

## 論文審査の結果の要旨

氏名：河野英輔

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Derivation of neural crest cells from human dental pulp-derived induced pluripotent stem cells

（ヒト歯髄細胞由来 iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導）

審査委員：(主査) 教授 浅野正岳  
(副査) 教授 佐藤秀一 教授 今井健一  
教授 鈴木直人

細胞を用いた歯の再生医療が注目されているが、歯を完全に再生する方法は未だ確立されていない。歯の発生に関わる細胞の一つとして神経堤細胞（neural crest cells：NCCs）が挙げられる。上皮細胞と間葉細胞の相互作用により歯は発生するが、NCCs からは象牙芽細胞などの間葉細胞が分化するため、多能性幹細胞から NCCs に分化誘導させることができれば、歯や顎骨などの顎顔面領域の再生医療にとって有益な細胞源となる可能性がある。そこで本研究では、Bajpai ら（2010）が報告したヒト ES 細胞からの神経堤細胞誘導法を応用し、ヒト乳歯歯髄細胞由来 iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導を行うことを目的とした。

iPS 細胞は、日本大学歯学部附属歯科病院にて抜去した乳歯の歯髄細胞から作製したものを使用した（倫許 2010-7）。NCCs への分化誘導法は、iPS 細胞を 96 ウェルの低接着プレートに 20mM の Y-27632 を含む neural induction medium 中で浮遊培養を行い、ニューロスフェアを作製した。浮遊培養 8 日後、ニューロスフェアをフィブロネクチンコートした培養皿に移した。そして接着したニューロスフェアよりロゼット構造が出現し、細胞が外生した。ロゼット構造を除去後、残った細胞を NCCs とした。細胞特性の解析として、real-time PCR による遺伝子解析、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析、および蛍光抗体法により、NCC マーカーおよび iPS 細胞マーカーの発現を調べた。さらに、細胞増殖能に関しては、コロニー形成能、WST-8 アッセイを用いた細胞増殖能の評価、およびフローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。一方、分化能の評価は、*in vitro*における骨芽細胞、シュワン細胞への分化誘導実験、および *in vivo*における組織形成能の検討として、ヌードラットへの移植実験を行った。

その結果、以下の結論を得た。

1. 乳歯歯髄細胞由来 iPS 細胞から NCCs を誘導することができた。
2. NCCs は増殖能、コロニー形成能を持ち、MSC 増殖培地での培養により、neural induction medium と比較してより高い増殖能を示した。
3. NCCs は多分化能を有していた。

以上、ヒト乳歯歯髄細胞より作製した iPS 細胞から NCCs を誘導し得ること、また誘導された NCCs が骨芽細胞、シュワン細胞への分化能、および骨、軟骨への組織形成能を有することが明らかとなり、歯の再生医療にとって有益な細胞源となる可能性が示唆された。本研究の結果は、基礎歯科医学および再生医療分野の研究発展に寄与するものと考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 29 年 3 月 8 日