

氏名	さくらい みはる 櫻井 美晴
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 22 年 9 月 8 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Induction of stratified epithelial stem/progenitor cells in vitro from induced pluripotent stem cells (人工多能性幹(iPS)細胞からの重層化上皮幹細胞前駆細胞の誘導)
論文審査委員	主査 教授 富永 悌二 教授 出澤 真理 教授 阿部 俊明

## 論文内容要旨

**目的：**京都大学の山中教授らが作製した人工多能性幹 (iPS) 細胞は、胚性幹 (ES) 細胞と同様に体を構成するあらゆる細胞を作り出せる潜在的能力を有し、ES 細胞が抱える倫理的問題や拒絶反応の問題を回避できるとされる。近年、iPS 細胞の再生医学への応用が期待され、iPS 細胞から様々な細胞、組織への分化誘導が試みられている。今回、マウス iPS 細胞から重層化上皮幹細胞前駆細胞への誘導に成功したので報告する。

**方法：**未分化なマウス Nanog-iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-38D-2) を 4 型コラーゲンでコーティングした培養皿上に播種し、ケラチノサイト培養用培地で平面培養した。サプリメントとして培地に 0.5 nM bone morphogenic protein-4 (BMP-4) と 1  $\mu$ M レチノイン酸を添加し、添加しない場合との誘導効率を比較した。分化誘導した細胞について、未分化 ES 細胞マーカーである Oct3/4、Nanog と上皮系分化マーカーである p63、サイトケラチン 14、サイトケラチン 18 の発現を real-time RT-PCR で経時的に解析した。p63 とサイトケラチン 14 については免疫染色でも評価した。

**結果：**マウス iPS 細胞から重層化上皮幹細胞前駆細胞を誘導することに成功した。播種したマウス iPS 細胞は、培養日数が進むにつれて、未分化 ES 細胞マーカーである Oct3/4 と Nanog の発現が低下した。一方、未分化 ES 細胞マーカーの低下に伴い、最初に単層上皮・表皮外胚葉マーカーであるサイトケラチン 18 が発現し、次いで、重層化上皮前駆細胞マーカーである p63 と重層化上皮細胞マーカーであるサイトケラチン 14 の発現が認められた。p63 とサイトケラチン 14 を発現する細胞は、重層化上皮幹細胞前駆細胞とみなされた。この重層化上皮幹細胞前駆細胞は、サプリメントを用いない場合でも誘導可能であったが、BMP-4 とレチノイン酸を添加することで、より効率よく誘導することができた。さらに、マウス ES 細胞 (RF8) について、同様の方法で誘導を行った結果、マウス iPS 細胞の場合と同様の結果を得ることができた。

**考察：**今回、マウス iPS 細胞をケラチノサイト培養用培地で培養することにより、重層化上皮幹細胞前駆細胞へ誘導することができた。これは、基底膜の構造タンパクである 4 型コラーゲンで培養皿をコーティングしたことと、ケラチノサイト培養用培地に含まれる epidermal growth factor (EGF) が重要な役割を果たしていると考えられた。

BMP-4 は、Sox1<sup>+</sup>の神経前駆細胞のアポトーシスを誘導して神経外胚葉への分化を阻害する一方で、上皮幹細胞の維持に重要な  $\Delta$ Np63 を直接活性化し表皮外胚葉への分化を促進することが知られている。また、誘導早期のレチノイン酸添加は神経系への分化を阻害し上皮系への分化を促進することが知られている。そのため、BMP-4 やレチノイン酸をケラチノサイト培養用培地に添加した時に、重層化上皮幹細胞前駆細胞の分化効率が向上したと考えられた。

さらに、未分化 ES / iPS 細胞から重層化上皮幹細胞前駆細胞への分化誘導過程で、① 未分化マーカー (Oct3/4、Nanog) の発現の低下とサイトケラチン 18 の発現、② p63 の発現、③ サイトケラチン 14 の発現というステップがあり、各々の発現の過程で EGF、BMP-4、レチノイン酸が作用していると示唆された。

今後、今回誘導した重層化上皮幹細胞前駆細胞の細胞移植治療を考えた際、未分化細胞の混入によるガン化の危険性があり、これを回避するためには、培養系の最適化により誘導効率を向上させるとともに、未分化/分化マーカーの発現に基づいた fluorescence-activated cell sorting (FACS) による重層化上皮幹細胞前駆細胞の純化・精製の方法を確立することが必要と思われる。

**結論：**これまでにマウス ES 細胞から上皮系細胞への誘導は報告があるが、マウス iPS 細胞から重層化上皮幹細胞前駆細胞を誘導した報告は今回が初めてである。また今回の実験から、上皮系細胞への分化誘導において、マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞と同等の分化能があることが確認できた。これらのことから、今回の誘導方法および誘導されたマウス iPS 細胞由来の重層化上皮幹細胞前駆細胞は、上皮系細胞の発生・分化メカニズムの研究や再生医療の研究に貢献できると考えられた。

