

審査の結果の要旨

氏名 堀江 尚弘

本研究は、軟骨無形成症（ACH）にて障害を受ける、軟骨細胞の分化段階を明らかにするため、CRISPR/Cas9 システムを応用したゲノム編集にて、ヒト iPS 細胞に軟骨無形成症の原因変異を組み込み、ACH モデル hiPS 細胞の樹立を試みた。更に、樹立したゲノム編集 hiPS 細胞を用いて軟骨分化誘導実験を行い、下記の結果を得た。

1. CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を hiPS 細胞に施すことにより、軟骨無形成症の原因となる、*FGFR3* 遺伝子の 1138G→A のホモ変異が導入された細胞を 2 株取得できた。また、今回樹立したゲノム編集 iPS 細胞株はシングルコロニー由来ではあるが、厳密にはシングルクローン由来と言えないため、フィーダーフリーという iPS 細胞にとって、より厳しい環境に移したことで、変異の入っていないクローンが優勢に増殖している可能性が危惧された。故に、フィーダーフリーに馴化した時点で、変異導入細胞のシーケンス解析を行ったところ、1138G→A のホモ変異の存在が認められ、変異導入細胞が増殖していることが確認された。
2. 樹立した変異導入細胞（実験群）と、ゲノム編集を施したが目的の変異が組み込まれなかった hiPS 細胞（対照群）共に、細胞の形態に明瞭な違いは無かった。
3. hiPS 細胞の軟骨分化誘導 Stage 3（軟骨細胞の段階）において、*FGFR3* と、同受容体の下流シグナルに関する検討を行った。Western blotting の結果より、実験群の *FGFR3* タンパク質発現と ERK のリン酸化は対照群と比較して上昇した一方で、同細胞の *FGFR3* 遺伝子発現は低下していた事がリアルタイム PCR の結果より示された。よって、*FGFR3* 遺伝子発現はネガティブフィードバック機構にて調節されている可能性が考えられた。
4. リアルタイム PCR による軟骨マーカー遺伝子に関する検討では、変異の有無に関わらず、軟骨へ分化するにつれ早期軟骨マーカー遺伝子である *COL2A1* 発現は上昇していたのだが、分化誘導 Stage 3（軟骨細胞の段階）の実験群において、後期軟骨マーカー遺伝子である *IHH* 発現の上昇が抑制されていることが確認された。従って、実験群の細胞において、前肥大軟骨細胞分化が障害されていると考察した。
5. テラトーマの組織所見については、実験群、対照群共に三胚葉系の組織が認められた。更に、両群の軟骨様組織を比較したところ、実験群は小腔を有する細胞の密度が高く、基質が少なくなっており、前肥大軟骨細胞分化の障害を反映している事が示唆された。

以上、本研究はゲノム編集により ACH モデル hiPS 細胞を樹立し、同細胞の軟骨細胞への分化誘導・解析を通じて、ACH 軟骨細胞における前肥大軟骨細胞の段階に、障害が発生することを示した。本研究の結果は ACH の病態解明に寄与するのみならず、ACH 治療における創薬ターゲットを示し、ACH の根本的治療法開発につながる示唆を与えるものである。故に、学位の授与に値するものと考えられる。