

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                       |    |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 博士（医学）                                                                                                                                | 氏名 | 西村幸司 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Transplantation of murine induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors into the cochlea<br>(マウス人工多能性幹細胞由来神経前駆細胞の蝸牛への細胞移植) |    |      |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                       |    |      |
| <p>ラセン神経節細胞は蝸牛の感覚細胞である有毛細胞と蝸牛神経核をシナプス結合する聴覚一次ニューロンである。現在高度感音難聴者に対しての唯一の治療法である人工内耳はラセン神経節細胞を電氣的に刺激して音感を得させるので、障害されたラセン神経節細胞の再生は人工内耳手術後の聴覚機能の改善にも必要である。これまでの研究でラセン神経節細胞障害モデルの内耳に胚性幹（ES）細胞由来神経前駆細胞を細胞移植することでラセン神経節細胞の機能回復が得られたこと、器官培養実験で ES 細胞由来神経前駆細胞とマウス内耳有毛細胞がシナプスを形成することが報告されている。これらの結果から ES 細胞はラセン神経節細胞を再生させるための細胞ソースとして最有力候補と考えられてきた。一方、ES 細胞と同等の能力を有する人工多能性幹（iPS）細胞が開発され、再生医療の細胞ソースとしての可能性が注目されている。</p> <p>本研究ではラセン神経節細胞の再生を目的として、移植細胞ソースとしてのマウス iPS 細胞の能力を ES 細胞のそれと比較検討した。検討した細胞種は、マウス成体尾部皮膚由来線維芽細胞（TTF）に初期化 3 因子(Oct3/4, Klf4, Sox2)をレトロウイルスで導入して得られた iPS 細胞（256H13 株）、マウス胎児線維芽細胞（MEF）に初期化 4 因子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)をレトロウイルスで導入して得られた iPS 細胞（20D17 株）、MEF に初期化 4 因子を含むプラスミドを直接導入して得られた iPS 細胞（440A-3 株）、マウス ES 細胞（G4-2 株）の 4 株である。</p> <p>まず未分化 ES 細胞、iPS 細胞を間葉細胞由来誘導活性（SDIA）法により神経分化誘導させた。誘導 6 日目で神経マーカーの nestin, βIII-tubulin 陽性コロニーの出現を認め、誘導 15 日目においては iPS 細胞由来コロニーから神経突起の伸張を認めた。iPS 細胞（256H13 株）由来神経前駆細胞は器官培養実験で、生後 3 日齢マウス蝸牛有毛細胞へ神経突起を伸張した。iPS 細胞（256H13 株）由来神経前駆細胞を生後 3 日齢のマウス蝸牛に細胞移植し 1 週後に組織評価したところ、10 蝸牛中 3 蝸牛に iPS 細胞由来細胞を認めた。iPS 由来細胞の 49.1% がβIII-tubulin 陽性、17.1% が nestin 陽性、18.7% が NCAM 陽性、6.7% が GFAP 陽性、2.3% の細胞が VGLUT1 陽性であった。すなわち、移植された iPS 細胞由来神経前駆細胞は、移植後ラセン神経節細胞と同じグルタミン酸作動性ニューロンに分化しうることが示された。</p> |                                                                                                                                       |    |      |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>次に、移植後の iPS 細胞由来神経前駆細胞の増殖能を評価する目的で、細胞移植 4 週後の蝸牛の組織評価を行った。移植細胞株間で、βIII-tubulin 陽性率、Ki67 陽性率に有意差を認めなかった。iPS 細胞（256H13 株）由来神経前駆細胞を細胞移植した蝸牛 1 例に奇形腫形成を認めた。これは TTF 由来の iPS 細胞は腫瘍形成しやすいとする過去の報告と矛盾しない。</p> <p>検討した iPS 細胞由来神経前駆細胞は細胞移植 4 週後においても蝸牛内で神経分化し、かつ増殖していたことがわかった。以上より、iPS 細胞は内耳への移植細胞として腫瘍形成傾向はあるものの ES 細胞とほぼ同等の能力をもつと考えられた。細胞移植時の未分化細胞の除去、腫瘍形成を起こしにくい細胞選別と、機能的な再生の実現が今後の課題である。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>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例では現在高度感音難聴に対しての唯一の治療法である人工内耳の効果は見込めない。胚性幹細胞（ES 細胞）由来神経前駆細胞の内耳への細胞移植により変性したラセン神経節細胞の機能改善が得られることが報告されている。一方、ES 細胞と同様の能力をもつ人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が体細胞から樹立され、再生医療の細胞ソースとしての可能性が注目されている。本研究ではラセン神経節細胞の再生を目的としてマウス iPS 細胞の能力を ES 細胞のそれと比較した。iPS 細胞は試験管内で神経細胞に誘導され、器官培養実験では iPS 細胞由来神経前駆細胞から内耳感覚細胞である蝸牛有毛細胞に向かい神経突起を伸長した。また、蝸牛に細胞移植された iPS 細胞由来神経前駆細胞は神経に分化し、一部はラセン神経節細胞と同じグルタミン酸作動性ニューロンに分化した。蝸牛に細胞移植された異なる種類の iPS 細胞由来神経前駆細胞の増殖能に細胞株間の差を認めなかったが、iPS 細胞由来神経前駆細胞を細胞移植した 17 蝸牛中 1 例に奇形腫の形成を認めた。本研究の結果により iPS 細胞は内耳への移植細胞として腫瘍形成傾向はあるものの ES 細胞とほぼ同等の能力をもつと考えられた。</p> <p>以上の研究は移植細胞ソースとしての 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なると考えられる。</p> <p>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。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 23 年 10 月 31 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。</p> |
| 要旨公開可能日：                      年                      月                      日以降                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |