

氏 名	ふく だ ひとし 福 田 仁
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2935 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	FACS-based purification of ES cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation (FACSによる神経前駆細胞の選別は、ES細胞由来移植片の脳内での腫瘍化を抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 山 中 伸 弥 教 授 中 辻 憲 夫

論 文 内 容 の 要 旨

最近 ES 細胞からドーパミンニューロンを効率的に誘導するプロトコールがいくつか発表されたことにより、これらのドーパミンニューロンはパーキンソン病に対する細胞移植治療の有望な候補となってきた。しかしながら、ES 細胞由来の移植片はしばしば生体内に移植後腫瘍を形成し、これが ES 細胞を使用した移植治療の研究をすすめる上で大きな障害となっている。

2000年にマウス ES 細胞から効率的にドーパミンニューロンを誘導する SDIA 法 (ES 細胞を PA6 ストローマ細胞と共培養する方法) が発表された。SDIA で 4 日間培養した移植片を移植すると平均311個のドーパミンニューロンの生着が認められたので、SDIA4 日の移植片は多くのドーパミンニューロン前駆細胞を含むことが示唆された。しかし SDIA4 日の移植片の22%に腫瘍化が認められ、この腫瘍内で増殖中の細胞は ES 細胞マーカーである Oct4 を発現していたことから、SDIA4 日の移植片に分化せずに残っていた未分化 ES 細胞が腫瘍化を引き起こしていることが予想された。そこで移植片から神経系細胞のみを選別するために、神経前駆細胞の特異的マーカーである Sox1 のアレルに GFP をノックインした ES 細胞を用い、Sox1-GFP をターゲットにした FACS を行って SDIA day4 の移植片を Sox1 陽性 (神経前駆細胞) と Sox1 陰性 (それ以外) に分離した。Sox1 陽性細胞は *in vitro* で主に postmitotic neuron に分化し、増殖能は小さかった。これに対し Sox1 陰性細胞は *in vitro* で未分化 ES 細胞の特性を保ち、旺盛な増殖能を示した。次に脳内に移植すると Sox1 陽性細胞は主に神経細胞に分化し腫瘍を全く形成しなかったのに対し、Sox1 陰性細胞は高率に奇形種を形成した。Sox1 陽性細胞と Sox1 陰性細胞をそれぞれ SCID マウスの皮下に移植した時も (teratoma formation assay), Sox1 陰性細胞のみが奇形種を形成した。この結果により、FACS を用いた神経前駆細胞の純化は、ES 細胞由来移植片の腫瘍化を抑制する非常に有用な方法であるといえる。Sox1 陽性細胞を移植した場合は腫瘍を形成しなかったものの、ドーパミンニューロンの生着は少なく平均14個にとどまった。生着ドーパミンニューロンの数を機能的改善が見込まれる程度にまで増やすには、分化方向の定まっていない Sox1 陽性細胞に移植前に *in vitro* で成長因子を作用させてドーパミンニューロン前駆細胞に方向づける手段や、FACS や移植時に大量に起こるアポトーシスを抑制する手段が必要と思われる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

胚性幹 (ES) 細胞由来移植片の脳内での腫瘍化については不明な点が多い。本研究では fluorescent-activated cell sorting (FACS) を用いて ES 細胞由来移植片を純化することで、腫瘍化を抑制できるかどうか検討を行った。

マウス ES 細胞を骨髄間質由来細胞と共培養するとドーパミン細胞が誘導できる (stromal cell-derived activity; SDIA 法)。SDIA 法で 4 日間培養した ES 細胞を移植すると多くのドーパミン細胞の生着が得られた一方、移植片に未分化のまま残存した ES 細胞由来と思われる腫瘍化が観察された。そこで神経前駆細胞特異的マーカーである Sox1 のアレルに green fluorescent protein (GFP) をノックインした ES 細胞を SDIA 法で 4 日間分化させ、FACS を用いてこの移植片を

Sox1 陽性細胞（神経系）と Sox1 陰性細胞（それ以外）に分離した。Sox1 陰性細胞は *in vitro* の培養で旺盛な増殖能を示し ES 細胞の特性を保持し、脳内に移植すると高率（90%）に腫瘍を形成した。これに対して Sox1 陽性細胞は *in vitro* で増殖能は小さく主にニューロンに分化し、脳内移植後も全く腫瘍を形成しなかった。この結果は、FACS を用いた神経系細胞の純化は ES 細胞由来移植片の腫瘍化を抑制する有用な方法であることを示唆している。

以上の研究は ES 細胞由来移植片による腫瘍化の機序の解明に貢献し、パーキンソン病をはじめとする神経脱落疾患の細胞移植治療に寄与するところが多い。

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17年12月19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。