

## 論文内容要旨

しめい 氏名	いけだ まさかず 池田 雅一
学位論文題名	Regeneration of tracheal epithelium using mouse induced pluripotent stem cells マウス人工多能性幹細胞を用いた気管上皮再生
<p>背景：我々は気管欠損を来した症例に対し、従来の自家組織移植の代わりに人工材料を用いた欠損部再建を行っている。人工材料を用いた気管欠損部の再建術は人体への侵襲が低く美容的な側面でも優れているが、人工材料内腔面上の上皮化の遅延により人工材料の感染を来すことが課題とされる。本手法を成功へと導くためには、人工材料内腔面上の上皮形成が完了する期間の短縮が追求すべき課題とされている。本研究はマウス iPS 細胞から分化誘導させた気管上皮組織をヌードラット気管欠損モデルへ移植することにより、人工材料内腔面上の上皮形成において期間が短縮できる可能性を調査することである。【方法】マウス iPS 細胞から分化誘導させた気管上皮組織をヌードラットへ移植させるタイミングについて、パラフィン切片での組織学的所見とリアルタイム real time PCR 法で気道上皮の発現蛋白を検討した。iPS 細胞を 1 つあたり 1000 個の細胞数で形成した胚様体を activin A と <math>\beta</math>-FGF を含有した無血清培地中で 5 日間培養した。その後 Air liquid interface (以下 ALI) 環境下で接着培養を行い、気管上皮組織への分化誘導を行った。移植するタイミングは ALI 環境下で培養を行っている iPS 細胞を継時的に評価した。組織学的所見として Hematoxylin Eosin 染色と蛍光免疫染色によって肉眼的に線毛上皮構造が確認できることと、遺伝子学的評価として real time PCR 法にて線毛上皮のマーカーの <math>\beta</math>-tubulin IV と FoxJ1 の増加と未分化な iPS 細胞のマーカーである GFP と nanog の減少を認めることと設定した。iPS 細胞から分化誘導された気管上皮の動物モデルへの移植は iPS 細胞由来の気管上皮は I 型コラーゲンゲルに包埋させ気管欠損部を覆う人工材料の内腔面は塗布して移植した。気管欠損動物モデルは 7-9 週齢のヌードラットを用いた。ALI 環境下で接着培養を行い気管上皮への分化を確認した胚様体が包埋された人工材料を移植したものを「ALI model」とした。比較対象は ALI 環境下で接着培養を開始する前の状態の胚様体をコラーゲンゲルに包埋した「without ALI model」、胚様体を包埋していないコラーゲンゲルのみを塗布された「control model」とした。人工材料移植後 7 日目に気管を周囲組織とともに一塊に摘出し組織学的に評価した。【結果】接着培養開始後 26 日目の胚様体中に線毛様構造を認め、ここに <math>\beta</math>-tubulin IV の染色を確認できた。接着培養開始後 26 日目の胚様体は線毛上皮マーカーの増加と未分化マーカーの減少を確認できた。ALI model において iPS 細胞由来の線毛上皮構造が人工材料内腔側に生着していることが確認できた。蛍光免疫染色にて線毛様構造には <math>\beta</math>-tubulin IV の発現を確認でき、上皮構造にはタイトジャンクションのマーカーである ZO-1 の発現を確認できた。【考察】本研究の結果は気管上皮組織の再生医療において iPS 細胞の有効性を示唆するものと考えられる。</p>	

## 学位論文審査結果報告書

氏名 池田 雅一

学位論文題名 Regeneration of tracheal epithelium using mouse induced pluripotent stem cells  
(マウス人工多能性幹細胞を用いた気管上皮再生)

上記学位論文の審査は、平成29年2月15日に行われた。はじめに申請者から論文内容について説明があり、質疑応答が行われた。

本研究は、iPS細胞から誘導された胚様体を気相-液相境界培養(ALI culture)することで作成される気管上皮様の細胞の生体内への移植に至適な培養期間を決定することを主な目的としている。このため、培養の総期間12、19、26、33日の後、胚様体を、組織学、免疫組織化学およびRT-PCRを用いて調べた。この結果、腺管様構造はどの培養期間でも認められたものの、線毛様構造、線毛特異的な $\beta$  tubulinやタイト結合特異的なZO-1の発現は培養26日以降のものにのみ認められた。さらに、これに一致して、線毛特異的な遺伝子の発現の上昇と未分化マーカーの低下が認められた。これらの結果に基づき、培養26日の胚様体が移植に適していると判断し、人工気管上のコラーゲンゲル内に胚様体を包埋した形で、気管欠損ヌードラットに移植し、7日後に調べた。この結果、気管の欠損部近傍にiPS細胞に由来する線毛上皮様細胞が腫瘍を形成することなく生着していることが確かめられた。しかし、気管内腔を覆う上皮の形成は認められなかった。発表後の質疑では、結果の解釈、追加の実験の必要性、臨床応用に向けての今後の課題などについての質問やコメントが出され、これに対して申請者は的確に応答を行った。

これらを受けて、審査委員は、(1)本研究は気管欠損に対するiPSを利用した再生医療の実現に向けての基盤的な研究で、新規な所見を含んでおり、今後の研究の進展に資するものであること、(2)本研究の結果はすでに査読付きの英文国際誌にFull paperとして掲載されており、形式的にも問題が無いこと、(3)申請者が筆頭著者として本研究を主として行ったと認められることの3点を確認し、本論文は学位論文として相応しいという意見で一致した。

論文審査委員	主査	八木沼洋行
	副査	藤森敬也
	副査	鈴木弘行