

学 位 論 文

基底細胞母斑症候群 (NBCCS)の遺伝子解析及び
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
NBCCS 特異的 induced pluripotent stem cells (iPSCs)の樹立研究

学位申請者 中瀬 洋司

(指導教員：岡本 哲治 教授)

2019 年度

第一章 緒言

第二章 NBCCS と臨床診断された患者の遺伝子診断と NBCCS 患者由来疾患特異的 induced pluripotent stem cell (iPSC) の樹立

第一節 NBCCS と臨床診断された患者の遺伝子診断の材料及び方法

1. 散発性患者及び家族性患者の表現型
2. 遺伝子診断
 - 2-1. 患者組織からの DNA 抽出
 - 2-2. Polymerase Chain Reaction -Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) 法を用いた *PTCH1* の各 exon における変異の有無の解析
 - 2-3. NBCCS におけるサンガーシーケンス法を用いた変異部位の検討
 - 2-4. 次世代シーケンサーMiseq を用いた Next generation sequence (NGS)法による網羅的遺伝子解析

第二節 NBCCS 患者由来疾患特異的 iPSC 樹立の材料及び方法

1. 材料
 - 1-1. 細胞培養液
 - 1-2. センダイウイルスベクター
2. NBCCS 患者由来 iPSC (NBCCS-iPSC) の樹立
 - 2-1. NBCCS-iPSC の誘導
 - 2-2. NBCCS-iPSC の特性解析
3. 家族性 NBCCS-iPSC を用いた疾患モデルの作成
 - 3-1. 誘導した家族性 NBCCS-iPSC の *PTCH1* 変異解析
 - 3-2. 胚様体 (Embryo Body: EB)分化検討
 - 3-3. ケラチノサイトへの分化検討

3-4. 軟骨分化誘導検討

第三章 結果

第一節 NBCCS と臨床診断された患者の遺伝子診断

1. PCR-SSCP

2. NBCCS-PBMC におけるサンガーシーケンス法を用いた変異の検討

3. 次世代シーケンサーによる先天性疾患関連遺伝子の網羅的遺伝子変異解析

第二節 NBCCS 患者由来疾患特異的 iPSC の樹立

1. NBCCS-iPSC の誘導

2. NBCCS-iPSC の特性解析

3. 家族性 NBCCS-iPSC を用いた疾患モデルの作成

3-1. 家族性 NBCCS-iPSC の *PTCH1* 変異解析

3-2. EB を用いた検討

3-3. ケラチノサイトへの分化誘導

3-4. 軟骨分化誘導

第四章 考察

第五章 総括

参考文献