

別紙 1 - 1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 井田 英臣

論 文 題 目

Establishment of a rapid and footprint-free protocol for differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic endocrine cells with synthetic mRNAs encoding transcription factors

(転写因子をコードした合成 mRNA を用いたヒト ES 細胞から膵内分泌細胞への迅速でフットプリントフリーな分化誘導技術の開発)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

小寺 泰弘 

名古屋大学教授

委員

有馬 寛 

名古屋大学教授

委員

中村 栄弟 

名古屋大学教授

指導教授

柳野 正人 

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

今回、既報の膵β細胞用分化培地に、転写因子をコードする遺伝子の合成 mRNA により転写因子を強制発現をさせることで、ヒト胚性幹 (hES) 細胞から成熟した膵β細胞へ高効率に分化誘導する技術開発を目標とした。膵β細胞の発生に重要とされている転写因子 PDX1 と NKX6.1 をコードする合成 mRNA を作製し、hES 細胞にリポフェクション法で導入した後、qPCR 法と免疫染色法で PDX1/NKX6.1 陽性細胞の発現を確認した。その後、PDX1/NKX6.1 陽性細胞を膵β細胞用分化培地により 3 次元培養し、qPCR 法と免疫染色法で膵内分泌ホルモンの発現を確認した。ほとんどのインスリン陽性細胞はグルカゴン、ソマトスタチンの発現も同時に認める polyhormonal な細胞であったが、一部では成熟した膵β細胞と考えられているインスリン単独陽性細胞を認めた。hES 細胞から成熟した膵β細胞への分化誘導において、既報の分化誘導法と比して短期間 (13 日間) で可能となった。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. リポフェクション法による転写因子の発現効率は、mRNA 導入時の培地、細胞密度、導入回数、導入時間などが関係している。PDX1/NKX6.1 陽性細胞の発現効率を高めるため、これらの最適化の条件検討を行い、分化誘導プロトコルを完成した。
2. 細胞を凝集させて、培養をすることで (3 次元培養)、膵β細胞への分化誘導効率が上昇することが報告されているが、これは細胞間相互作用が関係していると考えられている。PDX1/NKX6.1 陽性細胞を 2 次元で培養を継続しても、膵β細胞への分化誘導が認められなかったのに対して、凝集させ 3 次元培養することで、膵内分泌細胞への分化誘導が促進された。
3. 本法による膵β細胞の成熟化については、現方法では未だ不十分であり、さらなる成熟化が今後の課題である。本研究で転写因子の強制発現が有効であることが示されたため、MAFA、NGN3、NEUROD1 など他の膵β細胞への分化誘導に重要とされている転写因子を発現誘導することで、成熟した膵β細胞への分化誘導効率を高められる可能性がある。また、分化培地についても、メチオニン除去培地の併用や新たな化合物の添加が有効である可能性が考えられた。

本研究は、ヒト胚性幹細胞から膵β細胞への迅速で高効率な分化誘導法を確立した。糖尿病患者に対する将来の再生医療における技術開発に重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	井田 英臣
試験担当者	主査	小寺泰弘	副査 ₁	有馬寛
	副査 ₂	中羽孝男	指導教授	柳野正人
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none">1. リポフェクション法による転写因子の強制発現条件の最適化について2. 転写因子PDX1、NKX6.1発現誘導後の3次元培養の意義について3. 作製した膵β細胞の更なる成熟化を図る方法について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、腫瘍外科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				