

|           |                                                                                                                                                         |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | うめ だ かつ つぐ<br>梅 田 雄 嗣                                                                                                                                   |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学)                                                                                                                                               |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2759 号                                                                                                                                            |
| 学位授与の日付   | 平成 16 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 内 科 系 専 攻                                                                                                                                     |
| 学位論文題目    | Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro.<br>(試験官培養における非ヒト霊長類胚性幹細胞からの一次造血および二次造血の分化誘導) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 内 山 卓 教 授 前 川 平 教 授 中 畑 龍 俊                                                                                                                |

### 論 文 内 容 の 要 旨

ヒトにおける造血発生はマウスと一部異なることが知られているが、胚を実験に使用することに対する倫理的制限等のため十分に解明されていないことが多い。カニクイザル等の旧世界ザルは医療研究に広く用いられ、また発生過程における赤血球のグロビン遺伝子の発現パターンの変化等、ヒトと類似する点が多い。そのため、サル胚性幹細胞 (ES 細胞) はヒトの造血発生の統御機構を解明する良いモデルとなると考えられる。近年サル ES 細胞が樹立されたが、造血発生の過程の分化誘導を詳細に解析した報告はほとんど認められない。そのため、M-CSF 機能的欠損マウス由来のストローマ細胞株 OP-9 との共培養システムを用い、カニクイザル ES 細胞からの一次造血から二次造血への移行の再現を試みた。

サル ES 細胞を解離した後、OP-9 と共培養し、出現する血液細胞を経時的に解析した。一部の実験では培養 10 日目に CD34 陽性細胞を選別し、得られた細胞を新しい OP-9 上にまき直し同様の解析を行った。浮遊細胞については、培養 8 日目より一次造血由来の胚型赤血球、引き続いて 16 日目より二次造血由来の胎児型赤血球が出現し、その存在は胚型、胎児型、成体型グロビン遺伝子の RT-PCR および免疫染色にて確認した。赤血球はエリスロポエチン (EPO) 存在下で VEGF の濃度依存的に増加した。その他の血球については CD41 陽性の巨核球が 8 日目より、ミエロペルオキシターゼ陽性の骨髓球系細胞が 12 日目より出現した。付着細胞中には培養 8 日目より大半が CD34 陽性の造血前駆細胞である付着血液細胞が出現した。コロニーアッセイでは胚型造血由来の赤芽球コロニーが出現し、コロニー数は VEGF の濃度依存的に増加した。RT-PCR による経時的解析では、一次造血および二次造血に関与する遺伝子の発現はヒトの胚形成期におけるそれと並行して認められた。10 日目に CD34 陽性細胞を選択的に採取し、OP-9 と再び培養すると、25 日目 (採取後 15 日目) 頃より EPO 存在下でより大量の胚型および胎児型赤血球が出現した。

以上の結果から、サル ES 細胞より一次造血から二次造血までの発生過程が in vitro で分化誘導可能であることが示された。また、赤血球のグロビン遺伝子の発現パターンの解析等より、その造血発生の過程はヒトの造血発生初期の移行パターンと同等であると考えられた。この培養システムでは一次造血から二次造血への移行を個々の細胞レベルで観察することが可能であり、ヒトの造血発生、分化の詳細な検討を行う良いモデルになると考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は、ヒトの造血発生の統御機構を解明するモデルとなる in vitro の培養法の確立のため、OP-9 ストローマ細胞との共培養によりカニクイザル胚性幹細胞 (ES 細胞) からの一次造血から二次造血への移行の再現を試みた。

浮遊細胞については、培養 8 日目より一次造血由来の胚型赤血球、続いて 16 日目より二次造血由来の胎児型赤血球が出現した。赤血球数はエリスロポエチン (EPO) 存在下で VEGF の濃度依存的に増加した。付着細胞中には培養 8 日目より大半が CD34 陽性の付着血液細胞が出現した。コロニーアッセイでは胚型造血由来の赤芽球コロニーが出現し、その数は VEGF の濃度依存的に増加した。RT-PCR による解析では、一次及び二次造血に関与する遺伝子の発現はヒトの胚形成期

におけるパターンと同様であった。培養10日目にCD34陽性細胞を採取し、OP-9と再び培養すると、採取後15日目頃よりEPO存在下でより大量の胚型及び胎児型赤血球が出現した。以上の結果から、サルES細胞より一次造血から二次造血までの発生過程が誘導可能であり、その過程はヒトの造血発生初期の移行パターンと同等であった。

以上の研究は *in vitro* の培養システムで個々の細胞レベルから霊長類の造血発生、分化を詳細に解析できたという点で大きな意味を持つ。この培養システムはヒトの造血発生、分化の詳細な検討を行う良いモデルになると考えられる。

従って、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16年2月27日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。