

審査の結果の要旨

氏名 遠藤 大

本研究は、ヒト多能性幹細胞から血球までの分化経路における中間段階の血球前駆中胚葉に関して詳細に解析し、血球分化能を持つ中胚葉の誘導条件を同定することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 従来から用いられてきたフィーダー細胞を用いたヒト多能性幹細胞からの血球分化系を解析した結果、ヒト多能性幹細胞から血球分化までの課程で最初に生じる中胚葉段階の細胞が分化開始 3-4 日目の **CD56+APJ+**の集団として同定可能であること、またこの細胞のみを純化することでより高効率に血球への分化を達成できることを明らかにした。
2. ヒト多能性幹細胞から最初に分化する中胚葉までの段階に対して複数のシグナルをアンタゴニストや阻害剤を用いてブロックしたところ、**TGFβ**シグナルの阻害によって大きく中胚葉分化が抑制されること、**BMP**シグナルと **canonical WNT**シグナルのブロックによって部分的な中胚葉分化の抑制が認められることを確認した。このことから、これら3つのシグナルはヒト多能性幹細胞から中胚葉までの分化経路に関与があることを明らかにした。
3. 中胚葉細胞から血球に分化させる段階は既存の分化系では誘導効率が低かったため、それを改善するべく複数のシグナル経路にアゴニストや阻害剤を用いて介入した。その結果、**bFGF**の添加と **TGFβ**シグナルの阻害剤の添加は既存の分化系での血球誘導効率を40倍程度に上昇させた。このことから、これらの因子が中胚葉から血球への運命決定を促進させていることを明らかにした。
4. **CD56+APJ+**細胞を誘導する方法として、フィーダー細胞を要しない分化系を確立し、複数のシグナル組み合わせによって血球になる能力を持つ中胚葉細胞を得られるかを検証した。ヒト多能性幹細胞から **CD56+APJ+**細胞を誘導する条件として、3つのシグナル組み合わせ (**ActivinA + BMP4 (AB)**, **ActivinA + CHIR99021 (AC)**, **ActivinA + BMP4 +**

CHIR99021 (ABC) を検討した結果、AB と AC で誘導した中胚葉細胞は高効率に血球に分化可能であったのに対し、ABC で誘導した中胚葉細胞は血球への分化能を喪失していた。このことから、ヒト多能性幹細胞から血球への分化経路が単一ではなく複数あること、血球への運命決定がごく初期の中胚葉の段階で既に決定されていることを明らかにした。

5. AB 条件と AC 条件で得られる中胚葉細胞と、ABC 条件で得られる中胚葉細胞の差を検討するために、遺伝子発現アレイ解析を行い比較した。共通して中胚葉関連遺伝子の上昇を認めたことから、3つの条件は全て中胚葉系に分化していることが分かった。条件間で発現差を認めた遺伝子群に関して Gene Ontology 解析を行ったところ、血球血管系以外の組織に関連する遺伝子群に発現の差があることを確認できた。このことから、ABC 条件においては血球以外の中胚葉系の組織になる能力を持った中胚葉細胞が誘導されているものと推測された。

以上、本論文はヒト多能性幹細胞を用いた *in vitro* 血球分化系を解析することによって、血球分化経路には複数の経路が存在することを初めて明らかにした。また、血球分化能は中胚葉段階というごく初期に決定されていることを明らかにした。本研究はヒト多能性幹細胞を用いた *in vitro* モデルのヒト発生研究への有用性を証明するものであると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。