

博士論文等内容の要旨

申請者氏名 西森 誠

論文題目 iPS 細胞由来細胞の腫瘍化に関する研究

人工多能性幹 (iPS) 細胞は胚性幹 (ES) 細胞が抱えている倫理的問題および免疫拒絶の問題を克服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。ところが iPS 細胞は目的とする細胞や組織へ分化誘導後に生体へ移植した場合において宿主に腫瘍を形成することが知られており、再生医療への応用の障壁となっている。この腫瘍化の原因は分化誘導後に残存する未分化細胞であることが示唆されている。本研究は iPS 細胞から分化誘導した後に残存する未分化細胞を検出することを目的としたものである。

第 1 章では、再生医療の現状について述べた。また、再生医療には幹細胞が役立つと考えられており、幹細胞の中でも特に iPS 細胞が注目されているため、iPS 細胞の成り立ちと、iPS 細胞を再生医療へ応用する際の問題について記述した。

第 2 章では、iPS 細胞を胚様体形成により分化誘導し、その後、未分化細胞が残存することを見出した結果について述べた。この研究は未分化細胞で特異的に発現している Nanog を未分化マーカーとする手法を用いて行った。未分化細胞で特異的に活性化する Nanog プロモーターによって緑色蛍光タンパク質である green fluorescent protein (GFP) を発現するマウス iPS 細胞株を用いた。iPS 細胞の分化誘導後に蛍光顕微鏡を用いて GFP 発現を指標に未分化細胞の有無を観察したところ、胚様体中に未分化細胞の混在を認めた。次に、これらの未分化細胞が GFP 発現を維持するか否か検討したところ、中には長期間 GFP 発現を維持するものが認められた。

第 3 章では、iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞の造腫瘍能を検討した結果について述べた。iPS 細胞を胚様体形成によって分化誘導し、未分化細胞が残存している胚様体と分化細胞のみで構成される胚様体を免疫不全マウスであるヌードマウスの皮下へ移植し、造腫瘍能を検討した。その結果、未分化

細胞が残存している胚様体は悪性腫瘍に分類されている未熟奇形腫 Grade 3 を形成したが、分化細胞のみで構成される胚様体は腫瘍を形成しなかった。この結果から、iPS 細胞に由来する細胞の腫瘍化の原因は Nanog を発現する未分化細胞であることが判明した。

第 4 章では、iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞を形態学的に解析した結果について述べた。胚様体を酵素処理で個々の細胞に分散後、細胞分取機能を有するフローサイトメーター (FACS) を用いて GFP 発現を指標に未分化細胞と分化細胞を分取し、パパニコロウ染色後の標本の画像を画像解析ソフトである ImageJ を用いて核面積、細胞面積、核細胞質比について測定した。その結果、胚様体中の未分化細胞は分化細胞に比し小型で核細胞質比の高い細胞であることが明らかとなった。また、胚様体中の未分化細胞の形態は iPS 細胞と類似していたことから、胚様体中の未分化細胞は iPS 細胞に類似した細胞であることが示唆された。マウス iPS 細胞の場合においては、未分化細胞は GFP 発現により分化細胞と区別できるが、ヒト iPS 細胞の場合は倫理的に遺伝子操作が不可能であるため Nanog-GFP に依存した鑑別は困難である。本研究の結果から、移植の際に細胞面積と核細胞質比を指標にすることで iPS 細胞の分化誘導体から腫瘍を形成する細胞を検出可能であることが示唆された。

本研究によって得られた成果が iPS 細胞に由来する細胞の移植後の腫瘍化を防ぐことに大きく貢献し、iPS 細胞の再生医療への応用を促進することが期待される。