

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	AIMI NAIM BINTI ABDULLAH
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>DIFFERENTIATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS INTO DENTAL EPITHELIAL-LIKE CELLS</p> <p>(人工多能性幹細胞の口腔上皮細胞への分化)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 柴 秀樹 教授 印</p> <p>審査委員 栗原 英見 教授</p> <p>審査委員 宿南 知佐 教授</p>			
<p>[論文審査の要旨]</p> <p>近年、歯の再生技術に関して複数の研究成果が報告されている。その多くは、分化途上にある上皮および間葉細胞を用い、発生における歯の形成過程を模倣することによって、天然の歯牙と類似した構造物を創り出そうとするものである。しかしながら、その技術の臨床応用を考えた場合、利用可能な細胞をどのように供給するかが大きな問題となっている。たとえば、口腔上皮細胞は発生過程の胚にしか存在しない。一方、上皮細胞由来エナメル芽細胞は歯の萌出後に失われる。このように、とくに口腔上皮細胞ソースの問題は、歯の再生のための実用的かつ信頼性の高い方法を確立する上で重要な課題である。</p> <p>そこで本研究では、口腔上皮細胞の供給源としての人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の可能性に焦点を当て、口腔上皮細胞を誘導するために有効な培養条件について探索されている。</p> <p>まず、本研究の前半では、各種の細胞成長因子ならびに神経栄養因子が iPS 細胞の上皮への分化に及ぼす影響についてスクリーニングが行われた。そのさい、他の研究グループによるこれまでの研究結果や歯の発生部位における分化因子などを参考にして、とくに骨形成タンパク質-2 および-4 の神経栄養因子ニューロトロフィン 4 (NT-4) の 3 つの因子について重点的に検討された。これらの因子をマウス iPS 細胞の培養液に添加し、一定期間</p>			

培養を行った後、上皮細胞に特異的なマーカー遺伝子（p63 および CK14）の発現が分析された。その結果、NT-4 が、iPS 細胞の上皮分化をもっとも効率よく促進することがわかり、その効果は NT-4 の濃度に依存して増強することが示された。一方、iPS 細胞は、NT-4 の受容体である TrkB および p75 を発現していることが RT-PCR 分析によって確認されており、いずれかの受容体の活性化を通して上皮分化を促進している可能性が示唆された。

また、上記の検討過程で、NT-4 の添加は、iPS 細胞の単層培養系に対して行うより、胚様体（Embryoid body; EB）形成過程の培養液に添加するほうが、iPS 細胞の上皮分化にとって効果的であることが示された。EB の形成によって構築される微小環境が iPS 細胞の分化を誘発すると考えられていることから、そのような効果と NT-4 による効果が相乗的に作用したものと考察されている。

本研究の後半では、NT-4 の添加および EB 形成によって上皮系にコミットされた細胞がさらに成熟する過程について注目している。EB 形成細胞をゼラチンコーティングされた培養皿上で培養すると、EB から培養皿表面に細胞の増殖が観察されたが、そのさい、血清を含む培地中で培養した場合に比べ、血清非添加培地を用いた場合のほうが敷石状の形態もつ上皮様細胞の出現頻度が高かった。さらにそれらの細胞には、口腔上皮細胞の分化マーカー（p63, CK14, CD29, CK19, ameloblastin, amelogenin, dentin sialophosphoprotein, dentin matrix protein-1, CD49f）が mRNA レベルあるいはタンパク質レベルにおいて発現していたことから、口腔上皮細胞が誘導されていることが示唆された。また、そのような分化誘導は、血清を加えた場合に比べ、血清非添加系のほうが顕著であった。さらに、以上のようにして得られた細胞を、骨分化を促進することが知られている培地中で培養し、アリザリンレッド染色を行った結果、カルシウムの沈着に基づく染色が観察された。この結果から、本研究で得られた iPS 細胞由来細胞は、口腔上皮細胞マーカーの発現のみならず、アメロブラストに類似した機能を有することが示唆された。

以上の研究結果をもとに、NT-4 添加培地中での EB 形成、およびその後の血清非添加培地中での接着培養によって口腔上皮細胞を効果的に誘導できるものと結論されている。本研究で見出された培養方法は、歯の再生技術の実用化にとって大きな一歩になるものと考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。