

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 松本 憲二

本研究はマウス胚性幹細胞(ES 細胞)から造血幹細胞を分化誘導する機構を解明するために、転写因子であるヒト HoxB4(HOXB4)を Tet-off system を用いて ES 細胞に過剰発現させながら OP-9 細胞と共培養して ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導する系を用いて、下記の結果を得ている。

1. ES 細胞から胚様体を形成し、4 から 7 日目に HOXB4 を過剰発現させて OP-9 細胞と共培養すると、各血球系譜を含むミックスコロニー(CFU-nmEM)が出現する。
2. 胚様体 6 日目(EB6)の CD41(+) c-Kit(+)細胞分画に HOXB4 を過剰発現させて OP-9 細胞と共培養すると CFU-nmEM が出現し、放射線照射後マウスに移植すると長期骨髄再建能を示す。
3. EB6 の CD41(+) c-Kit(+)細胞分画はブラストコロニーを作らず、ヘマンジオブラスト活性を持たないが、胎仔型赤芽球コロニー(EryP)は作り、胎仔型造血能を示す。また、RT-PCR で Runx-1、Gata-2、Scl、Brachyury、Flk-1 の発現が CD41(+) c-Kit(+)細胞分画で認められた。これらの結果より、この細胞分画が出現することで、ヘマンジオブラストから胎仔型造血および成体型造血の前駆細胞へと分化する初期段階の細胞が分かれるものと考えられた。ブラストコロニーは主に CD41(-) c-Kit(+)細胞分画で認められた。
4. EB6 の CD41 陽性細胞に HOXB4 を過剰発現させて OP-9 細胞と共培養すると c-Kit(+), CD34(+), CD41(+), CD45(-)の細胞表面パターンを持つ細胞分画に分化して、移植によって長期骨髄再建能を示すことが示された。この細胞分画においては HOXB4 を発現させることで Gata-2、Bmi-1 の発現が維持される事が分かつ

た。

5. ES 細胞由来の造血幹細胞を移植したレシピエントマウスの骨髄を調べると、HOXB4 を発現させたままでは移植細胞の殆どが Gr-1 Mac-1 陽性細胞であった。また Lineage 抗体陰性の細胞はレシピエント残存細胞と比較して c-Kit(+), CD41(+), CD45(-)細胞が多く認められた。さらにドキシサイクリンをレシピエントマウスに内服させて HOXB4 の発現を *in vivo* で抑制すると、T 細胞や B 細胞が認められるようになるが、全体のキメリズムは減少した。これらの結果より HOXB4 の強制発現は長期骨髄再建能に必要であるが分化に対して影響を与えることが分かった。

以上、本論文はマウス ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導させる過程において、胚様体形成中に出現する c-Kit(+), CD41(+ )細胞分画に造血幹細胞の前段階の細胞が存在し、この細胞分画に HOXB4 を過剰発現させ、OP-9 細胞と共培養することで造血幹細胞に分化することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、ES 細胞から造血幹細胞へと分化誘導させる機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位に値するものと考えられる。