

審査の結果の要旨

氏名 河田 学

本研究は低分子化合物を用いたヒト iPS 細胞の軟骨細胞への分化誘導法の開発に取り組んだものであり、下記の結果を得ている。

1. 多能性幹細胞の中内胚葉細胞への誘導能が知られている Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化剤である CHIR99021 (グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 阻害薬) と、生体の様々な組織の発生過程で働きが知られているレチノイン酸受容体作動薬 (本研究では主として TTNPB を使用) の組み合わせによる、フィーダーフリー培養条件下のヒト iPS 細胞の軟骨細胞への分化誘導能を検討した。各化合物の投与期間・投与濃度を振り分けて条件検討を行った結果、CHIR99021 を 5-10 μ M の濃度で初めの 2 日間投与し、また TTNPB を 10 nM-1 μ M の濃度で連日投与することで、分化誘導開始 5 日目の時点の軟骨系マーカーの良好な上昇が見られた。
2. 10 μ M の CHIR99021 を始めの 2 日間、100 nM の TTNPB を分化誘導開始から連日投与する培養系を 2C 法の標準プロトコルとし、分化誘導開始から 14 日目まで連日検体を回収する実験を行ったところ、未分化細胞→中内胚葉細胞 (分化誘導開始 1-2 日目) →中胚葉細胞 (同 2-4 日目) →軟骨細胞 (同 5 日目以降) と段階的な分化誘導が進行していた。2C 法 9 日目の時点、既存のサイトカインを用いた約 2 週間の分化誘導法 (Oldershaw RA et al., Nat Biotechnol 2010. Yamashita A et al., Stem Cell Reports 2015) と比較すると、2C 法は軟骨系マーカーの上昇が有意に優れており、同時に他系統マーカーや未分化マーカーの値が有意に低かった。
3. 分化誘導効率の確認のため、2C 法 9 日目の時点で Fluorescence Activated Cell Sorting を行うと、SOX9 陽性細胞率が平均 97.9% と非常に効率よく軟骨細胞に分化誘導できている上に、OCT4, NANOG といった未分化マーカー陽性細胞がほぼ 0% となる結果が得られた。
4. TTNPB の代わりに、ATRA, 9cis-RA, AM80, AM580 といった種々のレチノイン酸受容体作動薬を 100 nM 連日投与する条件下でも同様に軟骨系マーカーの上昇を認めた。また複数のヒト iPS 細胞クローンおよびマウス ES 細胞に対して 2C 法による分化誘導を行ったところ、同様に軟骨系マーカーの上昇が再現された。
5. 更に 2C 法 9 日目の時点の iPS 由来軟骨細胞を立体培養に移行し軟骨ディスクを作成、SCID マウスの膝関節に移植したところ、移植 8 週の時点で抗ヒト Vimentin 抗体陽性領域に一致して Safranin

○ 染色陽性の領域を認め、移植したヒト iPS 由来細胞が硝子軟骨として生着していることを示す結果を得た。また移植後 6 ヶ月経過したマウスの中で、奇形腫やその他の腫瘍形成は認められた例はなかった。

以上のように本論文は、完全合成無血清培地下において 2 種類の低分子化合物を用い、従来のサイトカインを用いた分化誘導法と比較してより短期間かつ効率的に、ヒト iPS 細胞を軟骨細胞へと分化誘導することのできる培養法を確立した。本研究において確立した分化誘導法は、再生医療の発展への貢献は勿論のこと、軟骨発生過程の各段階における基礎的研究、更には軟骨疾患に対する創薬研究にも重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。