

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	赤木 恵理
学位授与の要件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
センダイウイルスを用いたインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での末梢血単核球由来人工多能性幹細胞の樹立に関する研究			
論文審査担当者			
主査	教授 柴 秀樹	印	
審査委員	教授 宿南 知佐		
審査委員	准教授 嶋本 顕		
〔論文審査の要旨〕			
<p>一般に胚性幹細胞や人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell:iPSC)は、フィーダー細胞上で血清添加培地を用いて培養・維持されている。血清やフィーダー細胞由来因子には、多くの成分不明蛋白などが含まれており、細胞の増殖・分化を制御する各種因子の正確な検討は困難である。本研究の先行研究で全組成の明らかな hESF9 無血清培地を用いて、フィーダー細胞を用いずヒト線維芽細胞や歯髄細胞からレトロウイルスベクター(RvV)を用いてヒト iPSC (hiPSC) 誘導および長期培養が可能であることを報告した。</p> <p>一方、RvV は染色体への初期化遺伝子の残存のため腫瘍化のリスクが高いことから、宿主遺伝子への遺伝子挿入の無い誘導法の確立が必要不可欠である。また、疾患特異的 hiPSC を樹立するためには、より低侵襲で簡便に採取可能な末梢血由来単核球(PBMC)からの hiPSC(PBMC-hiPSC) 誘導法を早急に確立する必要がある。</p> <p>本研究では、成分の明らかな hESF9 を用いた無血清・無フィーダー培養系で、宿主遺伝子への遺伝子挿入のないセンダイウイルスベクター(SeV)を用いて、PBMC -hiPSC 誘導法および長期培養系を確立することを目指した。</p> <p>SeV として、毒性の低い持続感染変異センダイウイルス Clone151 株から、ウイルス複製能を欠失させ、同一ベクター上に初期化 4 遺伝子(Klf-4, Oct3/4, Sox2, c-Myc) を搭載可能な SeVdp (KOSM302L) を用いた。健常人由来末梢血から比重遠心法を用いて PBMC を分離し、IL-2 を含む無血清培地 RD6F(RD 基礎培地に insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite および oleic acid を添加) を用いて 6 日間培養を行った。培養後、SeVdp (KOSM 302L) を、MOI=3 あるいは 6 の条件で感染させ、6well プレート 1 well あたり <math>1.0 \times 10^5</math>, <math>2.0 \times 10^5</math>, <math>5.0 \times 10^5</math> の細胞密度で細胞を播種した。細胞外マトリックス(ECM)として、laminin-E8, fibronectin, type I collagen, および gelatin を検討した。また、IL-2 添加 RD6F での PBMC 培養日数を 0, 3, 6 日で</p>			

検討した。無血清培地として hESF 基礎培地に insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite, oleic acid (遺伝子組換えヒトアルブミン結合), L-Ascorbic acid 2-phosphate, FGF-2 およびヘパリンを加えた hESF9 を用いて PBMC-hiPSC の誘導を行った。対照細胞として、血清添加培地を用いフィーダー細胞上で誘導・維持した PBMC-hiPSC を用いた。

各条件での PBMC-hiPSC の誘導効率は、播種細胞あたりの alkaline phosphatase (ALP) 陽性コロニー数を指標にした。誘導した PBMC-hiPSC の未分化能は、各種未分化マーカー遺伝子 (Oct3/4, Nanog, Sox2, Rex1) を RT-PCR 法で、未分化蛋白 (Oct3/4, Nanog, SSEA4, Tra-1-81) を蛍光免疫染色法にて検討した。また、分化多能性は、胚様体形成後、gelatin 上で 3 週間培養後に蛍光免疫染色法にて、神経系マーカー (Nestin, MAP-2), 中胚葉マーカー ( $\alpha$ -smooth muscle actin), 内胚葉マーカー ( $\alpha$ -fetoprotein) の発現を検討した。さらに、免疫不全 (SCID) マウス背部皮下移植系での、PBMC-hiPSC の teratoma 形成能および 3 胚葉への分化能を組織学的に検討した。また、PBMC-hiPSC の染色体解析および short tandem repeats (STR) 解析を行った。

(広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認研究計画：第 58 号)

その結果、以下のことが明らかとなった。

1. SeVdp (KOSM302L) を用いて、フィーダー細胞を用いることなく無血清条件下に PBMC-hiPSC の樹立・長期維持に成功した。
2. PBMC-hiPSC は未分化性と分化多能性を有していた。
3. ALP 陽性コロニー数を指標に誘導効率を検討したところ、無血清・無フィーダー条件と血清添加及びフィーダー細胞上での培養条件のいずれにおいても MOI=6 および細胞播種密度  $1.0 \times 10^5$ /well の条件で最も高い誘導効率を示した。
4. 各種 ECM の誘導効率に及ぼす影響を、4 個体の PBMC で検討した結果、laminin-E8 では平均 0.045% (0.008%-0.1%), fibronectin, 0.018% (0%-0.06%), type I collagen, 0.016% (0%-0.063%), gelatin, 0.003% (0%-0.012%) で、laminin-E8 上で最も高い誘導効率を示した。
5. IL-2 添加 RD6F での PBMC の培養日数の誘導効率に及ぼす影響を 0, 3, 6 日で検討した結果、無血清・無フィーダー条件では 0 日で 0.024%, 3 日, 0.051%, 6 日, 0.0033%, 血清添加及びフィーダー細胞上での培養条件では 0 日で 0%, 3 日, 0.0035%, 6 日, 0.0025% と低値を示した。
6. PBMC-hiPSC では SeVdp の残存は認めなかったことから、導入に使用した SeVdp は完全に除去されていることが明らかとなった。
7. STR 解析の結果、PBMC-hiPSC は誘導前の PBMC 由来であることが確認された。

以上の結果から、少ない侵襲で容易に細胞採取ができる PBMC から、本 SeVdp・無血清・無フィーダー培養系を用いた hiPSC の誘導は、より安全で標準化された hiPSC の樹立とその応用研究に寄与すると考えられた。また、本培養系を用いて、種々の疾患特異的 hiPSC を樹立することで、病態解明や治療法の開発に寄与すると考えられた。

本論文は、口腔外科学をはじめ歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。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あるものと認めた。

