

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 清川 裕貴
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第523号
学位授与の日付 令和5年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Drug-Induced Naïve iPS Cells Exhibit Better Performance than Primed iPS Cells with Respect to the Ability to Differentiate into Pancreatic β -Cell Lineage
(薬剤誘導を行ったナীব型 iPS 細胞は、プライム型 iPS 細胞に比較して、膵 β 細胞系への分化能に優れている)

論文審査委員 主査 教授 早崎 治明
副査 教授 前田 健康
副査 教授 照沼 美穂

博士論文の要旨

【目的】

1型糖尿病 (Type 1 diabetes, T1D)は、膵臓のインスリン産生細胞(β 細胞)が自己免疫により破壊され、インスリンが枯渇することで血糖値調整が困難となる疾患で、小児慢性特定疾病に指定される。また糖尿病により、歯周炎の増悪、唾液分泌量の低下、創傷治癒遅延などを生じるため、長期の歯科的管理が必要である。T1D の治療法は、インスリン注射での対症療法が主であり、抜本的な治療法は未だになく、新たな再生療法の開発が急がれる。近年はiPS細胞を用いた再生研究が活発だが、効率的な組織誘導法は確立されておらず、その作製には多くの費用と時間が必要となる。そこで本研究では、乳歯歯髄細胞(HDDPC)を用いてiPS細胞を作製後に、未分化性を強めたnaïve stem cells(NSC)を経由することによって、幹細胞特性と膵臓細胞の分化特性を潜在的に有する Induced Tissue-Specific Stem cell Pancreas (iTSC-P) を人工的かつ効率的に作製することで、T1Dの新規再生治療法を提示する。

【方法】

- ① HDDPCの単離：健康患児の脱落乳歯から歯髄組織を採取し、collagenase Type 1 と dispase で酵素処理後、MEM培地(10% FBS)で5% CO₂、37℃にて培養することで、HDDPCを単離した。
- ② iTSC-Pの樹立：Neon[®]を用いた電気穿孔法にてHDDPCに対し、OCT3/4、SOX2、NANOG初期化因子を遺伝子導入し、HDDPC-iPSCを作製した。HDDPC-iPSCの培養時は、mitomycin Cで処理をしたmouse embryonic fibroblast(MEF)をフィーダー細胞として先に播種しておき、その上にiPS細胞を播種してiPSELLONにて培養を行った。その後、Forslokineなどを含む未分化転換培地で培養を行い、未分化状態を進めてナীব化させたHDDPC-NSCを作製した。さらにHDDPC-NSCを用いて、in vitroにてactivin Aなどを含むRPMI培地で段階的に分化誘導し、膵臓方向へ段階的に分化を進め、stage 3とstage 5のiTSC-Pを作製した。同様にHDDPC-iPSCを段階的に膵臓方向へ分化誘導しiPSC経由iTSC-Pを作製した。
- ③ iTSC-Pの特性解析：Alkaline Phosphatase(ALP)染色によって、未分化状態の確認を行った。RT-PCRにより、幹細胞マーカーと膵臓マーカーの発現を確認した。また免疫染色にて、Insulin、PDX1について確認した。
- ④ マウス移植実験：Balb/c nudeマウスに対し、麻酔後に開腹し、実体顕微鏡下にて呼吸制御性ガラスピペット法を用いて、iTSC-Pを膵臓内に少量移植した。1.5ヵ月後に移植部組織を採取し、H-E染色とInsulin、STEM121抗体による免疫染色を行った。

【結果】

iTSC-P誘導過程において、iPS細胞では平面的に細胞凝集したコロニーを形成しALP活性を示した。一方でNSCにおいては立体的なドーム状のコロニーを形成し、同様にALP活性を示した。RT-PCR解析にて、NSCでは幹細胞マ

一カーである OCT3/4、SOX2 の遺伝子発現を認めた。iTSC-P では幹細胞マーカーと膵臓マーカーである Insulin、PDX1 の双方において遺伝子発現を認めた。免疫染色では、NSC 経由 iTSC-P では数石上のコロニーを形成しており、Insulin、PDX1 の双方での抗体反応を認めた。一方で iPS 細胞経由 iTSC-P では、Insulin と PDX1 に反応するものの、コロニーに似た細胞凝集は認められなかった。

