

ふりがな 氏名	かしわざ たかひろ 柏木 隆宏
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 776 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	Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells from human oral mucosa using episomal plasmid vectors and maternal transcription factor Glis1 (エピソーマルプラスミドベクターと母性転写因子 Glis1 を用いたヒト口腔粘膜からのヒト人工多能性幹細胞樹立の加速化)
学位論文掲載誌	Journal of Oral Science & Rehabilitation 第 2 巻 第 2 号 平成 28 年 6 月
論文調査委員	主査 馬場 俊輔 教授 副査 田中 昌博 教授 副査 今井 弘一 教授

論文内容要旨

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、高い多能性、分化能、細胞増殖能を有し、臨床応用のための幹細胞として有用であるが、ウイルスを用いたリプログラミング方法では長い樹立期間を要する。本研究では、未受精卵および胚性細胞で非常に高く発現する、母性 Glis 様転写因子（Glis1）を用いることで、樹立期間を短縮することを目的とし、ヒト iPS 細胞を、初代ヒト口腔粘膜組織由来線維芽細胞（HOFs）と Glis1 含む転写因子を発現するエピソーマルプラスミドベクターの組合せによって作製した。

HOFs は皮膚パンチを用いて、23 歳アジア人男性の直径 3 ミリの口腔粘膜組織から採取し、培養した。HOFs を用いたヒト人工多能性幹細胞（HOF-iPSCs）は、HOFs にエピソーマルプラスミドベクターである *OCT3/4* および *p53 shRNA* を発現する pCXLE-hOCT3/4-shp53-F と *SOX2* と *KLF4* を発現する pCXLE-hSK, *L-MYC* と *LIN28* を発現する pCXLE-hUL と *Glis1* を発現する pCXLE-hGlis1 をエレクトロポレーション法によって形質導入して作製した。遺伝子導入後 20 日目までの ES 細胞様コロニー数を算出した。樹立した HOF-iPSC は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）法による遺伝子解析、細胞表面抗原解析、免疫染色、奇形腫形成試験、核型分析を行った。

遺伝子導入後 20 日までに ES 細胞様コロニーの数を算出し、樹立効率は約 1.0%であった。樹立した HOF-iPSC 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、定量 PCR 法による遺伝子解析、細胞表面抗原解析、免疫染色においては ES 細胞特異的マーカーの発現を確認した。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）、軟骨組織（中胚葉）、腸管組織（内

胚葉) が認められ, *in vivo* における三胚葉分化能を確認した. 核型分析は G-band 法にて行われ異常は認められなかった.

インテグレーションフリーのエピソーマルプラスミドベクターを使用したダイレクトリプログラミングは, 腫瘍形成のリスクを減少させる. HOFs に母性転写因子 *Glis1* と *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *shRNA p53*, *LIN28* 発現エピソーマルプラスミドベクターの使用を組み合わせることにより, 加速的にヒト iPS 細胞を作製することを可能にした. 本樹立法は, 生物医学研究に強力なツールを提供するだけでなく, iPS 細胞を用いた幹細胞移植の臨床応用へと繋がると考える.

論文審査結果要旨

本論文では, 未受精卵および胚性細胞で非常に高く発現する, 母性 *Glis* 様転写因子 (*Glis1*) を用いることで, 樹立期間を短縮することを目的とし, ヒト iPS 細胞を, 初代ヒト口腔粘膜組織由来線維芽細胞 (HOFs) と *Glis1* 含む転写因子を発現するエピソーマルプラスミドベクターの組合せによる作製について検討した.

HOFs は皮膚パンチを用いて, 23 歳アジア人男性の直径 3 ミリの口腔粘膜組織から採取し, 培養した. 研究に先立ち, 大阪歯科大学医の倫理委員会による承認 (承認番号 110783) を得て実験を行った. HOFs を用いたヒト人工多能性幹細胞 (HOF-iPSCs) は, HOFs にエピソーマルプラスミドベクターである *OCT3/4* および *p53 shRNA* を発現する pCXLE-hOCT3/4-shp53-F と *SOX2* と *KLF4* を発現する pCXLE-hSK, *L-MYC* と *LIN28* を発現する pCXLE-hUL と *Glis1* を発現する pCXLE-h*Glis1* をエレクトロポレーション法によって形質導入して作製した. 遺伝子導入後 20 日目までの ES 細胞様コロニー数を算出した. 樹立した HOF-iPSC は定量ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 法による遺伝子解析, 細胞表面抗原解析, 免疫染色, 奇形腫形成試験, 核型分析を行った.

遺伝子導入後 20 日までに ES 細胞様コロニーの数を算出し, 樹立効率は約 1.0%であった. 樹立した HOF-iPSC 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, 定量 PCR 法による遺伝子解析, 細胞表面抗原解析, 免疫染色においては ES 細胞特異的マーカーの発現を確認した. 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), 軟骨組織 (中胚葉), 腸管組織 (内胚葉) が認められ, *in vivo* における三胚葉分化能を確認した. 核型分析は G-band 法にて行われ異常は認められなかった.

インテグレーションフリーのエピソーマルプラスミドベクターを使用したダイレクトリプログラミングは, 腫瘍形成のリスクを減少させる. HOFs に母性転写因子 *Glis1* と *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *shRNA p53*, *LIN28* 発現エピソーマルプラスミドベクターの使用を組み合わせることにより, 加速的にヒト iPS 細胞を作製することを可能にした. 本樹立法は, 生物医学研究に強力なツールを提供するだけでなく, iPS 細胞を用いた幹細胞移植の臨床応用へと繋がると考える.

以上のことから, ヒト iPS 細胞を, 初代ヒト口腔粘膜組織由来線維芽細胞 (HOFs) と *Glis1* 含む転写因子を発現するエピソーマルプラスミドベクターの組合せによって作製し, 母性 *Glis* 様転写因子

(Glis1) を用いることで、樹立期間を短縮したことが示唆された。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。