

## 論文内容の要旨

Craniofacial Bone Regeneration using iPS Cell-Derived Neural Crest Like Cells  
—iPS 細胞由来神経堤細胞を用いた頭蓋顔面骨再生—  
(Journal of Hard Tissue Biology 第 27 巻、第 1 号、平成 30 年 1 月掲載予定)

きくち かずこ  
菊池 和子

### I. 研究目的

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は多能性を有し、患者自身の細胞から作製できるため、再生医療・細胞移植治療の細胞源として注目されている。我々は、以前 iPS 細胞から神経堤細胞 (iPS-NCLC) に分化誘導する技術確立し、その細胞が象牙芽細胞や歯髄細胞への分化能を持つことを示した。そこで本研究では、この NCLC が間葉系幹細胞 (MSC) へ、さらには骨芽細胞へ分化し、骨再生に寄与できるかを検討した。

### II. 研究方法

1. マウス iPS-NCLC を血清含有培地で培養することで MSC への分化誘導を行い、フローサイトメーター、免疫組織化学をもちいて MSC マーカーの発現を解析した。
2. iPS-NCLC-MSC における腫瘍形成に関わる未分化性維持遺伝子の発現を、定量的 PCR または免疫組織化学にて解析した。また iPS-NCLC-MSC を腫瘍免疫不全マウス皮下に移植し、腫瘍形成能を評価した。
3. iPS-NCLC-MSC に対して骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨芽細胞への分化誘導を行い、特異的マーカーの発現を定量的 PCR または免疫組織化学にて解析した。
4. GFP を発現する iPS-NCLC-MSC を  $\beta$ -TCP とともにマウス頭蓋骨欠損部に移植し、8 週後に組織学的解析を行った。

### III. 研究成績

1. 血清含有培地で培養した iPS-NCLC は MSC マーカーを発現する一方、白血球およびマクロファージマーカーは陰性であった。
2. iPS-NCLC-MSC は iPS 細胞と比較して未分化性維持遺伝子の発現が顕著に低下していた。さらに iPS-NCLC-MSC は免疫不全マウスの皮下に移植しても奇形腫を形成しなかった。
3. iPS-NCLC-MSC は、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨芽細胞への分化誘導培地で培養することで、それぞれの細胞へと分化した。
4. マウス頭蓋骨欠損部に対して、iPS-NCLC-MSC を移植した群は非細胞移植群と比較してより多くの新生骨の形成を認めた。新生骨組織周囲の iPS-NCLC-MSC は骨芽細胞マーカーを発現していた。

### IV. 考察及び結論

1. iPS-NCLC は血清含有培地で培養することで MSC に分化した。
2. iPS-NCLC-MSC は腫瘍形成能を喪失しており、将来の臨床応用を考える上で安全性の高いものであると考えられた。
3. iPS-NCLC-MSC は *in vitro* において骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨芽細胞に効率よく分化することから、様々な組織再生に応用できると考えられた。
4. iPS-NCLC-MSC は *in vivo* においても骨芽細胞へ分化し、骨再生に寄与することが明らかになった。

以上の結果から、我々が開発した iPS-NCLC-MSC の作製技術は、骨再生を必要とする疾患に対して有用な方法であることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 森川 和政（口腔保健育成学講座 小児歯科学・障害者歯科学分野）  
副査 教授 原田 英光（解剖学講座 発生生物・再生医学分野）  
副査 教授 石崎 明（生化学講座 細胞情報科学分野）

歯科治療においては、多くの場面で骨の再生が必要とされており、幹細胞を用いたより効率的かつ効果的な骨再生法の開発が望まれている。組織再生の基本的戦略は、その組織の発生過程を人工的に再現させることである。顎顔面骨は神経堤細胞から分化した間葉系幹細胞から作られる。したがって幹細胞から神経堤細胞、間葉系幹細胞への分化を介して顎顔面骨の再生を行うことが、実際の発生過程に最も即した再生法であると言える。

これまでに学位申請者は、マウス iPS 細胞から効率的な神経堤細胞への分化誘導法を確立しており、本研究にて iPS 細胞由来神経堤細胞が顎骨再生における有用な細胞ソースになりえると考えた。学位申請者は、まず初めに iPS 細胞由来神経堤細胞を血清含有培地で培養することで、間葉系幹細胞へと分化させることに成功した。次にこの細胞が骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨芽細胞へと分化することを明らかにした。また、この iPS 細胞由来間葉系幹細胞を免疫不全マウス皮下に移植したところ、腫瘍の形成能を持たないことがわかった。最後に in vivo において、iPS 細胞由来間葉系幹細胞が骨形成能を有することを明らかにするために、iPS 細胞由来間葉系幹細胞を免疫不全マウス頭蓋骨欠損部に移植したところ、iPS 細胞由来間葉系幹細胞は骨芽細胞に分化し、骨再生を促進することが明らかになった。

以上の結果から、学位申請者は iPS 細胞由来神経堤細胞から分化させた間葉系幹細胞は、顎骨再生に対して有用な細胞ソースになるという結論に至った。

## 試験・試問結果の要旨

はじめに本論文の目的、研究方法、結果、考察、結論の概要について説明が行われた。説明後、研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究課題・展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的で熱意が感じられた。その結果、学位に値する十分な学識と研究能力を備えているものと判定した。

## 参考論文

1. ミトコンドリア脳筋症患者の全身麻酔経験 日本歯科麻酔学会雑誌 平成 10 年 4 月  
(菊池 和子他 6 名と共著) 第 26 巻, 第 2 号  
284 頁～288 頁
2. 日帰り全身麻酔を行っている歯学部附属病院 日本障害者歯科学会雑誌 平成 23 年 2 月  
障害者歯科の診療実態 第 32 巻, 第 1 号  
(菊池 和子他 8 名と共著) 65 頁～72 頁