

論文の内容の要旨

論文題目

ヒト胚性幹細胞からの成熟好中球誘導およびその性状・機能解析

指導教員 千葉 滋 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 横山 泰久

I. 緒言

好中球は、外部異物に対する生体防御の中核を担う細胞である。その数の減少や機能異常は易感染状態につながる。これに対処するため顆粒球輸血が試みられており、いくつかの臨床試験では有効性が示唆されているが、ドナーを必要とすることによる種々の問題が生じている。そのため造血幹細胞や前駆細胞を体外で増幅し好中球特異的に分化させる試みがなされているが、得られる好中球数の不足などにより臨床応用には至っていない。

ヒト胚性幹細胞(hESC)は多分化能と半永久的増殖能を持ち、再生医療への応用が期待されている。血液細胞については、OP9 細胞との共培養や胚様体(EB)形成により血液前駆細胞へ誘導可能なことがすでに示されているが、効率的な成熟血球誘導法の報告はほとんどなく、特に好中球については機能評価可能なレベルでの誘導法の報告はない。hESC から効率的に成熟好中球を誘導することが可能になれば臨床応用への可能性につながる。しかし、体外で培養された細胞の臨床応用を考える際には、その細胞のもつ性状・機能を詳細に検討することが重要である。これらの背景から、hESC からの効率的な成熟好中球誘導法を開発するとともに、その性状・機能の詳細な解析を行い、末梢血から分離した正常好中球と比較した。

II. 方法

hESCであるKhES-3を未分化な状態で維持し、6日ごとに継代した。継代後6日目のKhES-3をコロニーのままはがしEBを形成し、24時間後から骨形成タンパク-4 (BMP-4)(R&D) 25 ng/mL、幹細胞因子(SCF) 50 ng/mL、Flt-3 リガンド(FL) 50 ng/mL、インターロイキン(IL)-6/IL-6 受容体キメラタンパク(FP6) 50 ng/mL、トロンボポイエチン(TPO) 20 ng/mLを加えた。EB形成開始時から18日間後、EBを破壊して単一細胞とし、放射線照射したOP9細胞上で約2週間培養を行った。前半7日間は100 ng/mLのSCF・FL・FP6および10 ng/mLのTPO・IL-3を加え、後半6~7日間は50 ng/mLの顆粒球刺激因子(G-CSF)を単独に加えた。このようにして得られたhESC由来成熟好中球(hESC-Neu)とデキストラン沈降法によって健常成人末梢血から分離した好中球(PB-Neu)とを、形態面および機能面から比較した。形態評価としてWright-Giemsa染色や電子顕微鏡による観察、フローサイトメトリーによる表面形質解析などを行い、機能評価としてジヒドロローダミン123(DHR)による活性酸素産生検出、ニトロブルー・テトラゾリウム(NBT)コート酵母貪食試験、修正Boyden法による走化能評価を行った。

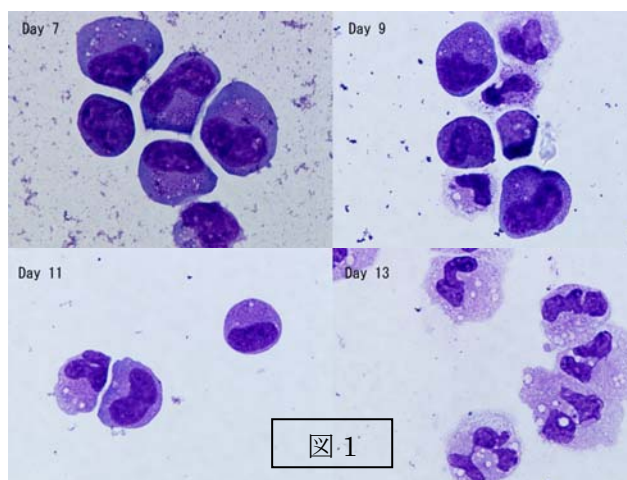
DHRは活性酸素類である過酸化水素によってローダミンへと酸化され、蛍光を発するようになり、これをフローサイトメトリーによって検出した。

