

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 齋藤 美樹
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第392号
学位授与の日付 平成30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 Repeated transfection of human deciduous teeth-derived dental pulp cells with reprogramming factors enables efficient generation of multipotent intermediate cells that are more susceptible to iPS cell formation
(脱落乳歯由来歯髄細胞への初期化因子の繰り返し遺伝子導入は、iPS 細胞樹立途中の多能性中間細胞の効率的な樹立を可能にする)

論文審査委員 主査 教授 早崎 治明
副査 教授 大島 勇人
副査 教授 泉 健次

博士論文の要旨

【目的】

近年、iPS 細胞作製技術を応用しヒト組織特異的幹細胞の樹立が可能となり、それらは再生医療の細胞供給源として有用とされ盛んに研究が行われている。我々は実際、マウス腭幹細胞、肝幹細胞などの樹立に成功している。これらの細胞は、1) 樹立効率が iPS 細胞よりも高い、2) 分化誘導効率が ES/iPS 細胞より高い、3) ES/iPS 細胞で懸念される未分化細胞残存による腫瘍 (奇形腫) 形成の可能性が低い、などの特徴を持ち、ES/iPS 細胞の臨床応用に関わる問題点の多くを解決する可能性を秘める。我々はヒト組織特異的幹細胞が、分化細胞への初期化因子の一過性過剰発現によって部分的にリプログラミングされ iPS 細胞への移行の直前の状態であると仮説し、iPS 細胞作製技術を応用し、ヒト乳歯歯髄細胞に対して初期化因子の遺伝子導入を行った。また、重複遺伝子導入によりもたらされる幹細胞化現象について多角的な検討を行った。

【方法】

ヒト乳歯歯髄初代培養細胞に Neon トランスフェクションシステムを使用し、初期化因子を遺伝子導入し iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞に対して代表的な幹細胞特異的マーカーを用いて免疫染色を行い、幹細胞としての特性の有無を確認した。得られた iPS 細胞から胚様体を形成し三胚葉への分化を確認した。また、ヒト乳歯歯髄初代培養細胞に初期化因子を遺伝子導入し、3、5、7、9 日目後における ALP 活性を組織化学的に調べた。初期化因子の重複遺伝子導入は 3 回まで行い、同様に ALP 活性を調べた。細胞の幹細胞化を同定するため細胞から total RNA を単離し、cDNA 合成後、幹細胞特異的遺伝子群の発現を RT-PCR 法にて調べた。単離した細胞を骨系へ分化誘導を行い、Von Kossa 染色および Alizarin 染色にて骨系細胞への分化能を評価した。また、神経系へ分化誘導後、Nissl 染色にて神経系細胞への分化能を評価した。

【結果】

リプログラミングに耐性がある株に対して初期化因子の遺伝子導入を重ねたことで、iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞において OCT3/4、SOX2、TRA1-60 および SSEA4 のような幹細胞マーカーの発現を免疫染色で確認し、形成した胚様体には三胚葉が含まれることを確認した。また、初期化因子の遺伝子導入 3、5、7、9 日後の ALP 活性は経時的に発現が増強し、細胞への遺伝子導入を重ねることで、増殖率の低下および ALP 陽性細胞の増加を認めた。RT-PCR 解析により、遺伝子導入 13 日後の細胞は親株と比べて、幹細胞マーカーの発現を認め多能性を示した。また、遺伝子導入 9 日目の細胞を用いて神経細胞や骨細胞への分化誘導を試

みた結果、親株よりも優れた多分化能が示された。

【考察】

本研究により初期化因子の繰り返しの遺伝子導入により、リプログラミングに対して耐性があるヒト乳歯歯髄初代培養細胞から iPS 細胞を樹立した。このことから複数回遺伝子導入を行うことで、iPS 細胞における分化誘導の際に起きる段階的な分化と逆の事象が引き起こされている可能性があることが示唆された。またリプログラミング過程において、多能性及び非腫瘍原性の組織特異的幹細胞と思われる中間細胞の存在を見出した。このことから、iPS 細胞作製技術は単に iPS 細胞を樹立するだけでなく、組織特異的幹細胞の樹立も可能であることが示された。これらの iPS 細胞および組織特異的幹細胞の樹立技術は、歯科組織の再生における研究の発展に寄与するものと考えられる。

審査結果の要旨

Oct-3/4、Klf4、Sox2、および c-Myc (OKSM) のような幹細胞特異的転写因子の強制発現によって、様々な細胞が正常にリプログラミングされて多能性幹細胞 (iPSC) へ誘導されてきたが、iPSC 誘導の効率は誘導方法および使用細胞の違いにより大きく異なり、リプログラミングの詳細な機構については明らかにされていない点が多い。また、ヒト乳歯歯髄細胞 (HDDPC) からも iPSC 樹立は可能であるが、その樹立効率は依然として低い。先行研究より、iPSC 樹立に抵抗性を示すマウス肝細胞・脾臓細胞に初期化因子を遺伝子導入することで幹細胞様の中間集団が分離されており、これらの単離細胞株は「誘導組織特異的幹細胞 (iTSC)」と命名されている。本研究では、幹細胞関連分子の発現レベルが非常に低い細胞とみなされる HDDPC に対して初期化因子の繰り返し遺伝子導入を行い、リプログラミング過程における ALP 活性の変化を確認するとともに、iTSC が効率的に濃縮されるかどうかを検討した。

得られた結果から、iPSC 樹立に抵抗性を示す HDDPC へ初期化因子の遺伝子導入を重ねることで細胞群の ALP 活性が上昇し、iPSC の樹立効率が高まることが確認された。さらに、樹立した iPSC における幹細胞マーカーの発現および形成した胚様体の三胚葉への分化を確認した。また、HDDPC への山中因子の遺伝子導入後、経時的な ALP 活性の上昇が認められた。遺伝子導入後 9 日目の HDDPC の形態は親株と同様に線維芽細胞様であったが、RT-PCR 解析より iPSC と同等の幹細胞マーカーの発現を認めた。同細胞の分化誘導実験では、神経細胞、骨細胞への分化が見られその多分化能が確認された。

以上の結果より、HDDPC への初期化因子の遺伝子導入を行うことで、ALP 活性が高まり iPSC 樹立効率の上昇を惹起していることが確認され、人工的幹細胞樹立における複数回の遺伝子導入の有効性が示唆された。

本研究より臨床応用可能な人工的幹細胞の効率的な樹立のための新たな戦略が見出されたことから幹細胞研究への貢献度が極めて高いため、学位論文としての価値を認める。また、論文内容に関する試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。