

# 論文審査の結果の要旨

氏名 鈴木 奈穂

本論文は 5 章から構成される。まず、研究背景として、白血病などの血液疾患について造血幹細胞移植が有効な治療手段として用いられているが、一方で造血幹細胞移植は慢性的なドナー不足や生着不全などの深刻な問題を抱えている現状がある。論文提出者は、この問題を打開するために現行の治療法に患者から作製した iPS 細胞を造血幹細胞に分化させ、ドナーに依存しない新たな移植ソースを提唱することを考えた。そのために、論文提出者は造血幹細胞の誘導方法としてテラトーマに着目した。テラトーマは、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞を免疫不全マウスに移植した際に得られる良性腫瘍であり、三胚葉系の様々な組織へ分化した細胞が含まれている。論文提出者はテラトーマを作製する過程で造血幹細胞の維持に必要とされるサイトカインや造血を支持するストローマ細胞を投与することで、テラトーマ内に iPS 細胞由来の造血幹細胞を誘導できるのではないかと考えた。また、成体内の造血幹細胞は骨髄にホーミングする特性があることから、テラトーマ中に誘導した iPS 細胞由来の造血幹細胞もホストマウスの骨髄に移行しうるのではないかと仮説を立て、実験を行った。

第 1 章は、 $\text{Lnk}^{\text{fl}} \text{GFP (LG-)} \text{iPS}$  細胞を用いた造血幹細胞誘導条件の検討について述べられている。論文提出者は、新たな造血幹細胞誘導システムを構築するにあたり、先行研究の結果から多能性幹細胞から造血幹細胞の誘導が非常に効率の低い現象であることを考慮し、システムが機能するかどうか、また誘導効率の最適化を検討するために、造血幹細胞の機能が高い  $\text{Lnk}^{\text{fl}}$  マウスから樹立した iPS 細胞を用いて誘導を試みた。その結果、造血幹細胞への誘導を行った各群においてマウス末梢血中に iPS 細胞由来の血液細胞が検出された。LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞が機能的な造血活性を有しているかを評価するために、テラトーマが形成されたマウスの骨髄より、iPS 細胞由来の造血幹細胞を分取し、コロニーアッセイを行った。その結果、様々な血球系譜を形成したため、LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞は多分化能を有することが示された。また、骨髄移植の結果、iPS 細胞由来の血液細胞は高い骨髄再建能(キメリズム)を示し、全ての血球系へ分化していた。以上の結果から LG-iPS 細胞由来の造血幹細胞は、長期骨髄再建能を有していることが示唆された。

第 2 章では、 $\text{GFP (G-)} \text{iPS}$  細胞からの機能的な造血幹細胞の誘導について述べられている。ここでは、LG-iPS 細胞を用いた造血幹細胞の誘導実験を経て、構築したシステムが野生型の iPS 細胞においても機能するかを検討した。野生型 iPS 細胞のモデルとしては、 $\text{GFP}$  トランジスジェニックマウスから樹立した iPS 細胞を用いた。コロニーアッセイ及び骨髄移植の実験により G-iPS 細胞を用いた場合においても、誘導効率は劣るものの LG-iPS 細胞を用いた場合とほぼ同様の結果が得られたことから、テラトーマ形成を介することでマウス iPS 細胞から遺伝子導入することなく機能的な造血幹細胞が分化誘

導可能であることが示唆された。

上記の結果を受け、第 3 章では本システムの応用例として *in vivo* 誘導法を用いた X-SCID マウスの免疫不全治療モデルについて述べられている。ここでは、遺伝子異常を持つためリンパ球が産生されない X-SCID マウスから iPS 細胞を樹立し、正常遺伝子を導入して再び X-SCID マウスにテラトーマを形成させた。その結果、テラトーマが形成されたマウスの末梢血中にリンパ球形成が認められた。この結果より、原理的に遺伝子治療を施した iPS 細胞からテラトーマを作製することで、リンパ球形成を促し免疫不全が解消される可能性が示唆された。

第 4 章では、ヒト(h)iPS 細胞を用いた機能的な造血幹細胞の誘導について述べられている。ここでは、最終的な臨床応用のゴールとして、本システムが hiPS 細胞からも機能的な造血幹細胞を誘導する系として利用可能であるかを検討した。NOD/SCID マウスに hiPS 細胞と OP9 細胞とサイトカインを投与し、末梢血と骨髄を解析し結果、末梢血では 1/15 匹に、骨髄では 10/15 匹に hiPS 細胞由来の血液細胞が検出された。このマウスから骨髄細胞を NOD/SCID あるいは NOD/SCID/JAK3null マウスに移植を行った結果、いずれの群においてもレシピエントマウスへ生着し、全ての血球系に分化していることが確認された。この結果より、hiPS 細胞からも機能的な造血幹細胞が誘導されることが示唆された。

第 5 章では、テラトーマ組織における造血幹細胞分化機序の解明について述べられている。テラトーマ内で iPS 細胞がどのように造血幹細胞に分化するのか、また iPS 細胞由来の造血幹細胞がテラトーマ中のどのような環境に存在するのかを知るために、テラトーマを構成する細胞を免疫染色および FACS により解析した。その結果、テラトーマ内には iPS 細胞由来の造血幹細胞を含む様々な血球細胞が存在することがわかった。また、造血幹細胞ニッチと類似した環境が形成され、iPS 細胞由来の造血幹細胞はその近傍に存在していることが明らかとなった。これらの結果は、テラトーマを形成する過程で、iPS 細胞は *in vivo* における骨髄環境に順ずる環境を形成する一方で、比較的正常に近い造血幹細胞分化のステップとエピジェネティックな変化を遂げたことを示唆する。

以上より論文提出者は、初めて iPS 細胞より遺伝子を導入することなく機能的な造血幹細胞を分化誘導しうることを明らかにした。また、誘導された造血幹細胞の機能を詳細に解析し、生体内の正常な造血幹細胞と同等の機能を有することを証明した。さらに、論文提出者はテラトーマを構成する組織を解析し、造血幹細胞のニッチと考えられる微小環境が形成されていることを見出した。従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。