

審査の結果の要旨

氏名 菅家 康介

本研究は多能性幹細胞から骨芽細胞を高効率に分化させる方法の開発を行った研究であり、下記の結果を得ている。

1. 細胞内シグナル調節活性を有する数種の低分子化合物を用いて、マウス胚性幹細胞 (マウス ES 細胞) から無血清培地下で中胚葉及び骨芽細胞を段階的に誘導するプロトコールを最適化した。PD0325901 (PD03) 及び CHIR99021 (CHIR) の 2 つの阻害薬 (2i 培養法) を用いた多能性維持、高濃度 CHIR と Hh シグナル阻害薬 cyclopamine (Cyc) の同時曝露による、中胚葉誘導及び神経外胚葉分化阻害、Smoothened Agonist (SAG) とヘリオキサンチン誘導体 (TH) の同時曝露による段階的骨芽細胞分化誘導法を確立した。
2. 確立した方法にて誘導されたマウス ES 細胞由来の細胞は、骨芽細胞誘導後に骨芽細胞マーカー遺伝子 (*Runx2*、*Sp7*、*Coll1a1* 及び *Ibsp*) の発現上昇を認めたとともに、*in vitro* 培養環境における初代骨芽細胞と同等ないし、それよりも高い遺伝子発現となった。骨芽細胞マーカータンパク質 (RUNX2、SP7 及び 2.3kb-Coll1a1) の高い発現及び一様に石灰化した細胞塊を認めた。
3. *Runx2* を欠失させたマウス ES 細胞に本誘導法を用いたところ、野生型細胞と異なり、骨芽細胞誘導後に *Sp7* 及び *Bglap* の発現上昇を認めず、*Ibsp* のみわずかに発現するという、*Runx2* ノックアウトマウスの表現型に類似した遺伝子発現が確認された。これらの結果と、誘導期間内の遺伝子変化の挙動から、本誘導法は、骨芽細胞分化の生理的な過程を少なくとも部分的に反映している可能性が示唆された。
4. マウス人工多能性幹細胞 (マウス iPS 細胞) 及びヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) においても、骨芽細胞誘導後の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現上昇、骨芽細胞マーカータンパク質 (RUNX2 及び SP7) 及び石灰化を認めたことから、本誘導法の理論は、マウス ES 細胞のみならず、マウス iPS 細胞及びヒト iPS 細胞に応用可能であることが示された。

以上、本論文は細胞内シグナル調節活性を有する数種の低分子化合物を用いた、多能性幹細胞から無血清培地で中胚葉及び骨芽細胞を段階的に誘導する方法を確立した。本誘導法は、血清やフィーダー細胞を含まない環境下で、安定性が高く、低コストである低分子化合物のみを誘導因子として用いた新たな誘導法であり、骨の発生学、骨関連疾患の病態解明及び個別化医療、さらには骨の再生医療の進歩の足掛かりとなりうると考えられ、学位授与に値する研究であると考えられる。