NBTコート酵母貪食試験では、NBTをコートした酵母を好中球に貪食させることで、酵母の貪食能と、それに引き続く、酵母に付着したNBTを還元する能力を同時に視覚化した。評価は、貪食率(好中球100個中、陽性酵母を1個以上持つものの割合)および貪食スコア(好中球100個中の、陽性酵母数の総和)によって行った。

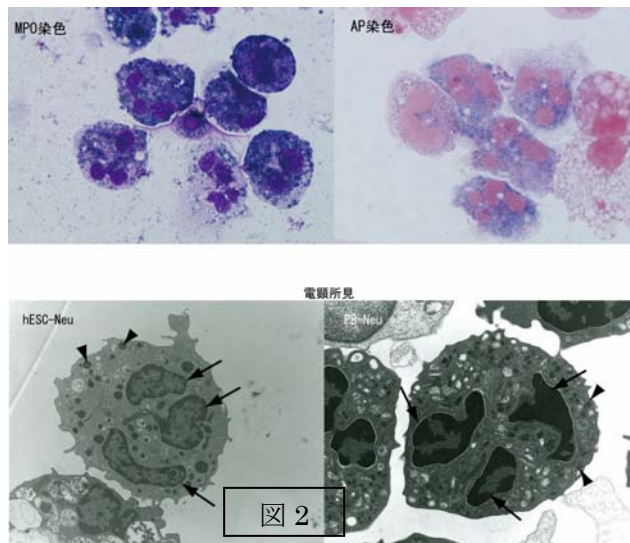
修正Boyden法では、半透膜に隔てられた上層に細胞懸濁液を、下層に細胞を含まない反応液を入れると細胞が上層から下層へと遊走することを利用し、下層に走化因子を入れる場合と入れない場合とを比較して走化性を検討した。走化因子としてはfMLPを用いた。

III. 結果

上記方法により、形態的に十分成熟した好中球が得られた(図1)。形態上、骨髓芽球から成熟好中球(桿状核および分葉核好中球)まで各段階の細胞が正常の生体内と同じように順にみられた。OP9細胞との

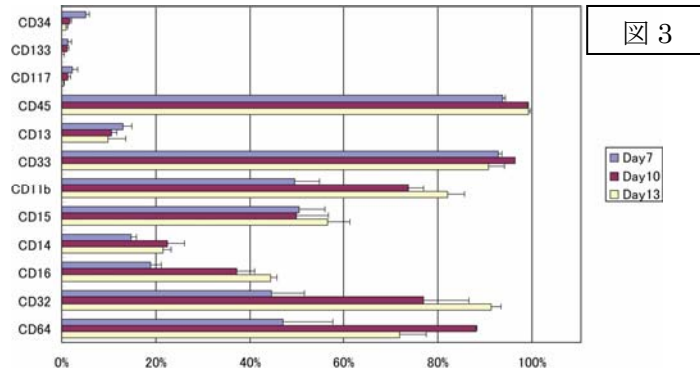


共培養開始後 Day 13 の細胞集団では、後骨髄球以降の細胞が全体の約 90%を占め、うち約 80%が成熟好中球であり、高純度な成熟好中球が得られた。ミエロペルオキシダーゼ染色、アルカリフォスファターゼ染色による観察所見や、電子顕微鏡像も PB-Neu と同様であった(図 2)。

