

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 浅野 隆之

本研究はヒト胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES cell)を用いた再生医学研究において重要と考えられている、ES細胞に対する効率良く長期安定した遺伝子導入法の確立、及びES細胞を用いた同種細胞移植法の確立を目指すため、カニクイザルES細胞をモデルとして両者の確立を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. カニクイザル胚性幹細胞(CMK10株)に対して、サル免疫不全ウイルス(simian immunodeficiency virus; SIV)由来のレンチウイルスベクターを用い1, 10, 100 transducing unit /cellで遺伝子導入し、導入5日目に各58%, 82%, 92%とgreen fluorescent protein (GFP)の高い発現を認め、その後5ヶ月間、GFP発現率・平均蛍光強度は安定していた。サザンブロッティングの結果では、数ヶ月の培養後もポリクローナルを維持しており、GFPを強く発現する少数のクローンを観察しているのではないことを示した。
2. SIVベクターでGFP遺伝子を導入したカニクイザルES細胞は、初期分化を示す胚様体形成後も導入遺伝子の発現を認めた。SIVベクターを用いた遺伝子導入法では、導入遺伝子はサイレンシングを受けにくいことを示した。
3. カニクイザルES細胞とマウスES細胞(D3)に対してSIVベクターで遺伝子導入し、その導入効率を比較すると、カニクイザルES細胞はマウスES細胞よりもはるかに遺伝子導入効率が高かった。SIVベクターによる遺伝子導入効率は、細胞の種に依存して大きく変化する可能性があることを示した。
4. 別のカニクイザルES細胞株(CMK6)における遺伝子導入において、SIVベクターの内部プロモーターをCMVプロモーターからEF-1 $\alpha$ プロモーターに変更した場合はGFP遺伝子の発現増強をみた。また、CMVプロモーターに加えて、central polypurine tract, および woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory elementの配列を加えたベクターではCMVプロモーター単独に比べGFPの発現がはるかに増強した。以上より、ベクターを改良することで導入遺伝子の発現が増強することを示した。

5. あらかじめ SIV ベクターによって GFP 遺伝子を導入したカニクイザル ES 細胞 (CMK10), または電気穿孔法で GFP 遺伝子を導入して GFP を恒常的に発現するようになったカニクイザル ES 細胞亜株 (CMK6G) を未分化状態で妊娠前半 1/3 期 (満期 165 日) の同種サルの子宮内胎仔 (計 4 頭) に同種移植し, 1, 3 ヶ月後に胎仔を取り出したところ, 広範の胎仔組織に 0.01~1% の割合で移植細胞を検出した. 組織切片を GFP 配列に対する *in situ* DNA PCR 法で解析したところ, 検出された細胞は一個ずつ孤立して存在しており, 形態的に周囲の宿主細胞と区別がつかなかった. このことから, 妊娠前半 1/3 期胎仔に移植した ES 細胞は生着しており, 移植細胞に対して胎仔が免疫寛容であったことを示した.
6. 移植 1 ヶ月に取出した胎仔では腫瘍を全く認めなかったが, 移植 3 ヶ月後の胎仔では嚢胞状の腫瘍を胸腔内に認めた. 腫瘍は GFP 蛍光を発しており, *in situ* DNA PCR 法の結果, GFP 配列を含んでいたため, 移植した ES 細胞由来であることを示した. 腫瘍は様々な上皮系の細胞で構成されていた. なお, 移植部位である肝臓を含め広範の組織で移植細胞を検出したものの, 他の部位には腫瘍を認めなかった. 増殖を続ける胎仔組織には, 移植した ES 細胞がホーミングして生着する“スペース”が存在し, ES 細胞がそのような適切なスペースに付着した場合は適切な増殖・制御シグナルを受け生着し周囲に適応出来るが, 逆に移植細胞が胸腔内など適切なシグナルを得られない“不適切な”可能性が示唆されるスペースに漏出した場合には, 移植細胞が腫瘍を形成する危険性があることを示した.

以上, 本論文はヒト ES 細胞のモデルとしてカニクイザル ES 細胞を用い, SIV ベクターによる効率良く安定した遺伝子導入法を確立した. GFP を恒常的に発現するカニクイザル ES 細胞は, 遺伝子導入した細胞を直接かつ容易に検出できるため, ES 細胞の増殖・分化を *in vitro* で, また潜在的には *in vivo* でモニターすることができると考えられる. 更に, この遺伝子導入方法で, ヒト・サル ES 細胞に任意の遺伝子を導入できるようになると期待され, 霊長類 ES 細胞の基礎実験に対する重要な貢献をされると考えられた.

また, あらかじめ GFP 遺伝子で標識したカニクイザル ES 細胞を子宮内胎仔に同種移植し生着の確認を認め, これまで行われなかった霊長類 ES 細胞の同種移植を成功させた. 更に, 未分化状態で細胞移植した際の腫瘍形成の危険性を示し, 将来のヒト ES 細胞を用いた細胞移植療法に対する重要な貢献をなすと考えられた.

よって, 学位の授与に値するものと考えられる.