

## 審査の結果の要旨

氏名 塚田 端夫

本研究は多能性幹細胞が持つテラトーマ形成能を応用して人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells : iPS 細胞) からの造血幹細胞 (Hematopoietic Stem cell : HSC)の分化誘導と生体内増幅モデルの構築に関する研究成果をまとめたものである。血液学分野では iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する技術開発は将来的に多くの血液疾患を根治する有効な治療方法につながると考えられている。年々、高齢化に伴い根治治療である造血幹細胞移植を必要とする患者が増加し、慢性的なドナー不足の問題を抱えている。そのため造血幹細胞を供給する細胞ソースとして期待されているのが iPS 細胞である。ヒト体細胞から胚性幹細胞 (Embryonic Stem cell : ES 細胞) と同等の能力を有する人工性多能性幹細胞が樹立できるようになり 10 年近くが経過した。iPS 細胞は生体内のすべての細胞に分化することが可能であり、臨床応用への安全性に向けた技術開発が進んでいる。これまでに *in vitro* において ES/iPS 細胞から HSC を誘導する試みに関する研究はいくつか報告されている。しかし、現在までに臨床応用に用いることが可能かつ生体内と同等の能力を持つ長期骨髄再構築能を有した HSC の誘導方法は未だ確立されていない。その原因に *in vitro* の二次元培養では生体内における HSC 発生の模倣や HSC を維持する骨髄微小環境の構築が困難であること等が考えられる。そこで論文提出者は *in vitro* では機能的な HSC を誘導することは困難と考え、iPS 細胞が持つテラトーマ形成能を応用した *in vivo* による造血幹細胞の誘導を試みた。

以前に Amabile らは、iPS 細胞からテラトーマ形成を介することで移植可能な HSC を誘導することを報告している。しかし、テラトーマ内からどのように発生しているか不明な点と生体内

で誘導できる HSC の数に限りがあるという問題点が存在した。論文提出者は *in vitro* で血液を誘導する転写因子と骨髄ニッチに発現している転写因子をテラトーマ内で発現させれば効率よく HSC が誘導できるのではないかと考えた。

まず造血系細胞を誘導する転写因子の組み合わせとして *Gfi1-cFos-Gata2 (GFG)* と *Erg-HoxA9-Rora (EAR)* を選択し、骨髄様構造を誘導する転写因子としては *Foxc1* を選択した。強制発現系としては薬剤誘導レンチウイルスシステム (Tet-on システム) を用い、C57BL/6 (Ly5.1) マウス由来の iPS 細胞に導入した。樹立された各転写因子を発現する iPS 細胞群を C57BL/6 (Ly5.2) マウスの皮下に注射し、テラトーマの大きさが 2 cm 以上になった時期に Doxycycline (Dox) により転写因子を発現させた。その結果、*GFG-iPS* 群では iPS 細胞由来の血液細胞が誘導されることが確認された。また組織学的解析、免疫学的染色、可視化画像解析技術を駆使した結果、テラトーマ組織内に HSC が最初に発生すると考えられている血球産生血管内皮 (hemogenic endothelium : HE) が検出された。

テラトーマに *GFG* を発現させることで HE を介して HSC が誘導されたと考えられるが、その効率は高いものではなかった。そこで以下の 3 つに着目した。(1) HSC は 1 細胞においても骨髄再構築が可能であり高いキメリズムを認められる (2) テラトーマを介して出現した HSC は宿主マウスの骨髄内にホーミングし、増幅する (3) *c-Kit* 抗体を用いることで造血幹細胞ニッチが空き非放射線照射下で造血幹細胞移植が可能になる。以上の報告から iPS 細胞から HSC を数多く誘導できなくとも *in vivo* を介して増幅させることは可能である。そこで論文提出者はテラトーマを形成させる宿主マウスの造血幹細胞ニッチを空けることを利用し、*in vivo* を介して iPS 細胞由来の HSC が増幅させることを試みた。

テラトーマを形成させる宿主マウスに造血幹/前駆細胞 (Hematopoietic Stem / progenitor cell : HSPC) が欠損する *c-Kit<sup>flx/flx</sup>* マウス を用いることにした。*GFG-iPS* 細胞を宿主マウスの皮下に注射し、テラトーマを介して血液細胞が誘導される時期に宿主マウスの造血幹細胞ニッチを空けた。その結果、テラトーマから誘導された血液細胞は野生型と比べて末梢血と骨髄内で

10 倍以上に増幅したことが確認された。また二次移植により誘導された血液細胞は長期骨髄再建能を有した機能的な HSC を含むことが示唆された。

以上より、論文提出者が主体となり、HSC の発生過程をテラトーマ内に模倣することで機能的な HSC を誘導し、生体内で増幅させることに成功した。この成果は将来的にヒト iPS 細胞由来の造血幹細胞の分化誘導にむけた重要な足がかりとなる研究で、博士（医学）の学位を授与できると認められる。