The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Id2欠損マウス由来iPS細胞を用いた骨芽細胞分化機構の解析
Author(s)	裏口, 真也
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34369
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　裏口　真也　　）	
論文題名	Id2欠損マウス由来iPS細胞を用いた骨芽細胞分化機構の解析

論文内容の要旨

緒言

近年の人工多能性幹細胞 iPS細胞の発見は，皮膚などの細胞に数個の遺伝子を導入することで，どんな細胞にもなれる万能細胞を作り出す技術です。我々の研究グループは，歯肉線維芽細胞が歯科医師にとって容易に採取可能であることや，良好な初期化効率を有することから，この細胞が有望なiPS細胞資源であることを明らかにしてきました。個々の患者から作製したiPS細胞は，再生医療の細胞源として期待されています。iPS細胞を用いた骨組織再生に向けた研究は，これまでにマウスiPS細胞を骨芽細胞や骨組織に分化誘導した報告があります。しかしながらiPS細胞の骨芽細胞への分化機構の詳細はほとんど明らかにされていません。その骨芽細胞への分化機構は明らかにされていない。basic helix-loop-helix型転写因子の機能抑制因子であるinhibitor of DNA binding/differentiation-2 (Id2)は，幹細胞の“stemness”の維持に関与し，間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を制御することが示唆されている。

本研究の目的は，Id2遺伝子の欠損マウス（$Id2^{-/-}$）から樹立したiPS細胞を用いて骨芽細胞への分化誘導モデルを作製し，Id2の初期化および骨芽細胞分化への関与を明らかにすることである。

方法

Id2欠損マウスおよび野生型マウス歯肉線維芽細胞を分離培養し，それぞれの細胞にレトロウイルスベクターを用いて山中因子であるoct3/4, sox2, klf4, c-mycを導入してiPS細胞を作製した。導入後，フィーダー細胞上に形成したアルカリフォスファターゼ陽性のES細胞様コロニーを検出し、それぞれの細胞の初期化効率を算出した。さらに，ES細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR解析にて評価し，作製したiPS細胞株の多分化能を評価するためにテラトーマ（奇形腫）の形成実験を行った。

次にそれぞれのiPS細胞株から胚様体を作製し，レチノイン酸の存在下で培養することにより，間葉系細胞へ分化を方向付けした後に，通常の骨芽細胞分化培地で28日間培養した。分化評価として石灰化基質の形成をvon Kossa染色および，Arizalin Red染色にて確認し，ハイドロキシアパタイト結晶の形成を電子線回折解析を用い，骨芽細胞特異的遺伝子の発現をReal time RT-PCRにて解析した。さらにBMP存在化における骨芽細胞分化培地にて21日間培養し，その評価としてPCR Array, Real time RT-PCR解析を用いた。

結果

野生型マウス線維芽細胞の初期化効率は約1,2%であるのに対し, Id2欠損マウス歯肉線維芽細胞は約1,9%と有意に高い値を示した。樹立したiPS細胞株について，RT-PCR解析を行った結果，全てのクローンにおいてES細胞に特異的な遺伝子であるNanog, 内在性oct3/4などの発現を示した。また，Id2欠損マウス由来iPS細胞をマウス精巣に移植した結果，10週後には腫瘍形成を認め，その内部には三胚葉系にわたるさまざまな組織像が確認されました。

骨芽細胞誘導における石灰化基質形成をvon Kossa染色にて評価した結果，Id2欠損マウス由来iPS細胞は野生型マウス由来iPS細胞と同様に著名な細胞外基質の石灰化を示し，Arizalin Red染色の結果，von Kossa染色同様細胞外基質の石灰化を示した。さらに定量した結果，Id2欠損マウス由来iPS細胞は有意に高い値を示した。また，電子線回折解析において30日間分化誘導した結果，Id2欠損マウス由来iPS細胞および野生型マウス由来iPS細胞は著名な回折リングパターンが確認され，ハイドロキシアパタイトの結晶構造の形成を確認した。それぞれのiPS細胞において骨芽細胞分化誘導を21日間行いReal time RT-PCR解析した結果，Id2欠損マウス由来iPS細胞は野生型マウス由来iPS細胞と比較してRunx2以外の転写因子であるMsx2, Dlx5, osterixの発現を上昇を認め，骨芽細胞分化後期のマーカーであるcol-1, osteocalcinの発現上昇も確認した。またBMP存在下において骨芽細胞分化誘導を21日間行いPCR Array解析を行った結果，Wntシグナル伝達経路のアンタゴニストであるSOSTの発現は減少し，骨基質に最も豊富に存在する増殖因子であるIGF1, TGFbスーパーファミリー受容体の阻害剤であるDcn, 脂質生成を阻害し骨芽細胞生成を刺激するWnt6, Wnt10a，さらにWntシグナル伝達経路を負に制御するSfrp2, Sfrp4の発現上昇を認めた。

考察

Id2欠損マウス歯肉線維芽細胞からiPS細胞の作製が可能であり，Id2欠損マウス由来iPS細胞は野生型マウス由来iPS細胞と同様にハイドロキシアパタイト結晶構造を有する骨芽細胞に分化し，Arizalin Red染色，Real time RT-PCRなどの結果より，骨芽細胞分化を増強することが示唆された。我々は，Id2欠損マウス由来iPS細胞の骨芽細胞分化誘導モデルが新しいメカニズムのさらなる解析に向けての重要なステップであることを示し, 最終的には歯科補綴治療においてiPS細胞に基づく生体組織工学の発展に導く可能性が期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　裏口　真也　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	矢谷　博文
	副 査	教授	西村　理行
	副 査	准教授	前田　隆史
	副 査	講師	伊藤　祥作

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は，*Id2* 遺伝子の欠損マウス（$Id2^{-/-}$）から樹立した iPS 細胞を用いて骨芽細胞へ分化誘導モデルを作製し，*Id2* の骨芽細胞分化への関与を明らかにすることである。

樹立したすべての $Id2^{-/-}$-iPS 細胞株は $Id2^{+/+}$-iPS 細胞株と同様に ES 細胞に特異的遺伝子の発現を示した。また，$Id2^{-/-}$-iPS 細胞をマウス精巣に移植した結果，10 週後には腫瘍形成を認め，その内部には三胚葉系にわたるさまざまな組織像を確認した。$Id2^{-/-}$-iPS 細胞株は $Id2^{+/+}$-iPS 細胞株と同様にハイドロキシアパタイト結晶構造を有する骨芽細胞に分化し，Arizalin Red 染色，Real time RT-PCR などの結果より，骨芽細胞分化を増強することが示唆された。

以上の結果は，$Id2^{-/-}$-iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導モデルが新しいメカニズムの解析に対する有用なツールであることを示し，最終的には iPS 細胞を用いた効率的な再生医療技術の創生に繋がるものと期待され，博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。