

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 光本 一樹

論 文 題 目


Improved methods for the differentiation of hypothalamic vasopressin neurons using mouse induced pluripotent stem cells

(マウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた
視床下部バソプレシンニューロンの改善した分化誘導法)

論文審査担当者


名古屋大学教授

主 査 委員

若林 俊彦 


名古屋大学教授

委員

勝野 雅央 

名古屋大学教授

委員

菅 坂 孝 祥 

名古屋大学教授

指導教授

有馬 寛 

論文審査の結果の要旨

別紙1-2

今回、マウス人工多能性幹 (iPS) 細胞から視床下部 AVP ニューロンへの分化誘導効率を改善させる検討を行った。フィーダー細胞である mouse embryonic fibroblast (MEF) を用いない浮遊培養法を用いることで、維持培養における未分化状態の維持率を向上させた。一部神経およびグリア細胞へ分化した細胞は継代のたびに次継代への混入を避けることが可能であった。分化誘導法の改善については、Y-27632 を分化誘導初期に添加することで iPS 凝集体の成長が促進された。更に分化誘導後期に Fgf8b とヘパリンで処理することにより、AVP 前駆体マーカーである Orthopedia homeobox(Otp)、POU Class 3 Homeobox 2(Pou3f2) の発現が増加し、AVP ニューロンの陽性率が増加し、更に神経核様に集簇した。KCl 刺激による AVP 分泌は、Fgf8b およびヘパリン処理した群でより多かった。この結果、従来法より高効率に AVP ニューロンへ分化する培養法を確立した。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. 通常、培養細胞のストックはシングルセルで行う。今回 iPS 凝集体をシングルセルにせずに -80℃ で凍結し、液体窒素で 4 日間凍結保存したのちに解凍している。iPS 凝集体が成長したのちに継代を行い、再度 iPS 凝集体が成長したところで未分化マーカーの確認がなされ、維持されていた。iPS 凝集体の状態での凍結融解を行えることは、今後臨床応用される際に価値のある結果である。
2. 解凍直後に一時的に用いる MEF は細胞の分化誘導にとって不要な存在である。PKH26 を用い MEF を標識化したのちに、iPS 細胞を 4 継代し、iPS 凝集体と MEF の割合をセルソーティングにより解析した。2 回の継代後に MEF の汚染はほぼ認めなかったため、分化誘導に対して影響を与えないと考えられる。
3. これまでの AVP ニューロンの分散培養による初代培養において数日程度だったニューロンの生存期間が、3 次元培養を行った iPS 細胞由来 AVP ニューロンでは分化後 14 日程度まで生存している。その後は中心部より壊死していくと考えられている。これは、凝集体が増大する過程で脈管の存在しないことにより中心部に十分な栄養と酸素が到達しなかったことが大きいと考えられる。

本研究は、家族性中枢性尿崩症などの疾患特異的 iPS 細胞を使用した疾患モデル確立へ有効な手段となりうる知見を提供した。

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。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	光本 一樹
試験担当者	主査	若林 俊彦	副査 ₁	勝野 雅夫
	副査 ₂	菅 坂 孝 祥	指導教授	有馬 寛
(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. iPS凝集体を直接凍結・融解を行うことが可能であるかについて 2. 解凍直後に使用したMEFの混入の程度について 3. 分化誘導された神経細胞の生存期間について <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、糖尿病・内分泌内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>				