

審査の結果の要旨

氏名 ズフル ピザロ デニス カロリナ

近年、種々の疾患や外傷によって骨組織を欠損した患者の数は増加傾向にある。米国整形外科学会によると、骨欠損に対する骨移植等の処置件数は全世界で毎年およそ 2,200 万件にもものぼる。骨欠損の治療法としては自家骨移植がゴールドスタンダードであるが、ドナー部位の障害がしばしば問題となるほか、採取可能な移植骨の量に制限がある。したがって、機能的な人工骨の開発が待たれている。現在、間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cells – MSCs) 由来の骨形成性細胞を含む担体が市販されているものの (Trinity Evolution、Osteocell、Map3、BIO4/Stryker 等)、これらの治療効果に関する根拠は不足していると言わざるを得ない。

多能性幹細胞は2つの性質 – 自己複製能と多能性 – によって特徴づけられる。胚性幹細胞 (embryonic stem cells – ESCs) は発生のごく初期に存在する細胞に由来し、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells – iPSCs) は体細胞を初期化することで作られる。いずれも生体内の全ての細胞に分化する能力を有する。ヒト iPSC 由来骨形成性細胞 (骨芽細胞) は、MSC 由来のものとは比べて高い増殖能と骨形成能を有することが報告されており、多能性幹細胞を骨芽細胞へと効率的に分化させる手法の開発は近年注目を集めている。しかしながら、これまでに開発された方法はいずれも異種動物由来の成分を培養系に含んでおり、臨床的な安全性は担保されていない。以上をふまえ、本論文では、低分子化合物を分化誘導剤として用い、異種動物由来の成分や未知の成分が培養系に含まれない条件で、ヒト iPSC から三次元的に骨芽細胞を作製する方法の開発に取り組んだ。

第一章ではまず、多能性幹細胞から骨芽細胞分化を誘導する三次元培養系の開発に取り組んだ。アテロコラーゲン担体にマウス ESC を播種し、3次元培養を行ったところ、2次元で培養した細胞と同等のレベルの多能性マーカー遺伝子発現を認めた。また、三次元培養では、多能性維持に必要とされる添加物 (2iLIF) を培養系に添加しなくとも、多能性が維持されることを見出した。以上より、三次元培養系では、マウス ESC の多能性を保ちながら、良好に維持できること

が示唆された。次に、低分子化合物のみを分化誘導剤として用いた骨芽細胞分化プロトコール(既報)に従って、マウス ESC を三次元培養系において培養し、三次元的な骨芽細胞分化誘導を試みた。その結果、三次元培養においても、二次元培養と同様の骨芽細胞分化マーカー発現のパターンを認め、効率的に分化が進むことが確認された。また、三次元培養においてのみ、成熟骨芽細胞・骨細胞の分化マーカーの発現上昇が誘導されることを見出した。三次元培養によって作製された成熟骨芽細胞・骨細胞は、生体内と同様に、破骨細胞支持能を有していた。さらに、培養担体の走査型電子顕微鏡による観察および石灰化検出染色による解析において、担体内における細胞外基質の石灰化を認めた。以上より、本法は、低分子化合物のみを用いてマウス ESC から成熟骨芽細胞や骨細胞への最終分化を誘導する三次元培養系となりうると考えられた。本法がマウス iPSC でも同様の分化を誘導できることも確認した。

第二章では、異種動物由来の成分や未知の成分が培養系に含まれない条件で、ヒト iPSC から骨芽細胞分化を誘導するプロトコールの開発に取り組んだ。まず、低分子化合物のみを用いて各種シグナル経路を段階的に調節することで、効率的に骨芽細胞分化を誘導する条件の最適化を行った。その結果、古典的 Wnt シグナルの活性化剤とヘッジホッグシグナル抑制剤の存在下で短期間培養することにより、中胚葉分化が誘導されることを見出した。作製された中胚葉系細胞をさらに、ヘッジホッグシグナル活性化剤、ヘリオキサンチン誘導剤、古典的 Wnt シグナル活性化剤存在下で培養することで、骨芽細胞分化マーカーの有意な発現上昇と、基質の石灰化が誘導された。本プロトコールが、異種動物由来の成分や未知の成分が一切含まれない培養系において、三種類の異なる iPSC 株を骨芽細胞へ分化させることを確認した。

第三章では、第一章と第二章で得られた知見を統合し、異種動物由来の成分や未知の成分が一切含まれない三次元培養系において、ヒト iPSC から骨芽細胞を作製する培養系の開発に取り組んだ。第一章で開発された三次元培養系において、第二章で最適化された分化プロトコールに従ってヒト iPSC を培養したところ、培養 21 日目までに骨芽細胞分化マーカーの発現上昇が確認され、さらに、成熟骨芽細胞マーカーの発現が維持された。次に、本法により三次元培養で作製されたヒト iPSC 由来骨芽細胞を、マウス頭蓋骨に作製した骨欠損モデルに移植し、その成体における骨形成能を検証した。その結果、ヒト iPSC 由来骨芽細胞移植群において骨修復を認めた。さらに、ヒト核抗原陽性細胞が移植部に認められたことから、移植したヒト iPSC 由来細胞は骨欠損部に生着したと考えられた。

以上より、本論文では、異種動物由来の成分や未知の成分が一切含まれない三次元培養系において、分化誘導剤として低分子化合物のみを用い、ヒト iPSC

から機能的な骨芽細胞を作製する培養系が開発された。従来の方法と比べ、本論文で開発された培養系は、異種動物由来の成分や未知の成分を一切含まない点に加え、安定な低分子化合物を分化誘導剤として用いる点、及び誘導期間が短い点において優れている。これらの利点により、本培養系は骨格系再生医療へのヒト iPSC の応用のみならず、治療用薬剤の開発や基礎研究を含むバイオエンジニアリング、生体医工学の発展に貢献するものであると考えられる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。