

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

清水俊博より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 533 号

学位申請者 : しみず としひろ
清 水 俊 博

学位審査論文: Derivation of integration-free iPSCs from a Klinefelter syndrome patient

(遺伝子挿入のないクラインフェルター症候群患者からの
iPS 細胞の誘導)

著 者 : Toshihiro Shimizu, Mami Shiohara, Toshihiro Tai, Koichi Nagao, Koichi Nakajima, Hideyuki Kobayashi

公 表 誌 : Reproductive Medicine and Biology (DOI:10.1007/s12522-015-0213-9)

論文内容の要旨 :

目的

クラインフェルター症候群 (KS) (47, XXY) はヒトにおいて最も一般的な性染色体異常である。KS は多彩な臨床的症狀に加え、非閉塞性無精子症 (NOA) による不妊症と関連があるとされる。NOA の基礎となるメカニズムは未だ理解されておらず、現在特定の治療方法もない。顕微鏡的精巣精子抽出手術 (マイクロ TESE) 後の体外受精が妊娠の成功をもたらすことが出来る唯一の方法である。

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の発展は、再生医療においても多くの可能性を秘めている。KS 患者由来の iPS 細胞の樹立は、KS の病原性メカニズムの研究及び新規治療法獲得の為に有用となり得る。今回の研究では、OCT4, SOX2, KLF4, そして C-MYC の 4 つの転写因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを使用し、KS 患者の精巣組織に由来する iPS 細胞の誘導を行った。さらに心筋様細胞に分化する能力を実証することにより、今回得られた iPS 細胞の多能性を確認した。

方法

KS 患者の精巣組織は、マイクロ TESE により得た。得られた精巣組織を分析した結果、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、および線維芽細胞で構成されており、精子細胞の存在は確認出来なかった。

組織を酵素消化し、解離した細胞を標準的 DMEM 培地において、5%CO₂ を含む 37°C 加湿大気条件下で 14 日間培養し、KS 精

巢由来線維芽細胞株を得た。得られた線維芽細胞に対し、OCT4、SOX2、KLF4、およびC-MYCの4つの転写因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを使用し遺伝子導入を行った。

KS由来精巣線維芽細胞は、センダイウイルス含有培地において、標準的培養液で24時間培養し、7日後にトリプシン処理により回収した。4 ng/mlのbFGFを加えた霊長類ES細胞培地を、MEFフィーダー細胞を配した10cmのディッシュに入れ、ここに回収した細胞を 5×10^4 個配置した。導入された細胞において、未分化幹細胞マーカーであるOCT4、NANOGの発現状況をRT-PCRを行い確認した。

続いて、得られた細胞の多能性について検証を行った。生体外(in vitro)試験として、細胞を8日間浮遊培養し胚葉体を形成、これに免疫細胞学的検査を行うことで、分化マーカーの発現状況を調べ、分化能力を確認した。

生体内(in vivo)試験として、SCIDマウス精巣内へ細胞の移植を行った。3ヶ月間腫瘍形成を確認し、組織学的検証を行った。さらに細胞分化能の質の確認の為に、心筋様細胞への分化誘導実験を追加した。

結果

導入約15日後にiPS細胞様コロニーを視認した。Gバンディング検査を行い、コロニーの染色体が47XXYであることを確認した。

Rt-PCRにてKS患者由来iPS様細胞がOCT4およびNANOGを発現している事を確認した。免疫細胞学的検査にてNANOG、OCT4、およびSSEA-4の発現を確認した。加えて、細胞が外因性の導入遺伝子やセンダイウイルス由来の遺伝子を発現していないことを確認した。形成した胚葉体は平滑筋アクチン、 α -フェトプロテイン、およびb III チューブリンを発現しており、三胚葉への分化能を示した。SCIDマウスの精巣内移植により奇形腫を形成し、組織学的分析を行った結果、KS由来のiPS細胞が生体内(in vivo)においても三胚葉に分化可能なことを示した。分化誘導実験において、培養14日後に、心筋様細胞コロニーの存在と、細胞の拍動を確認した。

考察

遺伝子修飾の無いKS由来のiPS細胞の樹立に成功した。

我々は以前レンチウイルスベクターを用いて正常及びKSヒト精巣組織由来のiPS細胞を樹立した。しかしレンチウイルスは、宿主ゲノムに統合され、強力な導入遺伝子の発現をもたらす性質があり、C-MYCのゲノムへの組み込みによる腫瘍発症可能性の増加が示唆されている。

