

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	福谷 多恵子
学位授与の条件	学位規則4条第①・2項該当		
論文題目 Genetic diagnosis of Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease) and establishment of NF1-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study of disease mechanisms.  Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease)の遺伝子診断および同疾患特異的 induced pluripotent stem cells (iPSCs)のインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での樹立による疾患研究			
論文審査担当者			
主査	教授	谷本幸太郎	印
審査委員	教授	藤井万紀子	
審査委員	准教授	虎谷 茂昭	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【目的】 Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease) (NF1)は神経線維腫、カフェオレ斑などの皮膚病変を主症状とし、骨、眼、神経系などに様々な病変を生じる常染色体性優性の遺伝性疾患である。NF1の病原変異遺伝子は17番染色体長腕に位置し、その遺伝子産物 Neurofibromin (NF)は癌抑制遺伝子として機能していると考えられているが、NF1蛋白は約250kDaと長大なためその発症機構は不明な点が多い。一方、このような遺伝性疾患の発症機構を解明するため、疾患特異的 iPSC を用いた研究の有用性が注目されている。</p> <p>本研究では、NF1と臨床診断された2例に対して Next Generation Sequencing (NGS)法などを用いて遺伝子解析を行うとともに、センダイウイルスベクター (SeVdp)、完全無血清及びフィーダー細胞フリーの培養系で、NF1由来末梢血リンパ球 (PBMC)から NF1 特異的 iPSC (NF1-iPSCs)の樹立・長期維持を試みた。さらに、各 iPSCs の分化に伴う <i>NF1</i> 遺伝子及び蛋白発現を検討し、疾患病態モデルとしての可能性を検討した。本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究承認研究（第ヒ58,72号）に基づいて行った。</p> <p>【患者概要】患者1 (NF1-1)：37歳男性。2013年9月当科初診。15歳時にNF1の臨床診断を受けていた。初診時、顔面、背面等に神経線維腫及びカフェオレ斑、著明な下顎骨吸収及び病的骨折を認めた。先天性脛骨欠損及び脊椎側弯症があったが、家族歴はなかった。</p> <p>患者2 (NF1-2)：48才女性。2015年5月当科初診。24歳時にNF1と臨床診断を受けていた。初診時、前腕・背部に神経線維腫及びカフェオレ斑を認めた。顎骨異常はなかった。右拍動性眼球突出に対し眼窩後壁骨欠損部再建術の既往があったが家族歴はなかった。</p> <p>【方法】 NGSには、次世代シーケンサーMiSeqを使用し、TrusightOne疾患パネル (illumina社)を用いて、患者PBMC及びNF1-iPSCs由来DNAの4813遺伝子の全exonの塩基配列を網羅的に解析した。また、<i>NF1</i>の染色体上でのコピー数を Comparative Exome Quantification analyzer (CEQer)にて解析し、さらに標的遺伝子の絶対発現量を droplet digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)法で</p>			

検討した。

各 PBMC を RD6F+IL-2 無血清培地で 6 日間培養後、laminin 処理 6 well plate に  $1 \times 10^5$ /well で播種し、SeVdp (KOSM) 302L を MOI=6 で 2 時間感染させた。iPSC 誘導効率は alkaline phosphatase 陽性コロニー数で評価した。各 NF1-iPSCs の *in vitro* での未分化性及び分化多能性は、未分化遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox-2*, *Rex1*) 及び蛋白 (*Oct3/4*, *Nanog*, *SSEA-3*, *SSEA-4*, *Tra-1-60*, *Tra-1-81*) 発現を Revers Transcription-PCR (RT-PCR) 法及び蛍光免疫染色法で検討した。分化多能性は、胚様体形成法及び免疫不全 (SCID) マウス背部皮下での teratoma 形成能にて検討した。さらに、各 iPSCs の未分化及び三胚葉への分化誘導時の NF1 遺伝子・蛋白発現を ddPCR 及び western blotting 法で検討した。また、神経分化過程での各種分化マーカー発現、Ras/MAP シグナル分子 ERK のリン酸化、さらにペレット培養法での軟骨分化誘導後、SCID マウス背部皮下移植による軟骨・骨分化能についても比較検討した。

【結果】 NF1-2 では、*NF1* の exon 40 に C から T への一塩基変異 (rs137854552 C>T) を認め、同変異は arginine の stop codon への置換を示唆した。NF1-1 では、*NF1* に明らかな変異を認めなかったが、CEQer の結果、17 番染色体長腕 *NF1* 領域の read coverage が広範囲にわたり半減し、さらに ddPCR 解析で *NF1* のコピー数も半減していた。NF1-1-hiPSC 及び NF1-2-hiPSC の誘導効率はそれぞれ 0.124% 及び 0.088% であった。いずれの NF1-iPSCs も未分化遺伝子・蛋白を発現し、さらに *in vitro* 及び *in vivo* で三胚葉への分化多能性を有していた。両 NF1-iPSCs とも未分化状態では、NF1 遺伝子・蛋白発現は著しく低値を示したが、分化に伴い上昇した。分化した NF1-1-iPSCs における NF1 mRNA 発現は WT-iPSC のそれと比較し半減していたが、NF1-2-iPSC では差を認めなかった。一方、両 NF1-iPSCs の NF1 蛋白発現は WT-iPSCs の約 1/2 に減少していた。また、神経分化に伴い、WT-iPSC と比較して両 NF1-iPSCs では早期に S-100 陽性細胞が出現し、さらに ERK リン酸化も維持あるいは上昇傾向を示した。さらに、*in vitro* 及び *in vivo* での軟骨・骨分化誘導の結果、NF1-1-iPSC は WT-iPSCs に類似した骨分化を示したが、NF1-2-iPSCs では骨分化が遅延していた。

【結論】 無血清及び無フィーダー培養系を用いて、NF1-iPSCs の樹立及び長期維持に成功した。2 症例の NF1 間で臨床症状や経過が大きく異なるのは、*NF1* 変異の質的差異を反映している可能性が示唆された。また、各 NF1-iPSCs においても *NF1* の欠失や変異は維持されており、さらに神経分化や軟骨・骨分化能にも差を示したことから、NF1 の分子・細胞レベルでの病態解明や、疾患モデルとして創薬スクリーニングへの応用や治療法の開発研究に有用であると考えられた。

本論文は先天性疾患及び癌研究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があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	福谷多恵子
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Genetic diagnosis of Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease) and establishment of NF1-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study of disease mechanisms.  Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease)の遺伝子診断および同疾患特異的 induced pluripotent stem cells (iPSCs)のインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での樹立による疾患研究			
最終試験担当者			
主査教授	谷本幸太郎	印	
審査委員 教授	藤井万紀子		
審査委員 准教授	虎谷 茂昭		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年6月7日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成29年8月10日に開催した本委員会での最終試験では主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Neurofibromin 1 (NF1) 遺伝子及び蛋白の構造・機能について</li> <li>2. NF1 遺伝子の変異と Neurofibromatosis type 1 (NF1) の発症機序及び臨床症状との関連性について</li> <li>3. 健常人及びNF1 特異的 iPSC の誘導効率と各 iPSC における NF1 遺伝子・蛋白発現の差異について</li> <li>4. NF1 特異的 iPSC から分化誘導された軟骨・骨組織と臨床症状との関連性について</li> <li>5. 疾患特異的 iPSC を用いた疾患研究の展開とその臨床応用の可能性について</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			