

京都大学	博士（医 学）	氏 名	石川 正昭
論文題目	Transplantation of neurons derived from human iPS cells cultured on collagen matrix into guinea-pig cochleae (コラーゲン上で培養したヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞のモルモット蝸牛内への細胞移植)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、感音性難聴に対する聴覚一次ニューロンであるラセン神経節細胞再生を目的とした蝸牛内への細胞移植の可能性が報告されている。先行研究として、ラセン神経節細胞障害モデル動物の蝸牛への多能性幹細胞由来神経前駆細胞の移植によるラセン神経節細胞の機能回復が報告されているが、この過程で移植細胞中の未分化細胞の残存は大きな問題である。解決策として、分化誘導法の見直しと最終分化した神経細胞を移植細胞として用いる事が挙げられるが、神経細胞の培養皿からの剥離は細胞死を惹起するため、神経細胞を移植するためには新たな手術方法の確立が求められる。</p> <p>本研究では細胞移植によるラセン神経節細胞再生を目的とし、未分化細胞を含まないヒト iPS 細胞由来神経細胞の調製、並びに神経細胞を蝸牛内へ移植するための手術方法の確立を行い、その有用性を検討した。まず Li らにより報告された ES 細胞からの神経幹細胞分化誘導法を改変し、iPS 細胞を 2 種類の小分子化合物及びヒト白血病抑制因子（hLIF）を含んだ培地中で培養することにより神経幹細胞へ誘導した。免疫染色法と RT-PCR 法による検討から未分化マーカーOCT3/4 は陰性で、神経幹細胞マーカーは陽性であることを確認した。この神経幹細胞をマトリゲルコートした培養皿に再播種し、小分子化合物、hLIF を含まない培地で 7～14 日間培養し、神経細胞へ分化誘導した。分化誘導後の細胞は約 30%の割合で神経前駆細胞を含むものの、大部分が様々な成熟段階を伴った神経細胞であり、次に分化した神経細胞サブタイプを検討したところ、約 90%の細胞はグルタミン酸作動性神経マーカーである VGLUT1 が陽性であった。これにより神経細胞の多くはラセン神経節細胞と同じグルタミン酸作動性神経細胞であることが示された。7、14 日間培養後の細胞に含まれる神経サブタイプの割合は同じ傾向であった為、神経幹細胞から神経細胞へ誘導する期間を 7 日間とし、以後の実験に採用した。</p> <p>次に神経幹細胞をアテロコラーゲンで作られたスポンジ様構造体である三次元コラーゲンマトリックス上に播種し、マトリゲル上で行ったのと同じ分化誘導方法を用いて神経細胞への誘導を行ったところ、β III-TUBULIN 陽性細胞の 75%以上が VGLUT1 陽性細胞であった。すなわち三次元培養で分化誘導された神経細胞のサブタイプはマトリゲル上での分化誘導と同じ傾向を示した。</p> <p>この移植細胞を含む三次元コラーゲンマトリックスをハートレー系モルモットの蝸牛へ移植した後に免疫抑制剤を投与し、7 日後に組織評価を行った。移植部位には激しい白血球の浸潤を認め、移植細胞の生存率は 1%以下であり、異種移植による免疫拒絶反応を抑制する必要性が示唆された。そこで免疫抑制効果が報告されている骨髓間質細胞をモルモット大腿骨から採取し、移植直後に静脈投与し、7 もしくは 14 日後に組織評価を行った。骨髓間質細胞が投与された蝸牛内では、白血球の浸潤が抑制されており、移植後 7 日目の移植細胞の生存率は約 15%に向上した。移植後 14 日目の生存率は約 2%であった。生存移植細胞の 60%以上が β III-TUBULIN 陽性細胞であり、そのうちの 90%以上が VGLUT1 陽性であった。すなわちヒト iPS 細胞由来グルタミン酸作動性神経細胞は適切な免疫抑制を行うことで、モルモット蝸牛内で移植後 14 日間生存できることが示された。</p> <p>以上より、ヒト iPS 細胞由来グルタミン酸作動性神経細胞を未分化細胞の残存なく蝸牛内へ移植する方法を確立した。</p>			

（論文審査の結果の要旨）
聴覚一次ニューロンであるラセン神経節細胞の高度変性により、高度感音難聴に対する現在唯一の治療法である人工内耳の効果が限定される。蝸牛への ES 細胞由来神経前駆細胞の移植によりラセン神経節細胞の機能が回復することが報告されている。iPS 細胞を用いた蝸牛内移植における我々が得た知見として、移植細胞のソースとして iPS 細胞が ES 細胞と同等の能力を持っている一方で、移植後も未分化細胞の残存や移植細胞の増殖能を認めたことが問題点である。解決策として分化誘導法の見直しや神経細胞を移植細胞として用いることが挙げられる。本研究では細胞移植によるラセン神経節細胞再生を目的とし、未分化細胞を含まないヒト iPS 細胞由来神経細胞の調製、並びに神経細胞を蝸牛内へ移植するための手術方法の確立を行い、その有用性を検討した。本研究で用いた分化誘導法により、ヒト iPS 細胞はマトリゲル上で未分化細胞を含まない神経幹細胞へ分化した後に、グルタミン酸作動性神経細胞へ誘導された。この神経細胞を移植細胞として用いるために、コラーゲンマトリックス上でも同様の分化誘導を行い、移植に用いた。移植細胞は適切な免疫抑制を行うことでモルモット蝸牛内で移植後 14 日間生存できることが示された。以上の研究は移植細胞ソースとしてのヒト iPS 細胞の有用性の解明に貢献し、将来の細胞移植によるラセン神経節細胞治療の発展の基礎に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 20 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降