ヌードマウスへの iTSC-P の膵臓移植では、移植組織の H-E 染色像より良性腫瘍の形成を認めた。加えて免疫染色では、移植細胞由来抗体 (STEM121) への反応を示し、さらに Insulin 分泌細胞を認めた。Stage 5-iTSC-P 移植群においては膵島様組織の形成を認めたが、一方で Stage 3-iTSC-P 移植マウスにおいて膵島様組織はほとんど見られなかった。

【考察・結論】

iTSC-P は幹細胞特性と膵臓特性を併せ持ち、Insulin 分泌可能な未成熟なβ細胞様細胞と考えられる。さらに iTSC-P を移植することによって、膵島様組織の形成を認めたことから、HDDPC 由来細胞の移植による、効率的なβ細胞再生の可能性を示すことができた。また段階的な分化誘導を行う際は、stage 3 でなく stage 5 までの誘導を行うことによって、より効率的な再生が期待できることが示唆された。本研究の結果より、T1D の根治的療法および再生医療における、iTSC-P の活用が大きいと期待される。

審査結果の要旨

2021 年現在、世界的な 1 型糖尿病 (T1D) の患者数はおよそ 840 万人とされており、20 歳未満の患者は 150 万人 (18%) とされている。本邦における患者数は、2017 年時点で 10~14 万人とされており、その中で小児患者数は 1000 人程度とされている。その原因は、自己免疫により膵臓のランゲルハンス島β細胞が破壊されることでインスリン分泌が低下して、血糖値調整が困難となるものである。このような現状の中で、T1D に関する研究が活発になされているが、未だにその根治的療法の開発まで至っていない。現在の T1D への対症療法に関しては、インスリン注射による外的な血糖値調整が主流である。しかし、注射をすることによる疼痛や時間的制約に関して、患者への負担が分かっていることが課題であり、T1D の根治的療法の開発が早急に望まれている。その中で、免疫抑制下における膵島移植技術が開発されたが、移植 5 年後にインスリン分泌が継続していたものは約 10% 程度に過ぎないことから実用には至っていない。さらに iPS 細胞を用いた膵臓の再生研究もおこなわれているが、現状では移植による腫瘍形成のリスクが残存しており、また効率的に膵臓への分化方向付けを行うことが難しいことが課題となっている。

本研究では、乳歯歯髄細胞 (HDDPC) を用いて、iPS 細胞を作製し、さらに未分化状態を強めた NSC へと転換を行った後に、膵臓方向への分化誘導を進めることによって Induced-Tissue-Specific-Stem cells - Pancreas (iTSC-P) を作製している。この iTSC-P は幹細胞特性と膵臓特性を併せ持った細胞であり、マウスを用いた先行研究より腫瘍形成へ抵抗性を示し、また膵臓系細胞への分化効率が高い細胞であることがわかっている。今回はヒト由来の細胞から iTSC-P を作製している。さらにマウスへ移植することによって、実際に膵臓β細胞の再生が可能であるか、また血糖値の改善は可能であるかについて検討している点において、その新規性は高いと考えられる。

得られた結果より、NSC ではドーム状のコロニーを認め、さらに未分化マーカーである ALP を認めた。また RT-PCR では、NSC では幹細胞マーカーである OCT3/4、SOX2 の発現を認めた。一方で iTSC-P においては、幹細胞マーカーと膵臓マーカーである Insulin、PDX1 の双方の発現を認めたことから、iTSC-P は幹細胞特性を有しつつも膵臓の特性を併せもっていることが確認できた。

ヌードマウスへの iTSC-P の移植では、良性の腫瘍を形成するものの、インスリン分泌細胞ならびに膵島様組織の形成に成功していることから、細胞移植による膵臓再生の可能性が提示された。

本研究結果より、iTSC-P の樹立、そしてマウスへの移植において、インスリン分泌細胞と膵島様組織の形成を認めたことから、効率的な膵臓再生をおこなう細胞移植療法を見出すことができる。本研究において将来における再生療法を用いた新規治療法の可能性が示唆されその再生研究への貢献度が高いことが伺えることから、学位論文の価値を認める。また論文内容に関する諮問に対しても十分な回答を得ることができたことから、博士 (歯学) の学位を授与するにふさわしいと判断した。