

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 横山泰久

本研究は再生医療への応用が期待されているヒト胚性幹細胞(hESC)を用い、将来の顆粒球輸血への応用に向け、hESC から成熟好中球を効率的かつ特異的に分化誘導する方法を初めて確立したものであり、さらに得られた好中球(hESC-Neu)を正常末梢血好中球(PB-Neu)と比較することにより、性状・機能の異同を明らかにし、今後の臨床応用の可能性と課題を示したものである。本研究により、下記の結果を得ている。

1. hESC から胚様体(EB)を形成し、24 時間後から骨形成タンパク-4 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 存在下に 17 日間(EB 形成時から 18 日間)培養した。EB を破壊し単一細胞とし、放射線を照射した OP9 細胞上で SCF・FL・FP6 各 100 ng/mL および IL-3・TPO 各 10 ng/mL を加え 7 日間培養し、さらにサイトカインを顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF) 50 ng/mL 単独に変更して 6~7 日間培養した。この方法によって、骨髄球以降の顆粒球約 90 %、顆粒球中の成熟好中球(桿状核および分葉核好中球)約 80 %の、高純度な好中球集団が得られた。
2. OP9 との共培養開始時を Day 0 とすると、Wright-Giemsa 染色による形態観察では、Day 7 の細胞集団は骨髄芽球・前骨髄球からなり、以降は正常造血と同様に骨髄球・後骨髄球を経て、Day 13 には桿状核好中球・分葉核好中球が大部分を占めるようになった。また、hESC-Neu のミエロペルオキシダーゼ染色陽性率は 97.3 ± 1.5 %、好中球アルカリフォスファターゼスコアは 284 ± 8.6 であった。電子顕微鏡による観察では、分葉した核と大小の細胞内顆粒が観察された。これらの所見は、正常好中球と同様のものである。
3. フローサイトメトリーによる表面形質の解析では、CD34・CD117 は Day7 でわずかに残存し、その後発現はほぼ消失した。CD45 はほぼ 100 %発現していた。CD33・CD15 も全経過を通じて発現し、また CD11b は分化の進行につれて発現率が上昇した。好中球特異的な CD16 は Day10 ごろから発現が強くなった。以上は正常造血における経過と矛盾しない結果であった。しかし、CD16 は Day 13 でも発現率は 44.5 ± 1.2 % であり形態による判断より低値であった。正常末梢血好中球は、CD15・CD11b 陽性かつ CD16 陽性で、さらに CD14 陰性である。hESC-Neu は CD15・CD11b 陽性細胞の 63.3 ± 2.6 %が CD16 陽性であった。一方、CD15・CD16 陽性である成熟好中球と考え

4. hESC-Neu と PB-Neu の機能の比較を行った。hESC-Neu の培養に用いられる G-CSF の影響を考慮し、PB-Neu は G-CSF で 15 分間刺激したもの(PB-Neu(G+))と刺激しないもの(PB-Neu(G-))について解析した。まず、ジヒドロローダミン 123 を用いた好中球の活性酸素産生能測定では、hESC-Neu と、PB-Neu(G+)・(G-)に大きな差はなく、Phorbol Myrisate Acetate による刺激への反応も正しく認められた。
5. NBT コート酵母を用いた貪食・NBT 還元試験では、好中球による酵母の貪食とそれに続いて起こる殺菌(NBT 還元)を同時に視覚化することに成功した。hESC-Neu は PB-Neu と比較し、貪食率はやや低下していたが、貪食・還元している酵母の数を加味して算出した貪食スコアは、PB-Neu と有意差を認めなかった。
6. 修正 Boyden 法により、formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)に対する走化性を検討した。fMLP を用いないランダムな遊走細胞数は、hESC-Neu は PB-Neu(G-)と同程度で、PB-Neu(G+)は他の 2 群より有意に高かった。fMLP に対する走化は、hESC-Neu と PB-Neu(G+)・(G-)間で有意差を認めなかった。

以上、本論文では hESC から成熟好中球を効率的かつ特異的に分化誘導する方法を初めて確立し、その詳細な機能解析を可能とした。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り、さらに顆粒球輸血などの臨床応用への重要な足がかりとなると考えられる。一方で、hESC-Neu は表面形質や貪食能・遊走能などの機能の一部に PB-Neu と違いがあることも示しており、体外培養細胞の臨床応用における課題も再認識された。したがって、本論文は再生医療に重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値するものと考えられる。