

京都大学	博士 (医学)	氏名	丹羽 明
論文題目	Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. (Flk-1 陽性血液血管前駆細胞を経由する、iPS 細胞からの秩序だった造血発生)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】 体細胞へ数種の因子を導入することで初期化して得られる誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) は、胚性幹細胞 (ES 細胞) 同様に高い増殖能と多分化能を有し、疾患研究や薬剤開発・再生医療等の新たな資源として今後の応用が期待される。</p> <p>生体内の発生において造血細胞は中胚葉前駆細胞を経て出現するが、ES 細胞からの試験管内造血分化も、生体内の発生と同様の過程をたどることが示されている。しかし、iPS 細胞からの試験管内造血分化過程について、生体、ES 細胞との比較をもとに、詳細に検討した報告はない。</p> <p>【目的】 最終分化した細胞を人為的に初期化した iPS 細胞が、造血細胞分化において、胚由来の ES 細胞と同様の分化過程を経るのかを検討し、生体内の造血細胞分化のモデルとなり得るか確認する。</p> <p>【結果】 マウス iPS 細胞および ES 細胞を用い、OP9 ストロマ共培養法で二次元造血分化誘導した。iPS 細胞からも、ES 細胞と同様に分化 4 日目から側板中胚葉マーカーである Flk1 陽性細胞が出現し、Sca-1、c-kit、CD34 など早期造血に関わるマーカーも同時期に発現した。分化 5 日目に Flk1 陽性細胞を分取し新たな OP9 ストロマ上で培養継続したところ、血液および血管内皮細胞への分化が認められた。</p> <p>胎仔の造血発生は卵黄嚢に発する 1 次造血と、遅れて大動脈・中腎・生殖原器領域に出現する 2 次造血に大別され、それらは形態および産生されるヘモグロビンサブタイプの差異で判別できる。そこで免疫染色、RT-PCR を経時的に行い iPS 細胞と ES 細胞の分化を比較したところ、両者ともほぼ同様のタイミングで 1 次造血から 2 次造血への移行が起きていることが明らかになった。また、分化 5 日目における Flk1 陽性細胞の出現率は検討した各 iPS 細胞、ES 細胞の間で差異があったが、各々の Flk1 陽性分画からの造血サイトカイン存在下における血球産生効率には大きな差を認めなかった。一方、Flk1 陰性分画からは極めて低効率な造血を認めるのみであった。最後に、Single cell deposition assay により、iPS 細胞由来 Flk1 陽性分画の中に、単一細胞から血球と内皮の両方に分化し得る共通の前駆細胞が含まれることが確認された。</p> <p>【考察】 体細胞から人為的に初期化された iPS 細胞由来の造血発生も、試験管内で胚発生を模倣するとされる ES 細胞とほぼ同様の過程を辿ることが明らかになった。今後は、実際の疾患解析・再生医療への応用に向け、マウスだけでなくヒト iPS 細胞においても効率よく再現性の高い分化方法を構築し、さらに初期化方法の改変も含めた安全面での課題を克服する必要があると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

最終分化した細胞を人為的に初期化した誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) は、胚性幹細胞 (ES 細胞) 同様に高い増殖能と多分化能を有し、疾患研究や薬剤開発・再生医療等の新たな資源として今後の応用が期待される。しかし、その試験管内造血分化過程を、胚発生を模倣するとされる ES 細胞と比較して検討した報告はない。本研究では、iPS 細胞の分化過程を解析し、生体内の造血細胞分化のモデルとなり得るか検討した。

マウス iPS 細胞を OP9 ストロマ細胞と共培養し、Flk1 陽性中胚葉前駆細胞を誘導した。それらを分化 5 日目に分取し、新たな OP9 ストロマ上で造血サイトカイン存在下に培養すると造血細胞が出現し、その分化効率は ES 細胞とほぼ同様であった。また、これら iPS 細胞由来 Flk1 陽性分画の中に、単一細胞レベルで血球と内皮の両方に分化し得る共通前駆細胞 (ヘマンジオブラスト) が含まれることも確認できた。さらに、1 次造血から 2 次造血へ移行も ES 細胞と同様のタイミングで観察された。

以上の研究は、体細胞から人為的に初期化された iPS 細胞由来の試験管内造血分化過程が、胚発生を模倣するとされる ES 細胞とほぼ同様の過程を辿ることを明らかにし、生体内造血細胞分化のモデルとなり得ることを示したものであり、今後の医学研究や治療開発に貢献する研究である。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 12 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降