

# 論文要旨

氏名

長尾 怜美

## 論文の要旨

**【研究目的】**人工多能性幹細胞 iPS 細胞は、各種の細胞へ分化することができる万能細胞であり、特定の液性因子を加える事によって目的の細胞へと分化する。マウス iPS 細胞から骨芽細胞への分化は様々な方法が試みられており、近年その方法も確立しつつある。また、神経系の骨代謝制御機構への関係の可能性が示唆されていることにより、骨と神経の関係が明白になりつつある。しかし、未分化間葉系組織から骨芽細胞までの分化段階においては、どのように神経ペプチドが関与しているかは定かになっていない。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分化させ、その分化段階において、神経ペプチドレセプターの発現を調べた。

**【方法】**Mitomycin C 処理をした SNL フィーダー細胞の上にマウス 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、骨芽細胞誘導培地で4週間培養し、骨芽細胞を形成した。コントロール群として非誘導培地においても同様に4週間培養した。iPS 細胞未分化能維持期、胚様体形成期、骨芽細胞分化前期後期の四段階に分け、それぞれ RNA 抽出し、RT-PCR において未分化マーカーの 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, NPY2-R の mRNA 発現を調べた。発現した CGRP-R,  $\beta$ 2-AR, NK1-R の mRNA を real-time PCR にて経時的に調べ、 $\beta$ 2-AR のタンパク発現を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。神経レセプターの RT-PCR においては、 $\beta$ 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 において、 $\beta$ 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。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 の免疫染色法において、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。