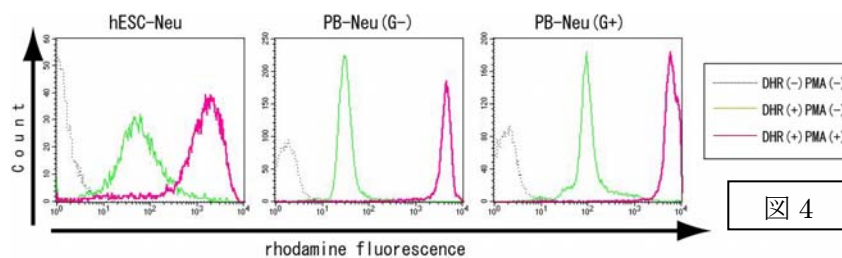


表面形質解析では、CD45 の発現、まだ未分化な Day 7

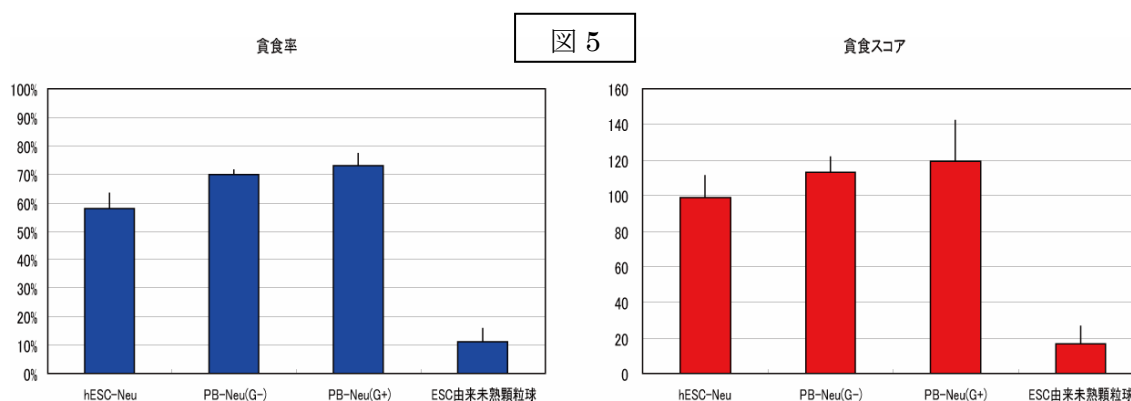
における CD34・117 の発現、骨髄球系マーカーである CD33・15・11b の発現、好中球特異的マーカーである CD16 の分化進行に伴う発現率上昇、など、正常造血と同様の発現パターンがみられた。一方、一部の好中球では、通常発現を認めない CD14 や CD64 を発現している、あるいは本来発現しているべき CD15 や CD16 を発現していない、と考えられた(図 3)。



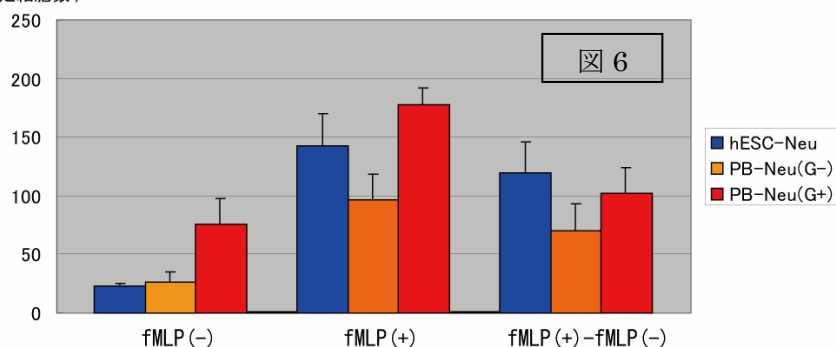
DHR を用いた活性酸素産生能の評価では、hESC-Neu は PB-Neu と同等の活性酸素産生能を有し、PMA 刺激に対する反応も保持していた(図 4)。



NBT コート酵母による食食・NBT 還元能をみる試験では、hESC-Neu は食食率が PB-Neu よりやや低かった。食食する酵母数を加味した食食スコアは同等であった(図 5)。



修正 Boyden 法を用いた走化性の評価では、走化因子のないランダムな遊走について、hESC-Neu は G-CSF (遊走細胞数) 刺激を受けているにも関わらず、PB-Neu(G+)より低下しており、PB-Neu(G-)と同程度であった。走化を示した細胞数については hESC-Neu と PB-Neu とで同等であった(図 6)。



