

審査の結果の要旨

氏名 田中 裕次郎

本研究はヒト ES 細胞の異種大型動物内での *in vivo* 環境を利用した分化の可能性を調べるため、ヒト ES 細胞と性質がほぼ等しいカニクイザル ES 細胞をヒツジ胎仔に移植する系にて、生着の条件およびメカニズムならびにヒツジ体内での ES 細胞の分化の程度の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 在胎 43 - 67 日のヒツジ胎仔 15 頭 36 箇所へ細胞数を振って皮下に移植を行った結果より、カニクイザル ES 細胞のヒツジ胎仔での生着条件は在胎 50 日未満の胎仔に 1×10^6 個以上の細胞を移植することであることが示された。
2. 生着した組織を組織学的に検索した結果、3 胚葉性を示し、神経上皮、軟骨、腺管上皮といった成熟した組織構造をもつ部分も見られた。また、生着した組織においては未分化性を示す ES 細胞マーカー Oct3 は陰性であり、約 60% の細胞において MHC class I 抗原が発現していることが示された。
3. 生着条件が在胎 50 日未満の胎仔に移植することである理由を調べるために在胎 50 日未満(48 日)と以降(60 日)のヒツジ胎仔へそれぞれ移植を行い、移植後 5 日と 2 週間における移植細胞の存在と細胞浸潤を組織学的に検索した。移植後 5 日では、両者で移植細胞の存在を確認でき、細胞浸潤はみられなかった。移植後 2 週間では在胎 48 日に移植した群では移植細胞の増殖がみられたのに対し、在胎 60 日に移植した群では移植細胞はみられず肉芽組織のみみられた。また、移植後 2 週間では在胎 48 日に移植した群では移植部位にマクロファージの浸潤はみられず、移植細胞周囲に T 細胞が多数存在したのに対し、在胎 60 日に移植した群では移植部位にマクロファージ、T 細胞、B 細胞の浸潤がみられ、免疫により排除されることが示された。
4. 出生時に生着がみられたヒツジにおいて、生着組織内にも免疫細胞浸潤がみられ、生後経時的に調べたところ、次第に宿主由来の肉芽に置き換わっていくことが分かった。移植細胞に対する液性免疫および細胞性免疫をそれぞれ *flow cytometry* および *mixed lymphocyte reactions* を用いて調べたところ、生着がみられたヒツジにおいて両者が働いていることが示された。また、同じ移植細胞を生着がみられたヒツジに追加移植してもさらなる生着はみられず、免疫寛容は誘導されていないことが示された。
5. 在胎 48 日に移植した群で移植後 2 週間において移植細胞が宿主の T 細胞で取り囲まれていたことに着目し、これが抑制性 T 細胞 (Treg) であり、移植細胞の生着に働いている可能性を考え、免疫染色を行った。まず、ヒツジの Treg は研究されていないため、Treg の特異的なマーカーである転写因子 Foxp3 をクローニングし、種間での高い *homology* を確認した。さらに、ヒツジ Foxp3 を強制発現した細胞を用いてヒツジ Foxp3 を認識する抗体を見つけた。この抗体を用いて免疫染色を行ったところ、在胎 48 日に

以上、本論文はカニクイザル ES 細胞のヒツジ胎仔への移植により、霊長類 ES 細胞が大型動物内に長期に生着しうること、および胎仔における異種 ES 細胞に対する免疫機構の一部を明らかにした。本研究は、今後のヒト ES 細胞の異種 *in vivo* 環境を用いた分化の研究の土台となると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。