

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 μ 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⁺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 Δ 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。

審査結果の要旨

博士論文題名 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)

所属専攻・分野名 医科学専攻・眼科学分野

学籍番号 氏名 櫻井美晴

京都大学の山中教授らが樹立した人工多能性幹 (iPS) 細胞は、人工的に多能性を誘導した細胞で、胚性幹 (ES) 細胞とはほぼ同様の能力を有するとされる。iPS 細胞は受精卵を用いることなく体細胞から ES 細胞に類似した多能性幹細胞を得ることができるため、ES 細胞の抱える倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植医療に繋がると期待されている。現在、iPS 細胞を様々な細胞に分化させる研究が盛んに行われている。しかしながら、これまでに iPS 細胞から表皮外胚葉系への分化誘導の報告はない。角膜上皮は表皮外胚葉に由来する非角化重層扁平上皮である。本研究は、iPS 細胞から角膜上皮細胞を誘導する前段階として、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 (CK14) を発現する重層化上皮幹細胞前駆細胞への分化誘導法を確立することを目的に、マウス iPS 細胞を用いた分化誘導実験を行っている。結果は以下に示す通りであった。

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 (KCM) で培養した結果、重層化上皮幹細胞前駆細胞の誘導に成功した。iPS 細胞は、誘導開始後から未分化 ES 細胞マーカー (Oct3/4, Nanog) の発現の低下を認めた。一方、未分化 ES 細胞マーカーの発現の低下に伴い、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 (CK18) が認められ、次いで p63 が発現し、p63 の発現に遅れて CK14 の発現を認めた。p63+/CK14+ の細胞は、重層化上皮幹細胞前駆細胞と考えられた。さらに、KCM に 0.5nM bone morphogenic protein-4 (BMP-4) と 1 μ M レチノイン酸 (RA) を添加することで、p63+/CK14+ の重層化上皮幹細胞前駆細胞の誘導効率をあげることができた。また、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、iPS 細胞の場合と同様の結果が得られた。以上のことから、上皮基底膜の構造タンパクである 4 型コラーゲンと KCM に含まれる epidermal growth factor (EGF) が重層化上皮幹細胞前駆細胞の誘導に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、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 ES 細胞マーカーの発現低下と CK18 の発現、②p63 の発現、③CK14 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、RA が作用していると示唆された。BMP-4 は、Sox1+ 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 Δ 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。一方、誘導早期の RA 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とされる。そのため、BMP-4 や RA を添加した時に、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。また、上皮系細胞への分化誘導に関して、iPS 細胞と ES 細胞は同等の分化能があることが示された。

本研究による知見は、iPS 細胞から重層化上皮幹細胞前駆細胞への誘導方法を確立し、iPS 細胞が上皮系細胞の発生・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 (医学) の学位論文として合格と認める。