

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 長 尾 研 二

難治性疾患に対する新たな治療法として、再生医療に大きな期待が寄せられている。臍帯血由来造血幹細胞移植はその一例であるが、細胞数の制約が大きいため効率よい増幅法の開発が望まれている。また一方、体細胞から誘導可能な人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は種々の組織細胞に分化可能なので、血液細胞から効率よく誘導できれば、再生医療における移植細胞の確保が容易になると期待される。申請者は、造血幹細胞を増幅させる因子を探索し、骨髓細胞及び末梢血細胞から iPS 細胞を誘導する方法を開発した。本論文は、その研究成果をまとめたもので 5 章からなる。

第 1 章の序論で現状を概観したのち、第 2 章では、マウスの造血発生期において、造血幹細胞の維持・増幅に関わる分子を探索し、候補分子を用いた造血幹細胞の体外増幅を試みた。大動脈一生殖隆起一中腎領域（AGM）は成体型造血の発生と維持に重要で、本領域由来 AGM-S3 細胞は造血幹細胞の発生を支持する。サブクローニングにより、造血支持能をもつ S3-A9 株と支持能のない S3-A7 株を取得した。遺伝子発現解析により、S3-A9 株で特異的に発現している 79 遺伝子を選別し、S3-A7 株で強制発現させて造血支持能を検討した。その結果、79 遺伝子の中で唯一、ヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの一つ Glypican-1（GPC1）が、共培養によりヒト臍帯血由来造血前駆細胞を増幅させることを見出した。更なる検討の結果、GPC1 が造血の微小環境構築に重要なことは示唆されたが、造血幹細胞を増幅させる因子ではなかった。

第 3 章では、マウス骨髓細胞から iPS 細胞の誘導を試みた。Oct4-GFP トランスジェニックマウスの骨髓単核球細胞（BM MNCs）と胚性線維芽細胞（MEF）を ES 細胞と融合させると、BM MNCs は MEF より多くの、初期化のマーカーである Oct4-GFP を発現するコロニーを形成したことから、BM MNCs は MEF より効率よく多能性幹細胞にリプログラミングできることを見いだした。実際にレトロウイルスによる Oct4、Sox2、cMyc、Klf4 の 4 遺伝子導入では、BM MNCs に対するウイルス感染効率は MEF に比べて低かったが、MEF より高い効率で iPS 細胞コロニーが出現した。骨髓由来 iPS 細胞（BM iPS）は、ES 細胞マーカー各遺伝子を発現し、三胚葉系の組織細胞を含む奇形腫を形成し、生殖系列への分化を伴ったキメラマウスを作出できた。クローナルな解析の結果、一度のウイルス感染で複数の BM iPS クローンを取得可能なことが示された。造血組織である骨髓に由来する MNCs が高い効率で iPS 細胞にリプログラミングされたことより、BM MNCs 中に多く含まれる血液細胞についても効率よくリプログラミング可能なことが示唆された。

第 4 章では、ヒト末梢血細胞のリプログラミングを試みた。組織採取に際して、ドナーの負担がより軽い末梢血の細胞から多能性幹細胞を誘導可能であれば、細胞バンクの構築、移植用自家

細胞の調製、患者由来 iPS 細胞の樹立等において、臨床応用上大きな利点を有している。しかし、ヒト末梢血細胞からの iPS 細胞誘導法はこれまで確立されていなかった。申請者は、ヒト骨髓由来単核球細胞および G-CSF の投与を伴わないヒト末梢血由来単核球細胞をリプログラミングする培地として、可溶化型 IL-6 受容体と IL-6 との融合蛋白である FP6 の添加を検討した。FP6 を含むいくつかのサイトカイン存在下で予め培養した細胞に OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC の 4 因子をレトロウイルスで感染させたところ、感染効率は高くないものの、骨髓由来単核球細胞および 1 ml 以下の末梢血に相当する 5×10^5 個の単核球細胞から複数の iPS 細胞コロニーを取得した。末梢血由来 iPS 細胞は、細胞形態、表面抗原の発現、多能性に関連した転写因子の発現、細胞全体の遺伝子発現プロファイル、*in vivo*、*in vitro*における分化特性などの点について ES 細胞と極めて類似していた。第 5 章では、本研究の総括と今後の治療に向けた展望がまとめられている。

以上、本研究で申請者は、骨髓中にリプログラミングされやすい細胞が含まれることを見出し、複数のサイトカインの組み合わせで細胞を予め刺激することにより健康診断レベルの採血による少量のヒト末梢血細胞からも iPS 細胞を誘導できることを明らかにした。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。