖能力を持つ MSC は、培養時間の経過に伴い、全体におけるその割合が増加した。それに対して、増殖能力が低い MSC は肥大化し、老化が進行した。老化細胞は剥離処理の時間を調整することで除去できることを見出した。単核球の播種密度が低い条件で、上記機構により、増殖能が高い MSC の純度が向上することが明らかになった。この機構をもとに単離工程のパラメータを最適化し、得られた MSC の増殖能と分化能を評価した。単核球の播種密度が高い条件 (1.25×10^6 cells/cm²) と比較し、最適化した条件 (播種密度: 1.25×10^5 cells/cm²) から得られた MSC は、高い増殖能を示し、骨以外の脂肪や軟骨への分化能が有意に上昇した。</p> <p>本研究により、高品質な MSC の純度を向上させる方法として、(1) 単一細胞由来のコロニーを形成させる為に単核球の播種密度を最適化すること、(2) 高い増殖能を持つ MSC の割合を増やす為に培養期間を調整すること、(3) 老化細胞を除去できる剥離処理の時間を設定することが提案された。</p> <p>本学位論文は、高品質な間葉系幹細胞培養法を確立するため、ヒト骨髄単核球の播種密度を詳細に検討したものである。本学位論文の関連論文はインパクトファクターが 5.046 の Bioengineering 誌に受理されており、さらに、その他の論文も提出もされており、保健学専攻博士後期課程 (保健学博士) の学位論文として十分な評価ができる。</p>			