

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 歯 学 ）	氏名	田 口 有 紀
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 単層無血清培養系での歯髄由来細胞を用いたヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞） の樹立および維持に関する研究			
論文審査担当者 主査 教授 宿 南 知 佐 印 審査委員 教授 吉 子 裕 二 審査委員 准教授 嶋 本 顕			
〔論文審査の要旨〕 胚性幹（Embryonic Stem:ES）細胞や人工多能性幹（induced Pluripotent Stem:iPS）細胞は、不活化したマウス胎仔由来線維芽細胞（フィーダー細胞）を支持細胞として、血清添加培地を用いて培養されている。しかし、このような培養条件では、これらの細胞の増殖や分化を際下如久制御することはできない。また、増殖・分化制御機構や制御因子を詳細に検討することは非常に困難である。本研究では、フィーダー細胞を用いず、すべての組成が明らかな無血清单層培養系を用いて、歯髄由来細胞からヒト iPS の樹立ならびに維持を目指した。 健康人埋伏智歯由来歯髄細胞(DPC)にレトロウイルス(PLAT-A)を用いて、4 遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc）を導入し、無血清培地 hESF9 を基に、Fibronectin 上に播種し、ヒト iPS 細胞の樹立について検討した。同培養系においてヒト iPS 細胞(hiPSC)の長期継代および未分化性の維持に transforming growth factor-β1(TGF-β1)が必須であることを細胞増殖試験，デジタル PCR 法および FACS 解析にて検討した。同培養系においてヒト iPS 細胞樹立時における誘導効率に及ぼす TGF-β1 添加の影響について検討した。hESF9 に TGF-β1 を添加した hESF9T 培地を基に，hiPSC を 1 年以上継代培養し，細胞増殖試験，未分化遺伝子発現を RT-PCR 法，未分化・多分タンパク発現を蛍光免疫染色法にて検討した。また同細胞を免疫不全マウスの背部皮下に移植し，teratoma(奇形腫)形成能について検討した。同細胞と由来歯髄細胞の STR 解析，同細胞の染色体解析，マイクロアレイ解析にて細胞の特性について検討した。さらに国立生育医療センターにて樹立			

され、(独)医薬基盤研究所より供与された、フィーダー細胞上で血清添加培地にて継代維持されている樹立ヒト iPS 細胞株 Tic を、Fibronectin 上で hESF9T 培地にて継代培養し、未分化性および多分化能を RT-PCR 法および蛍光免疫染色法にて検討した。その結果以下のことが明らかとなった。

1. ウイルス感染からヒト iPS 細胞樹立までの全過程を完全無血清培養系にて行い、健康人患者由来歯髄細胞からヒト iPS 細胞を誘導できることを明らかにした。
2. hESF9 無血清培地を用いたヒト iPS 細胞の培養維持において、増殖と未分化性の維持のために TGF- β 1 は必須因子であることを明らかにした。
3. ヒト iPS 細胞の樹立時における TGF- β 1 の添加は樹立効率を低下させた。
4. フィーダー細胞を用いることなく hiPSC の増殖の未分化性および多分化能を 1 年以上の長期間にわたり安定して維持可能な無血清培養系を確立した。
5. 本無血清培養系にて維持した hiPSC を免疫不全マウスに移植し teratoma を形成したことから多分化能を有していた。
6. 本無血清培養系にて継代維持した hiPSC は DPC 由来であることが確認された。
7. 本無血清培養系にて継代維持した hiPSC の染色体は 46, XX であることが確認された。
8. 本無血清培養系にて継代維持した hiPSC の遺伝子プロファイルは Tic のそれとは近似していたが、DPC のそれとは明らかに異なっていた。
9. 本無血清培養系は Tic を 5 継代以上に渡り、その未分化性および多分化能を維持可能であることを明らかにした。

以上の結果から、フィーダー細胞を用いない hESF9T 完全無血清单層培養系で、歯髄由来細胞の初代培養からヒト iPS 細胞の誘導、樹立および長期継代培養が可能であることが明らかとなった。従来、フィーダー細胞や動物由来成分を含む培養系では、ヒト iPS 細胞等の幹細胞の標準化は困難であったが、本培養法を用いることで、これら幹細胞の未分化性の維持や増殖・分化を制御する各種因子の同定および検討が可能となり、発生・組織・臓器再生メカニズムの解明や、創薬スクリーニングへの応用、さらに安全で確実な再生医療の実現が可能となると考えられた。

本論文は、口腔外科学をはじめ歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値のあるものと認めた。