センダイウイルスは、マイナス鎖一本鎖RNAウイルスで、宿主ゲノムに統合を行うことなく細胞質内で複製し、効率よくiPS細胞を誘導する。この性質により遺伝子修飾のないiPS細胞の樹立が可能となった。

最近の研究にて、ヒト体細胞やiPS細胞は、エピジェネティックな改変と遺伝子変異の両方を蓄積することが示されており、このことは細胞の質に影響を与えると考えられる。よって今後はiPS細胞を研究や臨床試験で使用する際に、質の評価が必要となる。

我々はiPS細胞の質の評価の為に、生体外(in vitro)での心筋様細胞に分化する能力を試験し、これに成功した事で、今回の細胞の多能性の可能性を強く示唆した。さらに生体外で胚葉体形成、生体内で三胚葉を含む腫瘍を形成することが可能な事も示した。以上の結果より今回の我々のKS由来iPS細胞が高品質の多能性iPS細胞であることを示した。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 533 号	氏 名	清 水 俊 博
学位審査担当者	主 査	森 田 峰 人
	副 査	鈴 木 啓 悦
	副 査	関 戸 哲 利
	副 査	杉 山 篤
	副 査	中 野 裕 康

学位審査論文の審査結果の要旨 :

生殖補助技術の発展により、現代日本では多くの体外受精児が誕生している。しかし、どのように高度な生殖医療をもってしても、生殖細胞のないヒトから新たに生殖細胞を作り出すことは不可能であった。このような生殖細胞を持たない不妊患者の一つである XXY 型性染色体異常を示すクラインフェルター症候群 (KS) は約 1000 人に 1 人の男性で見られる。多くはセルトリセル・オンリー・シンドロームであり、不妊治療時には生殖細胞が全くない深刻な雄性不妊疾患である。一方、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の発展は、再生医療においても多くの可能性を秘めており、KS 患者由来の iPS 細胞の樹立は、KS の病態解明及び新規治療法獲得の為に有用となり得ると考えられる。そこで、著者は、KS 患者の精巣組織に由来する iPS 細胞の誘導を行った。マイクロ TESE により得られた KS 患者の精巣組織から、KS 精巣由来繊維芽細胞株を得、OCT4、SOX2、KLF4 および C-MYC の 4 つの転写因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを使用して遺伝子導入を行った。結果、センダイウイルスベクターを用いて、遺伝子修飾の無い KS 由来の iPS 細胞の樹立に成功した。さらに、iPS 細胞の質の評価の為に、生体外での心筋様細胞に分化する能力を確認し、今回得られた細胞の多能性の可能性を強く示唆した。また、生体外で胚様体形成、生体内で三胚葉を含む腫瘍を形成することが可能な事も確認した。審査会は平成 28 年 1 月 25 日 17:00 から医学部 3 号館 2 階第 2 セミナー室にて関戸教授 (公務欠席につき書面審査) を除く 4 名の出席のもと行われた。研究要旨のプレゼンテーションの後に、活発な質疑応答がなされた。主な質問として、精巣由来繊維芽細胞を用いた理由は？、他の繊維芽細胞との違いは？、最終目的は生殖細胞の作製か？、精巣支持組織の作製か？、個人の検体を用いているが一般的な本疾患の解明につながる可能性はあるか？、iPS 細胞の分化能力の解析に cardiomyocyte への分化を取り上げた理由は？、一般的に“beating”のみで cardiomyocyte への分化と結論してよいか？、KS 由来の iPS 細胞は、KS 症例の不妊のメカニズムあるいは DM・CVD・癌のリスクが高い原因の解明に寄与する可能性が考えられるか？、KS による不妊症に対する iPS 細胞治療の臨床応用に関する基礎・臨床研究の今後の展望は？などが主査及び副査からなされた。それらすべての質問事項に対して、申請者は適切かつ論理的に返答した。以上より、本論文は、遺伝子修飾の無い KS 由来の iPS 細胞の樹立に成功し、本疾患に対する iPS 細胞を利用した治療の可能性、さらには iPS 細胞を利用した病態解明への可能性を示唆した意義は大きく、本研究は学位授与に値するとの結論に達し、公開審査を終了した。