

# 論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	普天間 拓
論文審査 委員氏名	主査 本田 雅規 副査 嶋崎 義浩 鈴木 崇弘		
論文題名	シングルセル培養したヒト iPS 細胞から上皮 細胞への分化誘導方法の確立		

インターネットの利用による公表用

上皮は発生初期に外胚葉から分化し、外界の刺激から生体を保護する役割をもつ。生体において外胚葉由来の表皮に傷害を受けた場合、組織を修復し、機能を回復させる目的で細胞を用いた再生医療が行われている。例えば、熱傷患者の治療に表皮から採取した上皮細胞由来の細胞シートが臨床応用されている。しかし、細胞シートの製造には動物由来成分を使用しており、病原体の伝播や感染の可能性が懸念されている。さらに安全性の理由から再生医療に必要な細胞源を確保することが困難な場合もある。網膜色素上皮細胞 (RPE) 由来の細胞シートが再生医療に用いられていたが、RPE を採取する際に大量出血などの危険性が報告されている。したがって RPE のように、細胞源の確保が困難な場合、再生する組織に適した細胞源を探索する必要がある。2006 年に発表された iPS 細胞は三胚葉すべての細胞に分化する多能性を有しており、再生医療における有用な細胞源となることが期待されている。従来の多能性幹細胞の培養方法は、フィーダー細胞上でコロニー培養する方法が主流であった。しかし、この方法で培養された ES 細胞は不均質な細胞特性が指摘されている。そこで近年、コロニーを形成することなくシングルセルで iPS 細胞を培養できる方法が考案された。本研究はシングルセルで培養したヒト iPS 細胞が未だ報告のない表皮外胚葉由来の上皮細胞へ分化能を有するか検討し、その誘導方法の確立を目的としている。

ヒト iPS 細胞 (253G1 株) はシングルセルで培養した後に、DMEM-F12 に

1 X N2、1  $\mu$ M RA および 25 ng/ml BMP4 を添加した上皮細胞誘導培地に交換し最長 28 日間分化誘導を試みた。分化誘導後の細胞においてリアルタイム PCR を使用して、未分化マーカー (*OCT3/4*)、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー (*P63*、*CK18* および *CK14*) の遺伝子発現量を誘導 3、7、10、14、21 および 28 日目で解析した。また、ウエスタンブロットおよび免疫染色で表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー (*P63*、*CK18* および *CK14*) のタンパク発現を調べた。

誘導中の細胞における未分化マーカー遺伝子の発現は、誘導 3 日目で *OCT3/4* を発現していたが、誘導日数が進むにつれて発現が低下した。一方で、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー遺伝子の発現は、まず *CK18* が誘導 7 日目で、次いで *P63* が誘導 14 日目で、そして *CK14* が誘導 28 日目でピークを迎えた。ウエスタンブロットおよび蛍光抗体法を用いたタンパク発現解析では、表皮外胚葉由来上皮細胞マーカー (*P63*、*CK18* および *CK14*) のタンパク発現が明らかになった。

上皮の発生には、特徴的な遺伝子発現を示すことが報告されている。胎児の発生過程では、まず、体表面が *CK18* 陽性細胞からなる単層上皮で覆われる。発生が進むにつれて、この単層上皮には、重層化への発達に参与する *p63* が発現する。そして、*CK18* 陽性細胞が *CK14* 陽性細胞に置換されながら重層化すると考えられている。このような表皮外胚葉への分化メカニズムは、上皮細胞誘導培地に含まれる BMP4 が重要な役割を果たしている。BMP4

は上皮の維持に必要な  $\Delta$ Np63 を直接活性化する。その結果、 $\Delta$ Np63 の発現量が増加し、CK14 プロモーターが活性化することで表皮外胚葉への分化が促進される。さらに、上皮細胞誘導培地に含まれる RA も  $\Delta$ Np63 の発現を上昇させることが報告されている。つまり、誘導因子に含まれる両因子により、表皮外胚葉への分化が進行すると考えられる。本研究におけるリアルタイム PCR の結果は、*P63*、*CK18* および *CK14* の遺伝子発現が表皮外胚葉の分化で見られる特徴的な遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。さらにウエスタンブロットおよび蛍光抗体法においても *P63*、*CK18* および *CK14* のタンパク発現を確認した。以上のことより、シングルセルで継代し培養したヒト iPS 細胞を上皮細胞誘導培地で 28 日間誘導すると、表皮外胚葉由来の上皮細胞へ分化することを明らかにした。

本研究による知見は、シングルセルで培養したヒト iPS 細胞から表皮外胚葉由来の上皮細胞への分化誘導方法を確立し、iPS 細胞が表皮外胚葉由来の上皮細胞の発生、分化メカニズムの解析や再生医療への応用に貢献できる可能性を示すものである。実験方法は妥当であり、実験結果の示す客観的事実および将来の臨床応用に向けた課題について、十分な考察がなされている。

よって本論文は、博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。