

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	大西 梓
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Optimization of culture conditions for the efficient differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into dental epithelial-like cells (マウス iPS 細胞から歯原性上皮細胞様細胞への高効率な分化誘導を目的とした培養条件の最適化)			
論文審査担当者			
主査	教授 柴 秀樹	印	
審査委員	教授 兼松 隆		
審査委員	教授 杉田 誠		
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>生体内の多くの器官は上皮間葉相互作用を契機として形成される。このような上皮間葉相互作用を人為的に再現することによって種々の器官を作製しようとする試みがなされている。歯科領域においても、歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞の共培養により再生歯胚の作製が可能であるとの報告があり、歯の再生療法を実現する基盤技術として注目されている。しかしながら、歯原性上皮細胞は歯の萌出とともに消失し、ヒトの成体にはほとんど存在しないため、新たな細胞ソースの探索が大きな課題となっている。このような背景のもと当研究室では、マウス人工多能性幹細胞（miPS 細胞）から歯原性上皮細胞を分化誘導する方法について検討を重ねてきた。その結果、胚様体形成によって miPS 細胞の分化を促進するとともに、神経栄養因子の一種である neurotrophin-4 (NT-4) を作用させることによって、歯原性上皮細胞特有の遺伝子（CK14, p63, CD29, CK19, ameloblastin, amelogenin, dentin sialophosphoprotein, dentinmatrix protein-1, CD49f）を発現する細胞（歯原性上皮細胞様細胞）が誘導されることを見出した。</p> <p>本研究では、miPS 細胞から歯原性上皮細胞様細胞を効率よく誘導する方法の確立を目的として、分化誘導培養条件の最適化に取り組んだ。とくに、胚様体形成時の細胞播種密度および上皮成長因子（epidermal growth factor: EGF）の添加が歯原性上皮細胞様細胞形成に及ぼす効果について検討した。歯原性上皮細胞様細胞への分化の指標には、iPS 細胞から種々の上皮細胞への分化の指標として用いられている cytokeratin 14 (CK14) および p63、全エナメルタンパクのおよそ 90% を占め、さらに歯の発生過程において他のエナメルタンパクに先行して帽状期より mRNA の発現を認める amelogenin (AMG) の 3 つを用いた。</p> <p>1、異なる数の miPS 細胞を用いて胚様体培養を行い、胚様体形成頻度を求めた。また、得られた胚様体の直径を計測することによって、それらの成長速度を比較するとともに、定量的 PCR 法によって歯原性上皮細胞マーカーの発現量を比較した。</p> <p>2、EGF を添加した培地を用いて胚様体培養およびその後の接着培養を行い、歯原性上皮細胞マーカーの発現量を調べた。</p> <p>3、胚様体形成時の EGF 添加が歯原性上皮細胞様細胞への分化を促進させるメカニズムを解明するため、EGF 添加に伴う胚様体成長速度への影響を調べた。また、ウェスタンブロッティング法によって、EGF が TrkB 受容体のリン酸化に及ぼす影響について調べた。</p> <p>1、500, 1000, 1500, 2000 個の miPS 細胞を用いて胚様体培養を行った結果、細胞数 500 及び 1000 個の場合に高い再現性で胚様体が形成された。また、初期細胞数を 500 及び 1000 個とした場合、胚様体の直径は時間とともに増大し、6 日後に約 1.4 倍になった。さらに初期細胞数 1000 個では 500 個と比較して、CK14 及び p63 の遺伝子発現量が有意に亢進し、AMG も増加傾向を認めた。以上の結果から、</p>			

歯原性上皮細胞様細胞の分化誘導には胚様体形成時の播種細胞数を 1000 個とすることが最適であることがわかった。

2、NT-4 存在下における胚様体形成時に EGF を作用させると歯原性上皮細胞マーカー遺伝子の発現が亢進した。しかしながら、その後の接着培養時に EGF を添加しても、それらの遺伝子発現には影響がなかった。これらの結果から、胚様体形成時に NT-4 と EGF を同時に作用させることにより歯原性上皮細胞様細胞への分化が促進されることがわかった。

3、胚様体の直径を計測した結果、EGF 添加群と非添加群の間に有意な差は認められなかったことから、EGF が細胞増殖には寄与しないことがわかった。一方、miPS 細胞の単層培養系に EGF のみを作用させた場合にも TrkB のリン酸化の亢進が認められた。この結果は、EGF による TrkB 受容体のトランスアクチベーションに基づくものと推測される。このような EGF による TrkB シグナルの増強が、歯原性上皮細胞様細胞への分化誘導効率の向上に寄与しているものと思われる。

以上のことから本論文では、播種細胞数を 1000 個に設定し、NT-4 および EGF の存在下で胚様体培養を行うことによって、歯原性上皮細胞様細胞への分化誘導効率が向上することが明らかとなった。また、EGF 添加による分化誘導効率の向上は、EGF による TrkB シグナルの増強に起因するものと考えられた。

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	大西 梓
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Optimization of culture conditions for the efficient differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into dental epithelial-like cells (マウス iPS 細胞から歯原性上皮細胞様細胞への高効率な分化誘導を目的とした培養条件の最適化)			
最終試験担当者			
主査	教授 柴 秀樹	印	
審査委員	教授 兼松 隆		
審査委員	教授 杉田 誠		
〔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30年12月26日の第7回広島大学研究会発表会（歯学）および平成31年2月12日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Neurotrophin-4 (NT-4) の作用期間の設定根拠および分化に果たす役割について 2. Epidermal growth factor (EGF) の添加時期の違いが分化誘導効率を変化させる様式について 3. 増殖・分化制御における NT-4 と EGF シグナルのクロストークについて 4. NT-4 と EGF による TrkB リン酸化の反応経過とその役割について 5. TrkB に結合できる Brain-derived neurotrophic factor および NT-4 の作用の相違について 6. 結果の解釈と統計処理方法について <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およ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>			