

氏名（本籍）	西森 誠（高知県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博甲産第15号
学位授与年月日	平成26年 3月23日
学位授与の要件	倉敷芸術科学大学学位規定第4条第3項第1号該当
学位論文題目	iPS細胞由来細胞の腫瘍化に関する研究
論文審査委員	主査 教授 坂口 卓也 副査 教授 須見 洋行 教授 岡 憲明

#### 論文内容の要旨

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。

#### 審査結果の要旨

西森君の論文は、人工多能性幹 (induced pluripotent stem = iPS) 細胞の再生医療応用に際し最大の難関とされている、その腫瘍化について詳細な検討を行なったものである。昨年春、日本では世界に先駆け iPS 細胞の臨床研究計画について審査が実質的に完了し、iPS 細胞より作製した人工組織の移植が目前に迫って来た。だが現在、移植後に腫瘍化が起こったとしても、切除する他に有効な対策は想定されていない。この様な潮流を鑑みれば、腫瘍を形成する iPS 細胞由来細胞を診断する技術、および iPS 細胞に由来する腫瘍の特徴付けとその抑制法を確立することは急務と言えよう。現実には盛んに検討されているとは言えないこれらの課題に対し、独自の視点を持って挑み有意な成果を挙げた点において、この論文を評価することが出来る。

本論文においては、① 人工組織・臓器を創生するには、iPS 細胞の分化が必須であるが、分化を促してもこれに抵抗する細胞が残存すること、② 分化した細胞に造腫瘍能は観察されないが、分化に抵抗する細胞には、癌を形成する能力があること、③ 分化に抵抗する細胞は、分化細胞と有意差を示す別形態を持ち、それは分化を促す前の iPS 細胞と同等であること、が報告された。

他機関から提出された報告と比較すると、これまで「造腫瘍能を持つ」という言葉でのみ表現されて来

た iPS 細胞由来細胞が癌を形成する脅威の存在であることを示した ② の結果は、極めて重要であろう。そして、マウスでは未分化細胞に特有の物質を遺伝子操作により生細胞で可視化し得るがヒトにこの技術を適用することは倫理的に行えないことを考慮すれば、ヒトにおいて iPS 細胞由来未分化細胞を診断する術を示した ③ の結果は注目に値する。

これらを総合すれば、西森君の論文は iPS 細胞を基盤とする再生医療の実現に重要な情報を提供するものとして、高く評価することが出来るであろう。従って、主査および副査は、本論文が博士論文として相応しいという審査結果をここに提出するものである。