

ふりがな氏名	うめざき やすゆき 梅崎 泰之
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 768 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Human Gingival Integration-Free iPSCs; a Source for MSC-Like Cells (ヒト歯肉由来インテグレーションフリー iPS 細胞 ; MSC 様細胞ソースのための利用)
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Sciences 第 16 巻 第 6 号 平成 27 年 6 月 15 日
論文調査委員	主 査 馬場 俊輔 教授 副 査 西川 泰央 教授 副 査 田中 昌博 教授

論文内容要旨

間葉系幹細胞(MSC)は組織工学における自己治療のための有用な細胞ソースである。しかし、現在用いられている患者からの採取方法は侵襲が大きく、限られた増殖能力であるため広域な組織再生のために必要量準備するには制限される。それ故、MSC の代替となる必要時にいつでも供給できる調達しやすい新たな細胞ソースが必要である。本研究は、歯科で調達しやすい組織からインテグレーションフリーによる方法で iPS 細胞を作製し、さらに樹立した iPS 細胞から MSC 様細胞(MSLC)に分化誘導させることが目的である。そこで歯科治療中に医療廃棄物となるヒト歯肉組織に着目し、遺伝子の挿入変異の影響が少ないエピソーマルベクターを用いて無限に増殖する iPS 細胞を樹立し、さらに樹立した iPS 細胞を MSLC に無フィーダーで分化誘導させた。

本研究は大阪歯科大学医の倫理委員会(承認番号：110763, 110792)、組換え DNA 実験安全委員会(承認番号：52)、動物実験委員会(承認番号：1406002)の承認を得て行われた。インプラント手術時に採取した 1×1mm の歯肉組織から線維芽細胞(HGF)が培養された。HGF にエピソーマルベクターを用いて初期化因子をエレクトロポレーション法にて導入した。遺伝子導入後 30 日目までの ES 細胞様コロニーの数を算出した。樹立した iPS 細胞は表面抗原解析、定量 PCR による遺伝子解析、胚様体形成試験、奇形腫形成試験、染色体解析を行った。さらに 樹立した iPS 細胞を Growth Factor-Reduced Matrigel 上で無フィーダーにて分化誘導し、4 継代後 MSLC を作製した。さらに作製した MSLC をフローサイトメトリー解析し、骨芽、軟骨、脂肪細胞への分化誘導を行った。分化誘導した細胞は Alizarin Red 染色、Oil Red 染色、Toluidine Blue 染色にて評価した。

遺伝子導入後 30 日目までに ES 細胞様コロニーの数を算出し、樹立効率は約 0.5%であった。樹立した iPS 細胞は ES 細胞様の形態を呈しており、類似した増殖能を示した。また、免疫染色、qRT-PCR においては ES 細胞特異的マーカーの発現を確認した。胚様体形成試験では β -III tubulin (外胚葉)、 α -SMA (中胚葉)、 α -fetoprotein (内胚葉)への分化を確認し、奇形腫形成試験では神経組織(外胚葉)、メラノサイト(外胚葉)、骨組織(中胚葉)、脂肪組織(中胚葉)、軟骨組織(中胚葉)、筋肉組織(中胚葉)、線維性組織(中胚葉)、腸管組織(内胚葉)が認められ、*in vitro* および *in vivo* における三胚葉分化能を確認した。染色体解析は G-band 法にて行われ、正常であった。樹立した iPS 細胞から作製した MSLC は、15 継代可能であり、MSC より増殖能力が高いことが示唆された。フローサイトメトリー解析にて MSC 特異的マーカーの発現を確認した。また血管内皮細胞、造血幹細胞、ES 細胞特異的マーカーの発現は認められなかった。さらに骨芽、軟骨、脂肪細胞へ分化することが Alizarin Red 染色、Oil Red 染色、Toluidine Blue 染色にて確認された。

