

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	山内 優佳
学位授与の条件	学位規則第4条第①、2項該当		
論文題目 Epidermal growth factor-immobilized surfaces for the selective expansion of neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells (iPS細胞由来神経前駆細胞の選択的増殖に有効な EGF-His 固定化基材の作製)			
論文審査担当者			
主査	教授 河口 浩之	印	
審査委員	教授 宮内 睦美		
審査委員	准教授 武知 正晃		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>慢性脊髄損傷やパーキンソン病、アルツハイマー病などの中枢神経変性疾患は、中枢神経に再生能力がないため不可逆的であり、その有効な治療法は現在のところ確立されていない。近年、再生医療研究の進展に伴い、神経前駆細胞（NPC）を移植する治療方法が注目を浴びている。NPC は自己複製能と、ニューロン、グリア細胞、オリゴデンドロサイトに分化する能力を有している。しかしながら、成人において NPC は脳室体などの一部にしか存在せず、細胞移植のための NPC を得ることは難しい。そのような背景で、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から分化誘導された NPC を用いたパーキンソン病や脊髄損傷に対する細胞移植療法が注目され、臨床研究も開始された。</p> <p>今後、以上のような iPS 細胞を活用した中枢の再生治療を普及させるには、移植に用いる NPC を効率よく製造するための方法が確立されなくてはならない。そこで本研究では、iPS 細胞から誘導される NPC を迅速かつ選択的に増殖させることが可能な培養基材の設計を目的とした。</p> <p>基材設計にあたって、上皮成長因子（EGF）が NPC の増殖を促進することに着目し、EGF を表面に固定した培養基材を設計した。EGF の C 末端に 6 残基の histidine からなるペプチドを融合させた EGF-His を大腸菌発現系によって合成した。金を蒸着したガラスプレート表面に、11-mercapto-1-undecanol 及び 11-mercapto-1-undecanoic acid の混合溶液を用いて、最表面に OH 及び COOH をもつ自己組織化単分子膜（SAM）を形成させた。その際、2 種類のアルカンチオール混合比を変化させることで、それらの官能基の表面組成を制御した。次に、混合 SAM 表面上に <i>N</i>-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid 及び NiSO₄ を介して EGF-His をキレート固定し、培養基板を得た。EGF-His の固定量を micro BCA protein assay を用いて測定した結果、COOH の表面密度に関わらず 0.40~0.55 µg/cm² の EGF-His が固定化されたことがわかった。しかしながら、非特異的に吸着した EGF-His の表面密度は COOH 含有率 50% の基板において最も少なかった。この結果を踏まえ、その後の実験においては COOH 含有率 50% の基板を使用した。</p> <p>一方、NPC はマウス iPS 細胞からニューロスフェア培養によって誘導した。マウス iPS</p>			

細胞をフィーダー細胞上で維持培養し、GFP の発現により未分化性の維持を確認した。単個細胞に分散させた後、Pluronic F127 でコートして表面を親水化させた培養皿に播種し、2% B27、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、および 10 nM retinoic acid を添加した DMEM/F-12 培地中にて 6 日間ニューロスフェア培養を行った。得られた直径 100~200 μm の細胞凝集体（ニューロスフェア）を回収した。回収されたニューロスフェアを再度分散、播種した。細胞の凝集と分散を 4 回繰り返す、継代ごとに細胞数の計測を行った。分化が進むにつれて細胞増殖率は徐々に低下し、第 4 世代ではほとんど増殖が認められなかった。また、細胞内に発現する NPC マーカー等の発現を定量 PCR 法により分析した結果、未分化マーカーである Nanog 及び Oct3/4 は継代が進むにつれて減少した。また、NPC マーカーであるネスチン及び EGF 受容体 (EGFR) の発現は継代を繰り返すことで増加し、第 3 世代において最大となった。この結果は、継代を繰り返すことで分化が進み、NPC の含有率が上昇したことを示唆する。さらにフローサイトメトリーによって第 3 世代における EGFR の発現を分析したところ、全体の 23.2%の細胞が EGFR 発現細胞であった。以上の結果を踏まえ、EGF-His 固定化基材の評価には第 3 世代の細胞を用いた。

第 3 世代の NPC を単個細胞に分散し、EGF-His 固定化基板上にて培養した。その結果、NPC は神経突起を伸展しながら増殖し、特徴的な二次元網目状構造を形成した。一方、ポリスチレン製培養皿には NPC の接着は認められなかった。これらの結果は、EGF-His 固定化表面への細胞接着が EGF-EGFR 間相互作用に基づくことを示唆する。EGF-His 固定化基材上で培養した細胞の増殖率を測定した結果、第 3 世代のニューロスフェア形成細胞と同等の増殖能をもつことがわかった。また、基材上で培養した細胞は、新たな EGF-His 固定化基材を用いて 4 回継代することが可能であった。分化マーカーの蛍光免疫染色の結果、EGF-His 固定化基材上で培養された 1 継代目の細胞では、その 99.2%で NPC マーカーである nestin の発現が認められ、4 継代目においてもその発現率は 98.8%と高かった。一方、成熟した神経マーカーである β -tubulin III 陽性の細胞は、第 1 および 4 継代において 1%以下であった。また、EGF-His 固定化基材上での細胞増殖率を調べた結果、ニューロスフェア培養によって低下した増殖率は、EGF-His 固定化基材上での培養を繰り返すことで回復し、4 継代目の場合、細胞数は 6 日間で約 7 倍に増大した。以上のように、EGFR を発現する NPC は、基材表面に固定化された EGF-His との相互作用を介して、基材上に選択的に捕捉され、その後、EGFR の活性化により NPC の増殖が促進されるものと考えられる。

以上の結果から、本論文はEGF-His固定化基板によって、iPS細胞由来のNPCが未分化状態を維持しながら効率的に増殖可能であることが明らかとなり、大量のNPCを供給できる新たな技術が提案された。

よって審査委員会委員全員は、本論文が山内優佳に博士（歯学）の学位を授与することに十分な価値があるものと認めた。