

論文内容の要旨

申請者氏名 小田 泰昭

胚性幹(embryonic stem ; ES)細胞は、様々な細胞へと分化する能力を持つことから、糖尿病やパーキンソン病、脊髄損傷など様々な疾患や外傷に対する細胞移植医療への応用が期待されている。しかし、ES 細胞の樹立には受精卵を犠牲にしなければならないため、倫理的問題が懸念される。このような背景の中、京都大学の山中伸弥教授らのグループは *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* の 4 遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞へ導入することで、ES 細胞に類似した人工多能性幹(induced pluripotent stem ; iPS)細胞の樹立に成功した。しかし、マウスを用いた研究で、原ガン遺伝子である *c-Myc* 遺伝子が生体内で再活性化されるとガン化を引き起こすことが報告された。*c-Myc* 遺伝子を用いなくても、ヒト iPS 細胞の樹立が可能であると報告されたが、効率が著しく低下するのが欠点であった。*c-Myc* を用いずに効率よく iPS 細胞を樹立することができれば、ガン化の懸念を低減することができると期待される。

本研究では、医療廃棄物として廃棄される親知らず由来の歯胚(歯の発達初期の過程)組織に由来するヒト歯胚由来間葉系細胞から、原ガン遺伝子である *c-MYC* を用いることなく iPS 細胞を樹立すること、さらに、初期化機序の解明を目的とした。

研究に関して同意の得られた 10 歳女性、13 歳男性、16 歳女性の 3 人の提供者由来の歯胚間葉系細胞にレトロウイルスベクターを用いて *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* の 3 遺伝子を導入して 30 日間培養することで、ヒト iPS 細胞の樹立に成功した。その樹立効率は、10 歳女性>13 歳男性≒16 歳女性の順であった。歯胚間葉系細胞は不均一な細胞集団であるため、より詳細な解析を行うために、iPS 細胞樹立効率が最も高い 10 歳女性(10F)の歯胚間葉系細胞を単一細胞へとクローン化し、それぞれのクローンを増殖させて 5 株の歯胚クローンを樹立した。これら 5 株の歯胚クローンと、比較として市販のヒト線維芽細胞(human dermal fibroblast ; HDF)を用いた計 6 種類の細胞から、上述と同様に 3 遺伝子で iPS 細胞の樹立を行った。その結果、歯胚クローン 3 株においては HDF よりも 100 倍以上高い効率で iPS 細胞を樹立することができた。歯胚クローン由来 iPS 細胞は、多数の未分化ヒト ES/iPS 細胞マーカーを発現していることを免疫染色ならびに RT-PCR で確認した。また、生体外および生体内において、内胚葉、中胚葉、外胚葉の 3 胚様に分化する多分化能を持つことを確認した。歯胚クローンの一部において極めて高効率で iPS 細胞を樹立できる原因を調べるために、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。iPS 細胞樹立効率の高い細胞群と低い細胞群間で遺伝子発現を比較したところ、前者では histone methyltransferase 複合体の構成因子の 1 つである *PAXIP1* 遺伝子の発現が有意に高いことが明らかとなった。

本研究の成果より、歯胚組織がヒト iPS 細胞樹立のための有用な細胞源として期待されるとともに、*PAXIP1* 遺伝子と細胞の初期化機序の関連をさらに研究することで、基礎および臨床を含めた再生医療研究へ貢献できると期待している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小田 泰昭

iPS 細胞の樹立に用いられる細胞源としては、線維芽細胞、角化細胞、骨髄由来間葉系細胞、脂肪由来間葉系細胞、造血幹細胞、神経幹細胞などが報告されていた。しかし、ヒトの場合、これらの細胞の一部は体の深部に存在するため、採取が困難であったり多大な苦痛を伴うことが予想される。さらに、iPS 細胞を用いた臨床応用を考慮すると、*c-MYC*の再活性化によるガン化は憂慮すべき重大な問題である。

申請者は、iPS 細胞の樹立に用いる細胞源として、歯科矯正手術において医療廃棄物として廃棄される親知らずの歯胚組織に注目しており、歯胚由来間葉系細胞からの *c-MYC*を用いずにヒト iPS 細胞樹立を行った点は非常に興味深い成果である。3 人の提供者いずれからも iPS 細胞の樹立に成功しているが、10 歳女性で最も効率がよく、13 歳男性と 16 歳女性では、10 歳女性よりも数倍低い結果となっている。年齢により樹立効率が異なるのかどうか、今後の進捗を期待したい。

歯胚由来間葉系細胞は雑多な細胞集団であることから、申請者は 10 歳女性の歯胚細胞をクローン化して 5 株の歯胚クローンを作製し、これらからの iPS 細胞樹立も行っている。ヒトの細胞をクローン化して iPS 細胞樹立を行った例は過去にないことから、興味深い試みである。5 株の歯胚クローンと、比較のためにヒト線維芽細胞を用いて iPS 細胞樹立を行った結果、5 株のうち 3 株で HDF の 100 倍以上効率よく iPS 細胞を樹立することに成功しており、最大で 0.2~0.3%の樹立効率であったことを報告している。原ガン遺伝子である *c-MYC*を用いることなく、これほど高効率で iPS 細胞を樹立した報告は殆どなく、非常に興味深い成果であると言える。樹立した歯胚クローン由来 iPS 細胞が未分化ヒト iPS 細胞のマーカーを発現すること、また、*in vitro*および *in vivo*において分化多能性を示すことも証明しており、iPS 細胞としての性質を備えていることを検証している。

歯胚クローンの一部において、高効率で iPS 細胞を樹立できる原因を探索するために、申請者は樹立効率の高い細胞群と低い細胞群間で、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行っている。その中でも、申請者は樹立効率が高い細胞群で発現が高く、histone methyltransferase の 1 つである *PAXIP1* 遺伝子に注目している。ヒストンの修飾は遺伝子の転写のオン/オフに密接に関与しており、*PAXIP1* 遺伝子が細胞の初期化に関することを示唆する報告は過去にないことから、非常に興味深い成果である。今後の更なる研究が期待される。

以上のように、本論文は親知らず由来の歯胚細胞が iPS 細胞樹立の細胞源として有用であることを示すとともに、細胞の初期化機序に関して新たな可能性を示唆するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。