

## 審査の結果の要旨

氏名 チョードリ モハَمَّد マハフズ

胚性幹細胞(Embryonic Stem Cells; ESCs)は、自己複製能と全ての臓器細胞への多分化能を保持しているため、再生医療や薬品候補化合物の薬効・副作用の評価等への利用が期待されているが、そのためには未分化維持増殖や特定臓器細胞への分化といった ESCs の挙動を安定制御可能な培養系の開発が必須である。本論文は、ESCs の由来する受精卵が置かれた生体内微小環境に学び、細胞の自己分泌因子を有効活用すると同時に栄養素の十分な供給を確保することを意図した半透膜構造を持つ2チャンバー型のマイクロバイオリクター(MB)を提案・製作し、その未分化維持増殖や初期分化挙動に及ぼす影響を明らかにすると共に生物工学的解析を加えたもので、全5章より構成されている。

第1章は緒言であり、本研究の背景及び目的を述べている。まず、ESCs の自己分泌因子がその挙動に特に大きく影響を与えることを述べた上で、MB はその効果を増幅可能であると考えられるが、この視点での先行研究は極めて少ないことを指摘している。また、ESCs が由来する受精卵胚盤胞の内部凝集塊は、流れの無い微小空間内にありながらも、周囲の母胎から十分な栄養素の供給を受けていると述べている。そして、この微小環境を模倣するために、半透膜によって仕切られた2つのマイクロチャンバーを持つ MB—上部のマイクロチャンバーにて ESCs を培養しつつ下部のチャンバーから半透膜を介して栄養素を供給する—を提案し、本研究の具体的な目的とアプローチとを示している。

第2章では、提案した MB の製作・基礎特性の評価について述べている。MB はポリジメチルシロキサン(PDMS)を材質としたものであり、ポリエチレンテレフタレート性半透膜との結合を強固にして培養液の漏出を防止するために、半透膜の SiO<sub>2</sub> スパッタリング処理が必要であったと述べている。しかしながらこの処理は、栄養素の透過や ESCs の挙動に影響を与えなかったとしている。また、MB 培養系とマイクロプレートを用いる従来のマクロスケール培養系とについて、蛍光標識高分子を用いた拡散実験を行い、MB 内のマイクロチャンバーでは、相対的にみて拡散現象が輸送現象を規定することを示している。

第3章では、製作した MB の未分化状態の維持に及ぼす影響についての成果を述べている。まず、mouse ESCs (mESCs)について、MB 培養を用いて上部チャンバーで自己分泌因子の効果を高め、栄養素を十分に供給するために下部チャンバーのみを定期的に培地交換しつつ、白血病阻害因子(Leukemia Inhibitory

Factor; LIF)を添加した未分化維持のための培養条件下で培養を行ったところ、マクロスケール培養系に比較して、高い未分化状態が維持されたことを報告している。また、これを説明するために、自己分泌因子の阻害剤の添加実験を行い、mESCsから分泌されたBMP4 (Bone Morphogenic Protein 4)がMB培養のマイクロ空間にてLIFの作用を増強することで、未分化維持が亢進するというメカニズムを明らかとしている。さらに、マイクロチャンバー内におけるmESCsからのBMP4の分泌・チャンバー内の拡散・リセプターへの結合等を記述する数理モデルを構築し、生物学的応答の強弱の指標となる細胞あたりのBMP4結合リセプター数が、マクロスケール培養系に比べMB培養において有意に高いことを示し、実験的観測との一致を見たとしている。加えて、MB培養での高いBMP4結合リセプター数は、拡散支配の上部チャンバー内に分泌されたBMP4が細胞表層に高濃度で留まることによるのではなく、BMP4の上部マイクロチャンバー内の平衡濃度が高く保たれることよって説明可能であるとしている。

第4章では、製作したMBのESCsの三胚葉（外胚葉，中胚葉，内胚葉）への初期分化傾向への影響についての成果を述べている。第3章と同様な培養系にて、培養液からLIFを取り除くことでmESCsの自由な分化を促したところ、マクロスケール培養では主に外胚葉系細胞への分化が見られたのに対し、MB培養においては中胚葉・内胚葉系細胞への分化が促進されたこと、これはMB培養でのLIF非存在下におけるBMP4作用の増幅によること、を報告している。

第5章は総括であり、本論文全体のまとめと応用分野における意義を述べると共に、今後の展望について述べている。

以上、本論文は、今までその積極的な活用がなされてこなかったESCsの自己分泌因子に着目し、半透膜構造を持つ2チャンバー型マイクロバイオリクターを提案し製作、自己分泌因子の効果を人工的に増幅しつつ安定培養することで、mESCsの未分化維持または三胚葉のうち中胚葉と内胚葉系への分化の亢進が可能となることを示すと共に、自己分泌因子の効果亢進がマイクロ空間の拡散支配性によるのではなくその大きさ自体によることを明らかとしたものである。以上の成果は、高価な複数の増殖因子を高濃度で培養液に与えるという従来のESCs増殖分化制御法に対して、ESCsが本来保持している自己組織化能—自己分泌因子を介した自律的な運命制御能力—を、例えばマイクロ空間によって有効活用するといったより簡便かつ安価な増殖分化制御法の構築へと発展できる可能性があり、生物工学・幹細胞工学・マイクロシステム工学および化学システム工学の発展に大きく寄与するものと考えられる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。