

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                |     |         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 博士（ 医 学 ）                                                                                      | 氏 名 | 森 嶋 達 也 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells<br>（ヒト人工多能性幹細胞からの好中球分化誘導） |     |         |
| <p>（論文内容の要旨）</p> <p>【はじめに】先天性骨髄不全症候群や好中球機能異常症など、先天的に好中球に異常を来す疾患は多く知られており、近年それらの原因遺伝子が同定され注目されてきているが、その病態には依然として不明な点が多く残されている。一方、i P S細胞は体細胞を初期化した多能性幹細胞であり、再生医療への応用が期待されているが、各臓器の分化過程を解析することが可能であるため、患者細胞より樹立した疾患特異的 i P S細胞を用いることにより疾患の病態解析に有用であると考えられている。この疾患特異的 i P S細胞を利用して上記の好中球に異常を来す疾患の病態解析を行うには、ヒト i P S細胞を成熟好中球に分化させる実験系が必要であるが、過去にヒト i P S細胞から好中球を分化誘導し、その機能評価や分化過程の解析を行った報告はなかった。そこで本研究ではヒト正常 i P S細胞を好中球に分化誘導し、その機能と分化過程の評価を行う実験系の確立を試みた。</p> <p>【方法】サルE Sやマウス i P S細胞をマウス由来のストローマ細胞であるO P 9細胞と共培養することにより赤血球に分化させる方法が報告されてきており、今回の実験ではこのシステムを応用した。ヒト i P S細胞をはがしてクラスターとしO P 9細胞上に撒き、V E G F存在下に1 0日間培養した。1 0日目に中胚葉マーカーであるV E G F R 2とC D 3 4が共陽性となった細胞をソーティングし新しいO P 9細胞上に撒き直し、S C FやI L－3、T P O、G－C S Fといった造血サイトカイン存在下に約3 0日間培養した。</p> <p>【結果】ソーティング後約3 0日目に浮遊してきた細胞を回収し、メイ・ギムザ染色で形態を観察したところ、約3 0～4 0%の細胞が桿状・分葉核好中球といった成熟好中球に分化しており、その他の細胞もほとんどが骨髄球系の前駆細胞であった。赤血球系やリンパ球系といった他の系統の血球細胞はみられなかった。これらの i P S細胞由来好中球はミエロペルオキシダーゼ染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色陽性であり、フローサイトメトリーによる表面マーカー解析では骨髄球系のマーカーが陽性であった。また、電子顕微鏡で微細構造を観察したところ、ミエロペルオキシダーゼ陽性・陰性の好中球特殊顆粒を備えていることがわかり、これらの顆粒蛋白（ラクトフェリン、ゼラチナーゼ）の免疫染色も陽性であった。このように i P S細胞由来好中球は好中球に特徴的な微細構造を備えていることがわかった。次にこの i P S細胞由来好中球の機能評価として好中球が異物を排除するための基本機能である遊走能、貪食能、殺菌能の評価を行ったところ、これら全ての機能を備えていることが確認できた。最後にこの i P S細胞由来好中球が骨髄におけるヒト正常造血と同様の分化過程をとるかどうかなを確認するため経時的解析を行った。形態的には最も未熟な骨髄芽球から成熟好中球まで経時的な形態の変化が観察され、フローサイトメトリーによる表面マーカーの発現解析やR T－P C Rによる好中球分化において重要な転写因子や好中球特殊顆粒の発現解析ではいずれも</p> |                                                                                                |     |         |

骨髄におけるヒト正常造血と同様のパターンをとることを確認した。

【結論】このように、本研究ではO P 9細胞との共培養系を用いてヒト i P S細胞を成熟好中球に分化させる培養システムを確立し、得られた好中球が基本的機能を備えており、ヒト骨髄における正常造血と同様の分化過程をとることを確認した。このシステムを用いて上述の疾患特異的 i P S細胞を好中球に分化させ、その機能や分化過程を正常 i P S細胞と比較することにより、病態解明につながる知見が得られることが期待される。

