

審査の結果の要旨

氏名 中村文美

本研究は iPS 細胞から好中球を大量に作成するために、iPS 細胞から Sac 法を用いて造血前駆細胞を誘導する系を使用し、G-CSF の添加による好中球分化の誘導、遺伝子導入による長期間の細胞培養および経時的な単一細胞遺伝子発現解析を試み、下記の結果を得ている。

1. iPS 細胞由来造血前駆細胞を G-CSF 存在下で 14 日間培養した結果、形態学的には 70% の細胞が好中球系細胞に分化し、そのうち成熟好中球が 50% を占めた。また、それらの細胞では末梢血好中球と同様に CD11b、13、15、45、64、123 が発現していたが、末梢血好中球で特異的に発現する CD16 や 16b などの発現は低かった。表面マーカーのみでは iPS 細胞由来好中球を同定することはできなかった。iPS 細胞由来好中球は末梢血好中球と同様に好中球刺激物質の添加により強い活性酸素産生能を有することが示された。
2. iPS 細胞由来造血前駆細胞に G-CSF 存在下でドキシサイクリンによる遺伝子発現調節が可能なベクターを使用して BMI1 と cMyc を導入し、発現させた結果、約 3 ヶ月間にわたって増殖可能な細胞が作成でき、それらの形態は芽球様で均一であった。また、BMI1 と cMyc 導入細胞で G-CSF 存在下に BMI1 と cMyc の発現を off にしたところ、4 日後には分葉核を持つ好中球様細胞への分化が見られ、CD11b や CD14 などの発現が見られたが、活性酸素産生能は iPS 細胞由来好中球と比較して 1/10 程度に低下していた。また、エステラーゼ染色でも単球系の性質を示していた。
3. 既存のマイクロアレイデータにおいて好中球系・単球系で高発現を示す遺伝子について、iPS 細胞由来造血前駆細胞から好中球に分化する過程における発現を単一細胞毎に経時的に解析した。その結果、造血前駆細胞からの分化開始時には各細胞の遺伝子発現に差はなかったが、分化 4 日目ではヒートマップ上および主成分分析で二群の細胞集団が存在しており、それらの細胞集団は分化 2 日目及び 7 日目にも存在した。より分化が進んだ 7 日目で主たる集団が好中球系の細胞と推定された。主成分分析の PCA loading から、CEBPB、BCL6、LITAF、CEBPD が好中球系の細胞集団に特徴的な遺伝子であると同定した。
4. CEBPB、BCL6、LITAF、CEBPD を iPS 細胞由来好中球の分化誘導に関与する候補遺伝子とし、これらの遺伝子を iPS 細胞由来造血前駆細胞に導入した結果、LITAF を導入した細胞では好中球への分化が 1.25 倍に向上した。さらに、BMI1 と cMyc 導入細胞に LITAF を導入し、BMI1 と cMyc の発現を off にした結果、活性酸素産生能の高い細胞が 14.7% 存在するクローンが得られ、活性酸素産生能を一部改善することができた。

以上、本論文は iPS 細胞由来前駆細胞から好中球に分化する過程の経時的な単一細胞遺伝子発現解析を実施した結果、iPS 細胞由来好中球の分化に LITAF が関与し、LITAF の導入により BMI1 と cMyc 導入細胞の活性酸素産生能が改善することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、iPS 細胞由来好中球の大量産生法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。