The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state
Author(s)	王谷, 英達
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59823
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

【105】

氏名	王（おう）　谷（たに）　英（ひで）　達（たつ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　２５９３１　号
学位授与年月日	平成25年３月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state （転写因子を導入し皮膚線維芽細胞から軟骨様細胞を誘導する際に多能性状態を経由しない）
論文審査委員	（主査） 教　授　吉川　秀樹 （副査） 教　授　大薗　恵一　　教　授　仲野　　徹

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

関節軟骨の細胞治療において移植細胞の供給源は一つの課題となっている。誘導多能性幹細胞（iPS細胞）の開発により多能性幹細胞の利用が簡便となり、iPS細胞より目的の細胞（軟骨細胞）を分化誘導する方法が研究されている。この手法とは別に、我々は皮膚線維芽細胞にSOX9,Klf4,c-Mycの3因子を導入する事によりiPS細胞を経ずに直接目的の軟骨様細胞を作成できる事を報告した。しかしこの方法では山中4因子の内の2因子を使用しており、皮膚線維芽細胞より軟骨様細胞を誘導する際に細胞は未分化な細胞となっている可能性がある。再生医療において未分化な細胞の残存は腫瘍形成のリスクを孕んでいるため、軟骨様細胞の誘導過程について検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

6週齢のBL6マウスの皮膚線維芽細胞を採取し、レトロウイルスを用いてSOX9, Klf4, c-Mycの３因子を遺伝子導入した。レトロウイルス感染後より経時的にmRNAを採取し、real time RT-PCR法およびRT-PCR法で遺伝子発現を調べた。Real time RT-PCR法で線維芽細胞マーカーである1型コラーゲンα１，α2遺伝子が遺伝子導入後2日目より有意に抑制され、軟骨細胞マーカーである2型コラーゲンα1遺伝子が5日目より徐々に上昇しているのが確認された。またRT-PCR法にて多能性マーカーや初期中胚葉マーカー、初期内胚葉マーカーの発現を確認したが、軟骨様細胞の誘導過程においてこれらのマーカー遺伝子の発現を認めなかった。誘導過程にて細胞が多能性の状態を獲得しているかどうかをより詳細に調べるため6週齢のNanog-GFPトランスジェニックマウスの皮膚線維芽細胞から同様に軟骨様細胞を誘導し、GFPの発現を8時間ごとに撮影し確認した。コントロールとして山中4因子を導入した群では９日目頃よりGFPの発現を認めたがSOX9, Klf4, c-Mycの3因子を導入した群ではGFPの発現を認めなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

マウスの皮膚線維芽細胞にSOX9, Klf4, c-Mycの３因子を遺伝子導入した。遺伝子導入後早期に線維芽細胞マーカーが抑制され、次いで軟骨マーカーが上昇してきた。軟骨様細胞の誘導過程において未分化マーカーの発現は見られず、本手法は再生医療応用の際に問題となる未分化細胞の残存による腫瘍形成のリスクが少ない方法だと考えられた。

論文審査の結果の要旨

関節軟骨の再生医療では自分の軟骨細胞を別の部位から採取し利用する方法や、間葉系幹細胞を利用する方法がある。近年より簡便に多量の移植細胞を得るために、皮膚線維芽細胞を軟骨細胞に分化させる研究が報告されている。この研究ではSox9,c-Myc, Klf4という3つの遺伝子を利用しているがこのうちの２つはiPS細胞を作成する際に利用する遺伝子と同じ遺伝子であり、分化過程において腫瘍化のリスクとなる未分化細胞の発生が懸念される。論文発表者らは皮膚線維芽細胞を軟骨細胞に分化させる過程の遺伝子発現を解析し未分化細胞発生の心配が少ない事を報告した。この研究は皮膚線維芽細胞を軟骨細胞に分化させる研究の安全性評価を高めるものであり英文学術誌Biochemical and Biophysical Research Communicationsに掲載された。この研究は関節軟骨の再生医療研究を深化させるものと考えられ、学位授与に値するものと考えられる。