調達しやすいヒト歯肉線維芽細胞から遺伝子の挿入変異の影響が少ないエピソーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立することが可能となった。樹立した iPS 細胞は増殖性、多能性において ES 細胞と同様の能力を有する細胞であることが示唆された。さらに樹立した iPS 細胞から作製した MSLC は、MSC より増殖能力が高く、MSC 同様の分化能があるため、将来の疾病治療や再生医療のための重要なツールになると考えられる。

論文審査結果要旨

本論文では、歯科で調達しやすい組織からインテグレーションフリーによる方法で iPS 細胞を作製し、さらに樹立した iPS 細胞から MSC 様細胞(MSLC)に分化誘導させることが目的である。そこで歯科治療中に医療廃棄物となるヒト歯肉組織に着目し、遺伝子の挿入変異の影響が少ないエピソーマルベクターを用いて無限に増殖する iPS 細胞を樹立し、さらに樹立した iPS 細胞を MSLC に無フィーダーで分化誘導させた。

本論文では、大阪歯科大学医の倫理委員会(承認番号：110763, 110792)、組換え DNA 実験安全委員会(承認番号：52)、動物実験委員会(承認番号：1406002)の承認を得ていた。インプラント手術時に採取した 1×1mm の歯肉組織から線維芽細胞(HGF)が培養された。HGF にエピソーマルベクターを用いて初期化因子をエレクトロポレーション法にて導入した。遺伝子導入後 30 日目までの ES 細胞様コロニーの数を算出した。樹立した iPS 細胞は表面抗原解析、定量 PCR による遺伝子解析、胚様体形成試験、奇形腫形成試験、染色体解析を行った。さらに樹立した iPS 細胞を Growth Factor-Reduced Matrigel 上で無フィーダーにて分化誘導し、4 継代後 MSLC を作製した。さらに作製した MSLC をフローサイトメトリー解析し、骨芽、軟骨、脂肪細胞への分化誘導を行った。分化誘導した細胞は Alizarin Red 染色、Oil Red 染色、Toluidine Blue 染色にて評価した。

遺伝子導入後 30 日目までに ES 細胞様コロニーの数を算出し、樹立効率は約 0.5%であった。樹立した iPS 細胞は ES 細胞様の形態を呈しており、類似した増殖能を示した。また、免疫染色、qRT-PCR においては ES 特異的マーカーの発現を確認した。胚様体形成試験では β -III tubulin (外胚葉)、 α -SMA (中胚葉)、 α -fetoprotein (内胚葉)への分化を確認し、奇形腫形成試験では神経組織(外胚葉)、メラノサイト(外胚葉)、骨組織(中胚葉)、脂肪組織(中胚葉)、軟骨組織(中胚葉)、筋肉組織(中胚葉)、線維性組織(中胚葉)、腸管組織(内胚葉)が認められ、*in vitro* および *in vivo* における三胚葉分化能を確認した。染色体

解析は G-band 法にて行われ、正常であった。樹立した iPS 細胞から作製した MSLC は、15 継代可能であり、MSC より増殖能力が高いことが示唆された。フローサイトメトリー解析にて MSC 特異的マーカーの発現を確認した。また血管内皮細胞、造血幹細胞、ES 細胞特異的マーカーの発現は認められなかった。さらに骨芽、軟骨、脂肪細胞へ分化することが Alizarin Red 染色、Oil Red 染色、Toluidine Blue 染色にて確認された。調達しやすいヒト歯肉線維芽細胞から遺伝子の挿入変異の影響が少ないエピソーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立することが可能となった。樹立した iPS 細胞は増殖性、多能性において ES 細胞と同様の能力を有する細胞であることが示唆された。さらに樹立した iPS 細胞から作製した MSLC は、MSC より増殖能力が高く、MSC 同様の分化能があるため、将来の疾病治療や再生医療のための重要なツールになると考えられる。

以上のことから、ヒト歯肉由来インテグレーションフリー iPS 細胞が MSC 様細胞ソースのために利用できることを明らかにした、この点について本論文は博士(歯学)の学位を授与するに値すると判定した。