

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 北野 真見

多能性幹細胞は自己複製能力と多分化能を有する。多能性幹細胞から機能細胞を誘導し移植治療に応用する再生医療の実現が期待されているが、移植片への未分化細胞混入による腫瘍形成が、この治療法の障壁となっている。形成される腫瘍は奇形腫と呼ばれ、三胚葉由来組織による多様な組織像を呈する。再生医療の危険因子であるにも関わらず、奇形腫の基盤性状に関する情報は未だ少ない。本研究は、代表的多能性幹細胞であるES細胞の同系移植モデルによる奇形腫形成の基盤研究を目的としたものであり、実際の臨床応用と同等の免疫条件を再現したものである。

第一章では、体内各部位（皮下、門脈、肝臓、脾臓、腎臓、精巣）に 3×10^6 個のES細胞を移植し、腫瘍形成の差異を検討している。腫瘍は門脈・精巣で高率に誘導されたが、皮下・脾臓では低率であった。肝臓・脾臓移植で移植部位外の病変が高率に認められたが、皮下・門脈・精巣移植では認められなかった。腫瘍の成長は皮下・精巣で緩徐であり、門脈移植で急速であった。門脈移植では肝臓に多発性病変を形成した。これら腫瘍形成の違いは、移植臓器の形態・機能的特性及び移植方法に起因すると考えられた。

腫瘍はいずれも三胚葉構造を有しES細胞由来奇形腫であることが示されたが、移植部位依存性の細胞構成を示した。肝臓移植では内胚葉マーカーFOXA2陽性管状構造が多く認められた。精巣奇形腫では、二種類の未分化細胞群の増殖が特徴的であった。すなわち、ロゼット形成細胞と、均一無構造淡明細胞に大別された。肝臓・門脈奇形腫では軟骨が多く誘導され、腎臓奇形腫では軟骨は正常組織と腫瘍組織との境界部に誘導された。腎臓奇形腫はウィルムス腫瘍様の管腔増殖像を呈した。肝臓及び門脈奇形腫では、明細胞腫瘍様PAS陽性管状乳頭状増殖が特徴的であった。以上のような腫瘍内組織構築の違いは、移植片と臓器環境の相互作用に由来すると考えられる。ES細胞の移植部位依存性組織構築は、本研究の同系移植モデルにおいて初めて明らかにされたものである。

第二章では、精巣奇形腫形成を詳細に検討している。第一節では精巣奇形腫の経時的成長を観察した。その結果、移植片は初期段階において間質に管状増殖し、続いて淡明細胞が出現した。未分化細胞及び胚細胞腫マーカー（OCT3/4、AP-2・、PLAP）を用いた免疫組織化学的検索で、ロゼット細胞に限定したOCT3/4及びAP-2・発現が確認された。淡明細胞では未分化マーカー発現は認められなかった。胚細胞腫マーカーPLAP発現はいずれも見られなかった。精巣奇形腫では、ロゼット形成未分化細胞が初期分化

を経て淡明細胞となり、精巣微小環境によって機能的分化を抑制され均一に増殖していると考えられる。

第二節では、30～3,000,000個のES細胞移植片を用いて、精巣での腫瘍リスクを検討している。ES細胞のみを移植する群（ES群）と、汚染移植片の再現を目的として、ES細胞とマウス線維芽細胞(MEF)の共移植群(ES+MEF群)を用意した。腫瘍形成はES細胞数に比例したが、ES+MEF群では腫瘍リスクが亢進し、ES細胞の腫瘍形成能は未分化細胞数及び移植片環境の両方に影響されることが明らかとなった。本研究における30個ES細胞による腫瘍形成はこれまでの報告では最小であり、臨床応用に当たり未分化細胞混入のリスクに慎重な検討が必要であることが示された。

第三節では、抗アンドロゲン薬flutamideが精巣奇形腫の未分化細胞増殖に及ぼす影響を検討した。3 x 10⁶個ES細胞を精巣に移植し、flutamideを処置した。その結果、腫瘍形成に変化は見られず、本実験の抗アンドロゲン処置は精巣奇形腫形成に影響しないことが確認された。

なお、Appendixでは、in vitro膀胱分化誘導モデルを用いて、ES細胞の膀胱前駆細胞分化誘導過程における網羅的経時的遺伝子発現解析プロファイルを行っている。その結果、内胚葉分化を示唆する形態変化及び膀胱分化関連遺伝子の誘導が生じるものの、膀胱機能特異的な遺伝子の誘導に至らず、インスリン免疫組織化学による陽性像は培地中インスリンの沈着を示唆するものであった。したがって、得られた細胞は膀胱前駆細胞と同定された。本研究で得られたような機能的分化に至らない前駆細胞の移植応用に際しては、腫瘍の危険性を詳細に検討しなければならない。

上記の通り、本論文は未分化ES細胞の同系移植に伴う奇形腫形成について多数の知見を明らかにした。多能性幹細胞を用いた移植治療においては、腫瘍形成に関して、移植片の定着性、宿主臓器との相互作用、移植片環境の影響など、多面的かつ慎重な検討が必要であることを明らかにした。よって、審査委員一同、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。