

論文審査の要旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

白土 崇輝

主論文の題目
および
掲載誌・審査委員

題目 Sonic Hedgehog Supplementation Rapidly induces Myogenesis in Human Induced Pluripotent Stem Cells
(SHH はヒト iPS 細胞における筋形成を急速に誘導する)

掲載誌 Journal of St. Marianna University 2015; 6: 225-233.

主査 中島 秀喜
副査 井上 肇
副査 武永 美津子

【論文の要旨・価値】【緒言】骨格筋幹細胞である筋衛星細胞は Pax7、MyoD、Myf5、myogenin のような転写因子の MyoD ファミリーにより調節される。必須の筋原性因子に加え、insulin-like growth factors (IGF) I や IGF II は phosphoinositol-3 kinase (PI3K)/AKT 経路の活性化を介し筋芽細胞の増殖と分化を促進する。脊椎動物の発生において重要な役割を持つヘッジホッグファミリーのソニック・ヘッジホッグ (SHH) は、胚における筋分化を促進させ、筋芽細胞の増殖と分化を制御する。本研究では、SHH の添加によりヒト iPS 細胞から骨格筋細胞の分化誘導を試み、この筋芽細胞をマウスの前脛骨筋内に移植して、筋肉内での生着が可能であるかを検討した。【方法】ヒト iPS 細胞 (253GI 株) を 4 日間浮遊培養して胚様細胞塊を形成させ、フィブロネクチンをコートした培養ディッシュに播種した細胞を実験に用いた。24 時間後 (day5) に、周知の骨格筋細胞増殖培地に交換して 7 日間 (day5~day11) 培養を続けた。その際に組換えヒト IGF II (200ng/ml) および/または、SHH (2 μ g/ml) を添加し、day5、day7、day11 の細胞を経時的に回収して、RT-PCR で筋分化関連遺伝子の mRNA 発現と、免疫蛍光染色で筋形成に関連する蛋白質の発現を確認した。また、day7 の培養細胞 (5x10⁵ 個) をマウスの両側前頸骨筋に注入して、生着を検討した (聖マリアンナ医科大学動物実験委員会承認番号 TG-140514-1)。【結果】未分化のヒト iPS 細胞、IGF II または SHH のみを添加した細胞には、day7 の時点で MyoD と myogenin の mRNA の発現は認められたが、Mrf4 と dystrophin は認めなかった。これに対して、IGF II と SHH を同時添加した細胞は、MyoD、myogenin および dystrophin の発現を認めた。この同時添加した細胞では、day5 で MyoD、Mrf4 を、day7 と day11 では myogenin および dystrophin の蛋白質の発現を免疫蛍光染色で確認できた。この細胞を移植したマウスでは、シクロスポリンとデキサメサゾンで免疫抑制した時には移植細胞は認められなかったが、デキサメサゾンのみで免疫抑制した場合には、前脛骨筋に移植細胞のびまん性な浸潤を認めた。この組織の免疫蛍光染色では局所的に MyoD、myogenin および dystrophin 陽性細胞を認めた。

本研究は、ヒト iPS 細胞に SHH と IGF II を同時添加することで、短期間に dystrophin 発現細胞へ分化させ、安定的かつ速やかに筋細胞が分化誘導できる可能性を示した。さらに、この筋細胞が生体内に移植可能であることを示唆した。今後は成熟筋細胞の形成メカニズムを解明していくことで、移植療法として臨床応用への発展性を示した新しい知見であり、学位論文に値するものと判断された。

【審査概要】 審査は、平成 28 年 1 月 25 日に主査・副査および 5 名の陪席者のもとで行われた。最初に PC を用いた約 20 分間の論文の口頭説明の後、約 40 分間にわたって質疑応答が行われた。質問の内容は実験目的、手技、今後の展望に関する多くの質問があった。例えば、①培養条件や移植細胞の生着と分化を免疫染色で確認する手法、②シクロスポリンの移植細胞に与える影響、③移植実験での細胞分化度や動物に使用する免疫抑制薬の条件設定の検討などの質問があったが、終始真摯な態度でほぼ満足がいく回答がなされ、今後の研究の発展性に対する熱意、意欲も感じられた。

最終試験結果の要旨

【研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価】 プレゼンテーションでは、よくまとめられたスライドを用いて、本研究の要点を解りやすく発表を行ない、質疑応答全体を通じて、当該分野の専門知識や研究能力は十分であると理解した。英語読解力に関しては、引用論文の一つを指定して、その抄録を和訳することで評価したが、十分な読解力があると判定した。以上のことより、申請者、白土崇輝君は学位授与に値すると判断した。