

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	向笠 英恵
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項・2 項該当		
論文題目			
鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) 患者歯髄細胞由来疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の単層無血清培養系での樹立およびその細胞特性に関する研究			
論文審査担当者			
主 査	教授 宿南 知佐	印	
審査委員	教授 栗原 英見		
審査委員	准教授 嶋本 顕		
〔論文審査の要旨〕			
<p>近年の人工多能性幹 (iPS) 細胞研究は、発生生物学や創薬・疾患研究のみならず、再生医療研究分野においても注目されている。さらに種々の遺伝性疾患の発症機序や治療法を解明する上で、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究も期待されている。本研究では、Runx2 (Cbfa1) の変異により発症する常染色体優性遺伝性で、顎顔面口腔領域を含めた骨・軟骨・歯の分化異常を示す、鎖骨頭蓋異形成症 (Cleidocranial Dysplasia : CCD) 患者の歯髄由来細胞 (Dental Pulp Cell: DPC) から、無血清培地 hESF9 を用いてフィーダー細胞を用いることなく疾患特異的ヒト iPS 細胞を誘導し、その細胞特性解析を行った。</p> <p>広島大学病院顎・口腔外科を受診し、同意の得られた CCD 患者および健常人患者の抜去歯牙の歯髄組織より無血清培養系で分離培養した DPC より誘導した iPS 細胞 (CCD-iPS, DPC-iPS) を、約 30 日間継代培養後、濃縮可能なレトロウイルス産生株 293GPG およびレトロウイルスの 15 倍濃縮液を使用し、初期化 4 遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc) を感染させた。感染 5 日後に fibronectin 上に播種し、hESF9 培地を用いて、フィーダー細胞や動物由来成分や代替血清を用いることなく、全過程を通じて無血清培養系にて CCD-iPS 細胞の誘導を行った (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 : 第ヒ 58 号)。control として国立成育医療センターにて樹立されたヒト iPS 細胞株 Tic (JCRB1331) を用いた。CCD-iPS における各種未分化マーカー遺伝子および蛋白の発現を、RT-PCR 法および蛍光免疫染色法にて検討した。また、多分化能を検討するため、分化誘導培地を用いて低吸着プレート上に播種し、3 日間胚様体形成後、ゼラチンコート上に播種し培養 2 週後に蛍光免疫染色法に</p>			

て各種分化マーカー蛋白の発現を解析した。さらに、CCD-iPS を免疫不全マウス (SCID mouse) の背部皮下に移植し、**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、CCD-DPC および CCD-iPS の STR 解析ならびに DNA シークエンス解析にて **Runx2** 遺伝子の変異解析を行った。

次に、iPS 細胞をコラーゲンコート上に播種し、骨分化培地 (Lonza®) を用いて 4 週間培養後、2、3、4 週ごとに RNA を採取し、**Droplet Digital PCR (ddPCR)** にて各分化マーカー遺伝子の発現解析並びに **Alizarin Red** 染色および **Alkaline Phosphatase** 染色を行った。また、CCD-iPS、DPC-iPS および **Tic** を低吸着プレート上に播種し、軟骨分化培地 (Lonza®) を用いて胚様体形成を行い、胚様体における遺伝子発現を ddPCR にて解析するとともに、**H-E** および **Alcian Blue & PAS** 染色にて組織学的に検討した。その結果以下のことが明らかとなった。

1. 無血清培地 **hESF9** を使用し、**fibronectin** 上に播種することで、フィーダー細胞を用いることなく CCD-DPC 由来 iPS 細胞の樹立に成功した。
2. CCD-iPS 細胞は、未分化能と多分化能を有していた。
3. CCD-iPS 細胞は、STR 解析の結果、CCD-DPC 由来であることが確認された。
4. DNA シークエンス解析の結果、CCD-DPC および CCD-iPS 細胞の **Runx2** 遺伝子変異解析では、いずれの細胞においても **exon3** の **coding sequence** の 674 塩基目のグアニンがアデニンに変異しており、225 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンへ置換していることを示唆していた。
5. CCD-iPS 細胞を骨分化誘導し、骨分化の指標である **Alizarin red** 染色および **Alkaline Phosphatase** 染色を行ったところ、control (**Tic** および **DPC-iPS**) と比較し、染色強度が低下していた。
6. CCD-iPS 細胞を軟骨分化誘導し、**Alcian Blue & PAS** 染色を行ったところ、control (**Tic** および **DPC-iPS**) と比較し、**Alcian Blue** 陽性の細胞が低下していた。
7. ddPCR 解析の結果、骨・軟骨分化誘導時に、CCD-iPS 細胞では control (**DPC-iPS**) と比較し、骨分化および軟骨分化マーカー遺伝子発現低下を認めた。
8. **Testis** 内移植系および背部皮下系のいずれにおいても、CCD-iPS 細胞由来テラトーマにおける軟骨組織は、control (**Tic** および **DPC-iPS**) 由来テラトーマでのそれと比較して、組織学的に肥大軟骨様を呈したことから、CCD-iPS 細胞由来の軟骨組織では軟骨成熟速度が速いことが示唆された。

以上の結果から、CCD-iPS 細胞は、未分化性と多分化能を有しており、骨・軟骨分化誘導時に疾患個体で認められる各種分化マーカー遺伝子や蛋白の発現低下を示したことから、CCD の病態を反映する疾患特異的細胞モデルとして有用であると考えられた。本培養系を用いて、CCD を含めた種々の遺伝性疾患特異的 iPS 細胞を樹立することで、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。