

## 論文審査結果報告書

論文提出者氏名 長尾 怜美

学位論文題目 Expression of Neuropeptide Receptor mRNA during Osteoblastic Differentiation of Mouse iPS Cells

審査委員	(主査)	自見 英治郎	印
	(副査)	竹内 弘	印
	(副査)	瀬田 祐司	印

### 論文審査結果の要旨

**【研究目的】**人工多能性幹細胞 iPS 細胞は、特定の刺激にตอบสนองして目的の細胞へ分化する万能細胞であり、再生医療への応用が期待されている。一方、近年中枢神経系による骨代謝調節機構が注目されているが、未分化間葉系組織から骨芽細胞への分化段階における神経ペプチドの関与はよくわかっていない。今回、我々は、マウス歯肉線維芽細胞由来の iPS 細胞から骨芽細胞への分化過程において、神経ペプチド受容体の発現を検討した。

**【方法】**Mitomycin C 処理した SNL フィーダー細胞の上に歯肉線維芽細胞由来マウス iPS 細胞を播種し、浮遊培地で胚様体を形成した。3日後、5日後にレチノイン酸を添加し、胚様体を接着培地に移し、アスコルビン酸、 $\beta$ グリセロリン酸およびデキサメサゾンを含む骨芽細胞誘導培地で4週間培養し、骨芽細胞分化を誘導した。対象群として非誘導培地においても同様に4週間培養した。培養期間を iPS 細胞未分化能維持期、胚様体形成期、骨芽細胞分化前期および後期の四段階に分け、各培養期間より全 RNA を調製し、未分化マーカーの *oct3/4*, *nanog*, 中胚葉マーカーの *brachyury*, 骨芽細胞マーカーの *osteocalcin*, 知覚神経系の *NK1-receptor(R)*, *CGRP-R*, 交感神経系の  *$\alpha$ 1-adrenergic-receptor(AR)*,  *$\alpha$ 2-AR*,  *$\beta$ 2-AR*, *NPY1-R*, および *NPY2-R* の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。さらに *CGRP-R*,  *$\beta$ 2-AR*, および *NK1-R* の mRNA の発現を Real-time PCR にて経時的に調べ、 *$\beta$ 2-AR* のタンパク質発現を抗  *$\beta$ 2-AR* 抗体を用いた免疫染色法で確認した。

**【結果】**RT-PCR において *oct3/4* は iPS 細胞から胚様体3日目まで、*nanog* は胚様体5日目まで発現し、*brachyury* は胚様体5日目に発現した。骨芽細胞マーカーの *osteocalcin* は骨芽細胞誘導培地1週間目より発現した。また、von Kossa 染色においても骨形成を確認した。非誘導培地では骨形成が確認できなかった。 *$\beta$ 2-AR*, *CGRP-R* は未分化維持段階より発現がみられ、*NK1-R* は骨芽誘導培地初期より、 *$\alpha$ 1-AR* は後期より発現が確認された。*NPY1-R* は未分化維持期において微弱な発現がみられ、 *$\alpha$ 2-AR*, *NPY2-R* は発現がみられなかった。Real-time PCR では、 *$\beta$ 2-AR*, *CGRP-R* は多分化維持期から発現し、骨芽細胞誘導培地1週間目で最も発現し、その後発現が減少した。一方、*NK1-R* は骨芽培地1週間から発現し、4週間で最も発現した。また  *$\beta$ 2-AR* は、未分化維持期では iPS 細胞のコロニーに一致して認められ、骨芽細胞では石灰化部に局在が強く確認された。

**【結論】** *$\beta$ 2-AR*, *CGRP-R* が iPS 細胞の未分化維持期から発現していたことにより、 *$\beta$ 2-AR* のリガンドである adrenaline, *CGRP-R* のリガンドである CGRP が未分化段階より骨芽細胞分化に関与している可能性が示唆された。*NK1-R* のリガンドである substance P(SP) は骨芽細胞分化後期に関与している可能性が示唆された。また、同じ知覚神経系である *CGRP-R* と *NK1-R* においても発現時期が異なることが分かった。

以上の結果より、本論文は、骨芽細胞分化過程における神経ペプチド受容体の発現変化を明らかにし、異なる神経ペプチドによる骨芽細胞の分化制御機構を示唆するものである。さらに審査員の質問に対しても概ね的確に答えられており、学位論文として価値あるものと判断した。