（論文審査の結果の要旨）

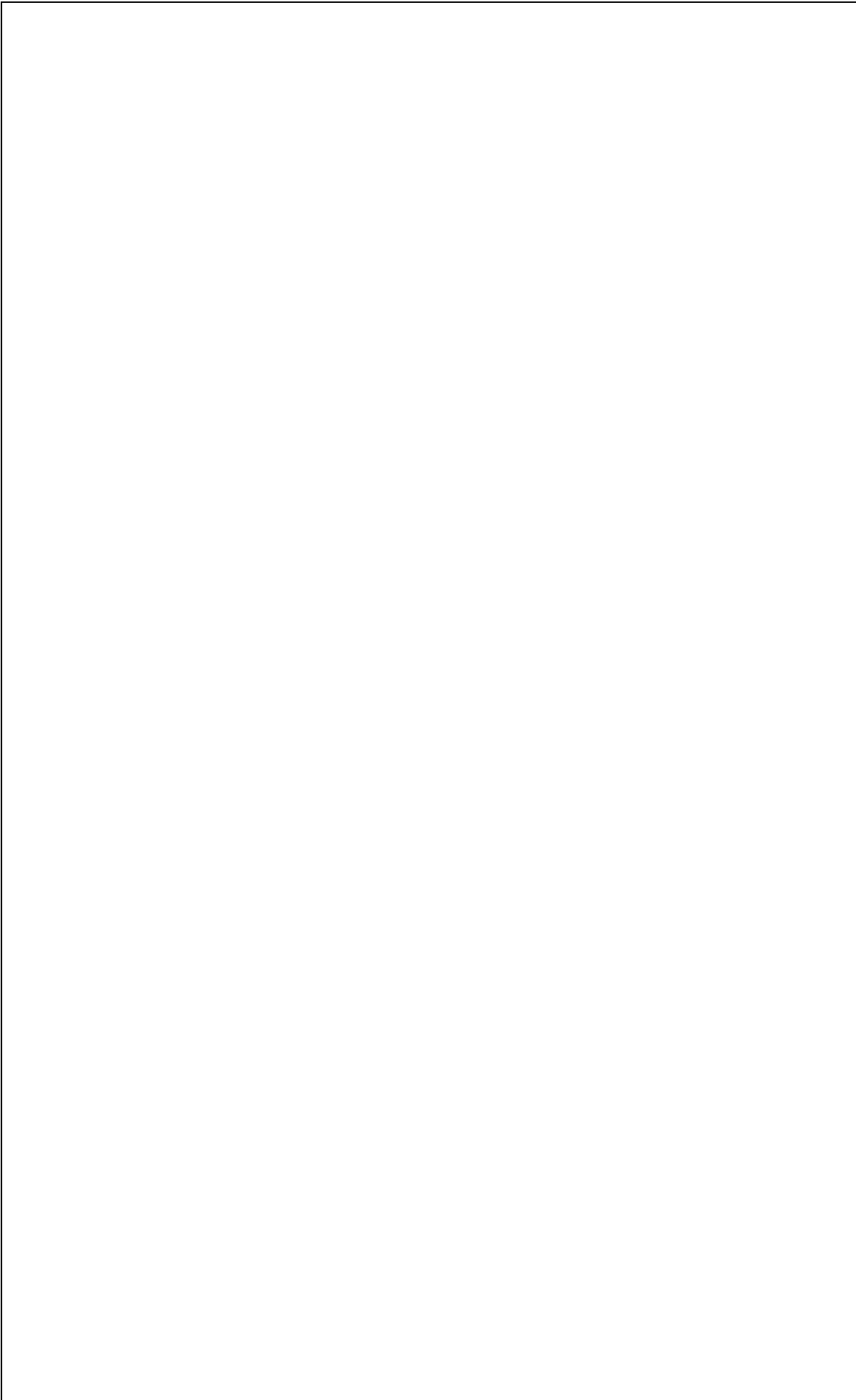
先天性に好中球に異常を来す疾患は多く知られているが、その病態には依然として不明な点が多く残されている。 i P S細胞は体細胞を初期化した多能性幹細胞であり、各臓器の分化過程を解析することが可能であるため、患者細胞より樹立した疾患特異的 i P S細胞を用いることにより疾患の病態解析に有用であると考えられている。しかし、過去にヒト i P S細胞から好中球を分化誘導し、その機能評価や分化過程の解析を行った報告はなかった。

本研究ではO P 9細胞との共培養系を用いることによって、ヒト i P S細胞を好中球に分化誘導するシステムを確立した。得られたヒト i P S細胞由来好中球は形態、表面マーカー解析において好中球の特徴を有しているだけでなく、電子顕微鏡観察下で好中球に特徴的な微細構造を備えており、顆粒蛋白の染色からも好中球特殊顆粒を備えていることを確認した。また、これらのヒト i P S細胞由来好中球は好中球が異物を排除するための基本機能である遊走能、貪食能、殺菌能を備えていることを確認し、その分化の過程の評価では形態、表面マーカー解析、遺伝子発現解析においてヒト骨髄における正常造血と同様の分化過程をとることを確認した。

以上の研究はヒト i P S細胞からの成熟好中球の分化システムの確立とその分化過程の解明に貢献し、疾患特異的 i P S細胞を用いた好中球に異常を来す疾患の病態解析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2 3年 7月 4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