



Potential of laryngeal muscle regeneration using induced pluripotent stem cell-derived skeletal muscle cells

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2019-01-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Dirja, Bayu Tirta メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000219

論文内容要旨

しめい 氏名	でいるじゃ ばゆ ているた Dirja Bayu Tirta
学位論文題名	Potential of laryngeal muscle regeneration using induced pluripotent stem cell-derived skeletal muscle cells マウス iPS 細胞由来筋細胞による甲状披裂筋再生
<p>喉頭の外傷、炎症、癌等により起こる反回神経麻痺は甲状披裂筋の萎縮を来し、それに伴う音声障害、息切れ、誤嚥は患者の QOL を低下させる。このため、萎縮した甲状披裂筋を速やかに再生させるための新たな治療法の開発が急務とされている。本研究の目的は、自己複製能と多分化能を併せ持つ iPS 細胞を筋細胞へ分化誘導し、萎縮した甲状披裂筋を速やかに再生させることである。</p> <p>iPS 細胞から分化誘導させた筋細胞を甲状披裂筋萎縮モデルに移植させた後に iPS 細胞由来筋細胞の生着を評価するために、蛍光標識された tdTomato-iPS 細胞を使用した。これにより移植後に tdTomato の発現を蛍光顕微鏡下でリアルタイムに可視化することができる。この tdTomato-iPS 細胞の未分化性を評価するために、未分化マーカーを用いて RT-PCR 解析を行った。さらに、遺伝子レベルで解析するために、リアルタイム RT-PCR によって未分化マーカー(Nanog, GFP)、筋未熟マーカー(Pax3, Pax7)、筋成熟マーカー(MyoD, Myogenin)の発現量を解析した。次に tdTomato-iPS 細胞から胚様体を形成し、ウマ血清を用い、筋細胞への分化誘導を行った。分化誘導させた細胞から経時的に RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR で解析した。全身麻酔下にヌードラットの左気管食道溝の左反回神経を損傷させ甲状披裂筋萎縮モデルを作製し iPS 細胞から誘導した筋細胞を移植した。</p> <p>tdTomato-iPS 細胞の未分化性を評価した結果、Sox2, Oct3/4, Nanog, Rex1, Nanog 制御領域下の GFP の発現が確認されたことから、tdTomato-iPS 細胞の未分化性が維持されていることが示唆された。また分化誘導した細胞の分化状態を経時的に観察したところ、接着培養 20 日目において筋線維様構造が観察された。未分化マーカーである Nanog, GFP の発現量は経時的に下がり、筋未熟マーカーである Pax3, Pax7 の発現量が一過的に上昇し、その後、筋成熟マーカーである MyoD, Myogenin の発現量が上昇した。また、免疫染色においても筋細胞マーカー陽性細胞を検出できたことから、成熟した筋組織への分化誘導が示唆された。ヌードラットの左反回神経損傷 4 週後に声帯を摘出し、HE 染色によって形態を観察した結果、左甲状披裂筋において萎縮が確認された。このようにして作製されたモデルに tdTomato-iPS 細胞から分化誘導した筋細胞を移植した結果、筋細胞マーカー陽性かつ tdTomato 陽性細胞の生着が左甲状披裂筋において確認された。以上のことから、iPS 細胞から筋肉へ分化誘導した分化細胞を利用することで、萎縮した甲状披裂筋の速やかな再生を期待できることが示唆された。</p>	

※日本語で記載すること。1200字以内にまとめること。

学位論文審査結果報告書

平成 29 年 12 月 21 日

学院医学研究科長 様

下記のとおり学位論文の審査を終了したので報告いたします。

【審査結果要旨】

氏名：耳鼻咽喉科学講座 Dirja Bayu Tirta 先生

論文題名：マウス iPS 細胞由来筋細胞による甲状披裂筋再生

各種疾患に伴う反回神経麻痺は甲状披裂筋の萎縮を来し、結果として嗄声や誤嚥など重篤な QOL の低下を来す病態である。現在のところ有効な治療法はなく臨床的にも大きな課題である。本研究はこのような病態を念頭に、iPS 細胞を用いて、横紋筋細胞へ分化誘導し、萎縮した甲状披裂筋の再生の可能性を探ったものである。

研究の成果は以下のとおりである。

まず、tdTomato-iPS 細胞という蛍光標識した iPS 細胞を用い、ウマ血清下に筋細胞への誘導を、各種未分化マーカー、筋組織マーカーを用いて確認した。

さらに、ラット反回神経損傷モデルを作成し、上記の誘導筋細胞を移植し生着を確認した。

その結果、iPS 細胞の培養後 20 日で筋線維様の構造を確認し、未分化マーカーの低下と筋未熟マーカーの一過性の上昇および筋成熟マーカーの発現上昇を確認し、筋組織への分化誘導を明らかにした。また、分化を確認した iPS 由来筋細胞を萎縮した甲状披裂筋近傍に移植したところ、筋細胞マーカー陽性、tdTomato 陽性の細胞の生着が確認された。

本研究は tdTomato-iPS 細胞を用い、iPS 細胞に由来する筋細胞が萎縮した甲状披裂筋周囲に生着再生しうることを明らかにした。これらの成果は反回神経障害患者における再生医療の可能性を示すものとして有意義かつ当該領域の今後の研究に大いに資するものと判断する。以上より本学学位授与に価するものと考えられる。

論文審査委員：主査：呼吸器外科学講座

副査：産婦人科講座

副査：歯科口腔外科

教授 鈴木弘行

教授 藤森敬也

准教授 長谷川博