IV. 考察

今回、私は hESC からの特異的分化誘導法を開発し、詳細な機能解析を可能とした。それにより、hESC-Neu と PB-Neu との異同が明らかとなり、体外で培養された細胞を臨床応用するにあたってはその性状・機能を十分吟味しなければならないことを再確認した。

Wright-Giemsa 染色による観察や電子顕微鏡像からは hESC-Neu は十分に成熟した好中球と判断され、PB-Neu と同等であった。しかし、表面形質には差を認め、特に本来末梢血では単球・マクロファージでのみ発現する CD14 や 64 を hESC-Neu が発現していた。健常人においても、G-CSF を投与すると末梢血に CD64 や CD14 が陽性の好中球が出現することが知られており、この効果は骨髓前駆細胞に G-CSF がはたらくことによる。本培養法では Day 7 の骨髓芽球・前骨髓球以降の細胞に対し G-CSF を用いて分化誘導を行っており、そのため通常とは異なる表面形質発現パターンを獲得した可能性がある。CD64 は高親和性

の Fc γ レセプターであり、健常人に G-CSF を投与した場合の検討において、CD64 を発現した好中球では抗体依存性の細胞障害能が強くなることが知られている。hESC-Neu においてこのような現象がみられるかは今後検討しなければならない。また、顆粒球輸血の重大な副作用である輸血関連急性肺障害に、ヒト好中球抗原などが関連することが知られており、hESC-Neu における発現パターンも興味もたれる。

活性酸素産生能は hESC-Neu と PB-Neu は同等であった。末梢血 CD34 陽性細胞から誘導した好中球では、活性酸素産生能が培養条件によって変化するとの報告があり、その系では培養の後半に G-CSF のみを加えた場合に得られる好中球は定常状態にあるとしている。hESC-Neu も後半は G-CSF のみを加えており、上記と同様に定常状態に近いと推測される。

修正 Boyden 法による走化能を検討した実験では、fMLP に対する走化性は hESC-Neu と PB-Neu では G-CSF 刺激の有無によらず変化はなかったが、ランダムな遊走は、hESC-Neu も G-CSF 刺激を受けているにもかかわらず、PB-Neu(G+)で有意に高かった。*in vitro*の実験において、G-CSF はランダムな遊走を上昇させることが知られている。一方、*in vivo*において G-CSF を投与された患者から採取した好中球では、ランダムな遊走や走化性は障害されとの報告がある。hESC-Neu でランダムな遊走が上昇も低下もせず、また走化性の障害もないのは、(1)末梢血好中球はすでに成熟した状態にあるのに対し、*in vivo*での投与や hESC 由来好中球では G-CSF が前駆細胞の状態からはたらいしていること、(2)*in vivo*の場合は最後の G-CSF 投与から実験までに時間が経っているが、hESC 由来好中球では実験終了まで G-CSF 刺激が入っていること、などが影響している可能性がある。

今回、私は hESC からの高純度な成熟好中球誘導に成功し、その機能解析を可能にした。得られた hESC-Neu は形態や機能の面で PB-Neu とほぼ同等であり、薬剤感受性試験や *in vitro*での研究などで PB-Neu の代替として用いることができる可能性がある。一方で、表面形質や貪食能・遊走能などの機能の一部に、PB-Neu とは異なる面があることも明らかとなった。より効率的な増幅が可能となった場合、好中球輸血などの臨床応用の可能性も広がるが、倫理面や奇形腫の形成など hESC 特有の問題、培養過程における OP9 細胞や FBS など異種由来成分の混入といった問題以外に、体外培養に起因すると思われる上記のような機能の相違が生体に与える影響について十分に検証されなければならない。これは hESC-Neu に限らず体外で増幅された細胞を臨床応用する場合に共通する問題と考えられ、今後の再生医療において熟慮されなければならない問題である。