

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論文提出者	小足 周平
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 (外部審査) 岐阜大学大学院医学系研究科 准教授 手塚 建一
論文題目	Zinc-Finger Nucleases を用いたヒト歯髄細胞における HLA ゲノム選択的遺伝子改変
論文審査の要旨	<p>2018年12月19日に、主査、副査同席の下で、以下の学位論文要旨の確認と学位審査が実施された。</p> <p>歯髄幹細胞は高い増殖能を持ち、埋伏智歯から採取した歯髄細胞は歯や骨といった硬組織に保護されているため、紫外線等による細胞の損傷が少ないこと、および、こうした歯髄幹細胞は、高効率にiPS細胞を樹立できることから、移植用細胞資源として大きく期待されている。一方、ヒト白血球抗原（HLA）は自己と非自己を区別する役割を果たすが、ドナー組織において、その遺伝子の座位する4つの領域(HLA-A, -B, -C, -DRB1)がハプロタイプホモである場合、レシピエント側のHLAハプロタイプの少なくとも一方とそれらが合致すれば、理論上免疫拒絶を回避できる。現在、HLA-B, -C, -DRB1の3つの領域がホモ（HLA-A*02, 33: B*44, -: C*14, -: DRB1*13, -）である歯髄細胞（DP144）が樹立されていることから、これを用いてさらにHLA-A領域がハプロタイプホモの歯髄細胞を作出できれば、移植拒絶反応を起こしにくい移植用iPS細胞バンクを比較的容易に構築することが可能であることが考えられた。</p> <p>それらの背景を踏まえ、申請者はゲノム編集の手法を用いて、DP144細胞のHLA-A*02領域に遺伝子変異を誘導し、発現を阻害することで、擬似的に日本人に出現頻度の高いHLAハプロタイプをホモ（HLA-A*33, N: B*44, -: C*14, -: DRB1*13, -）に持つ歯髄細胞の作出を試みた。遺伝子発現を阻害する方法としては、人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集を行った。CompoZr Custom Zinc Finger Nuclease（ZFN, Sigma-Aldrich）はZinc-finger motifと呼ばれるDNA結合ドメインと、DNA切断ドメインであるFokIエンドヌクレアーゼから構成されるプデスミドである。DP144細胞の持つHLA-A*02遺伝子領域を特異的に切断するZFNプラスミド（ZFN3-5, ZFN3-6）を作製し、DP144細胞に、NEPA21（ネッパジーン、千葉）によるエレクトロポレーションにより遺伝子導入した。</p> <p>この手法で遺伝子導入したDP144細胞群を、抗HLA-A*02-FITC抗体で蛍光標識したのち、フローサイトメトリー（FACS）を用いてHLA-02陰性分画の細胞を分取し拡大培養を行ったところ、HLA-A*02領域の発現が低く抑えられる細胞群が確認された。それらの遺伝子構造を調べると、約半数の細胞でHLA-A*02アレルの2本鎖DNAが特異的に切断され、細胞自身の持つDNA修復能によって、塩基の置換、欠失や挿入などの変化が誘導されていることが判明した。一方、これら</p>

細胞内の対立遺伝子上の HLA-A33 領域の DNA 配列には変化は見られず、発現も正常だった。

以上の事実から、以下に示す結果の要約と考察が導かれた。

- 1 DP144 細胞に遺伝子導入した結果、HLA-A*02 特異的 ZFN プラスミド (pZFN3-5, ZFN3-6) は HLA-A*02 領域へ変異を導入し、HLA-A*02 発現を有意に抑制していた。
- 2 HLA-A*02 陰性細胞の DNA 配列では、塩基の欠失、置換や、遺伝子配列の挿入といった、さまざまな変異が生じており、それらの変化により HLA-A*02 の発現が阻害されていることが示唆された。
- 3 pZFN3-5 および ZFN3-6 による DNA 改変のアリル特異性は非常に高く、対立遺伝子である HLA-A*33 に対するオフターゲット変異は認められなかった。

本論文の結論として、HLA-A*02 特異的に切断するよう設計した ZFN プラスミドは HLA-A*02 領域を選択的に切断し、欠失や挿入、置換、相同組み換え変異を誘導し、その結果、日本人出現頻度第 2 位の HLA 型を有する疑似的 HLA ハプロタイプホモ細胞の作出が可能であることが示された。今回の実験で得られた知見は、移植用 iPS 細胞バンクの構築に貢献し、再生医療の産業化の発展へ繋がると考えられた。

論文審査の結果、指摘された表現上の不適切な記載等については、主査、副査および外部審査委員の意見に基づき適正に修正がなされた。従って、本論文が博士（歯学）の学位論文に相応しい内容と体裁を備えていることが確認された。