

氏名(本籍)	綾部 太郎(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第 177 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	イヌ造血幹/前駆細胞の特性評価とイヌ iPS 細胞からの分化
論文審査委員	(主査) 久末 正晴 (副査) 藤井 洋子 田中 和明

論文内容の要旨

現代の医療・獣医療において、輸血療法は外科手術等の安全性向上や救急救命率向上に不可欠であり、重要な治療法である。国内におけるヒト医療では輸血用血液を安定的に確保するために、日本赤十字社によって整備された献血-輸血システムが確立されているが、一方、国内における獣医療では輸血自体が特殊な治療法であり、献血の普及や血液供給システムの整備はほとんど進んでいない。その理由として、獣医療では、薬機法の規制により各診療施設で献血募集および輸血用血液を調製しなければならないことや、獣医療における献血では、供血動物となる犬および猫が必ずしも献血採血時に温順ではなく、献血に伴い鎮静・麻酔下による採血が必要となる事が多いため、一般の飼い主に広く献血を募集するにあたって敬遠されやすいなどがある。これらのことから、献血-輸血システムによる輸血用血液の代替となる人工赤血球の開発とその実用化が切望されている。そのためにもイヌやネコにおける造血メカニズムの解明が重要となる。

造血幹/前駆細胞 (Hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC) とは、脊椎動物の血液細胞の源となる体性幹細胞である。ヒト医療において HSPC は、抗腫瘍療法として重度の化学療法を受けた患者の造血機能を再構築するための造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transfusion: HSCT) に使用される。また、血液再生医療研究に用いられる多能性幹細胞から赤血球、白血球、血小板を作製する過程においても必ず経由する重要な細胞である。しかし、ヒトやマウスではさまざまな報告がなされているにも関わらず、イヌの HSPC に特異的な表面抗原や遺伝子発現プロファイル等については未だ明らかになっていない。

そこで本研究の第 1 章では、まずはじめに健康なイヌで造血能を持つ骨髄中 HSPC の遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにすることを目的とした。イヌにおける HSPC の表面抗原マーカーはさま

ざまで、CD34 陽性 (CD34+)、CD34+/Linage negative (Lin-)、Wheat germ agglutinin (WGA)^{high}/Rhodamin 123 (Rh)^{low} などが報告されている。本研究では、ヒトとイヌに共通して報告されている CD34+細胞および CD34+/CD45-diminished (CD45^{dim}) 細胞を HSPC として仮定しその性状を解析した。まず健常犬から骨髓穿刺針および比重遠心法によりイヌ骨髓単核球細胞 (Bone marrow derived mononuclear cells: BM-MNC) を分離し、セルソーターを用いて全生細胞群、CD34+細胞群、CD34+/CD45^{dim}細胞群の3群に分離した。その結果、全生存細胞群、CD34+群、CD34+/CD45^{dim}群の陽性率はそれぞれ 49.42 ± 3.67%、0.36 ± 0.06%、0.16 ± 0.03%であった。続いて、全生細胞群をコントロールとし、CD34+細胞群、CD34+/CD45^{dim}細胞群の造血能をコロニーフォーミングユニットアッセイ (CFU-A) にて評価した。その結果、セルソーティングで採取したすべての細胞群において造血コロニー形成が認められた。また、イヌ BM-MNC1,000 個に対して、全生存細胞群、CD34+群、CD34+/CD45^{dim}群が形成するコロニー率はそれぞれ 0.06 ± 0.005、1.95 ± 0.60、6.7 ± 0.185%であり、CD34+/CD45^{dim}群の造血コロニー形成能は、他の群と比較して有意に高かった。このことから、イヌ CD34+/CD45^{dim}細胞群は、他の群と比較して有意に高い造血能を有していることが示された。最後に、3群における遺伝子発現プロファイルを RNA シーケンス (RNA-seq) 解析を用いて評価した。3群の遺伝子発現における主成分分析の結果、主成分 1 (PC1) では全生存細胞群と、CD34+群と CD34+/CD45^{dim}群を含むイヌ HSPC が明確に分離され、主成分 2 (PC2) では CD34+群と比較して、CD34+/CD45^{dim}群は収束していた。PC1 の寄与率は 93.96%であり、PC2 の寄与率は 3.46%であった。イヌの CD34+群と CD34+/CD45^{dim}群の対応する遺伝子発現と比較する発現変動解析を実施した結果、148 の発現変動遺伝子 (Differentially expression genes: DEG) を検出し、このうち、CD34+/CD45^{dim}群において 7 遺伝子が発現増加、141 遺伝子が発現低下した遺伝子であった。発現増加した 7 遺伝子のうち、4 遺伝子はヒトおよびマウス HSPC で関連が報告されている遺伝子であった。さらに、CD34+/CD45^{dim}群で発現低下した遺伝子の中で既知のものであった 131 の DEG を Gene ontology (GO) 解析したところ、KEGG パスウェイ解析において、発現低下した DEG には免疫細胞である B 細胞の受容体シグナル伝達経路 (調整 p 値 = 1.699×10^{-2}) が含まれていた。このことから、CD34+群にはセルソーティング時に使用された抗 CD34 抗体に非特異的結合した B 細胞が混入している可能性が示唆された。以上の結果から、イヌ CD34+/CD45^{dim}細胞群では、他の 2 群と比較して最も高い造血能を有し、ヒトおよびマウス HSPC と類似した遺伝子発現プロファイルを示したことで、最も HSPC としての特徴を発現していることが明らかとなった。

次に第 2 章として、ヒトやマウスの誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPSC) や胚性多能性幹細胞 (Embryonic pluripotent stem cells: ESC) のような無限増殖が可能な多能性幹細胞を原料とした体外での血液産生研究を応用し、イヌ iPSC を原料とした人工 CD34+/CD45^{dim}細胞の大量培養法の確立を試みた。具体的には、iPSC 分化研究で使用されている低分子化合物による効率的な HSPC 分化誘導法を参考にイヌ iPSC から CD34+/CD45^{dim}細胞を得るための分化培養実験を実施した。低分子化合物として中胚葉分化を促進させるとされる GSK3 阻害剤である CHIR99021 および造

血性内皮細胞 (Hemogenic endothelium: HE) 分化を促進させるとされる ALK 阻害剤である SB431542 を選択し、分化培養中の遺伝子発現および表面抗原発現を定量 RT-PCR およびフローサイトメトリー解析を用いて評価した。まずはじめに、イヌ iPSC 分化プロトコルの培養 1-3 日における CHIR99021 添加の影響を定量 RT-PCR を用いて評価した結果、中胚葉マーカーである *T(Brachyury)* は CHIR99021 の濃度依存的に発現が増加し、10 μ M で有意な増加が確認された。一方、*Mixl1* は CHIR99021 添加による発現に影響を示さなかった。HE・造血幹細胞マーカーである *CD34* および *GATA2* は、いずれにおいても培養 3 日後で増加が見られ、*CD34* 発現については CHIR99021 添加による有意な発現増加が確認された。続いて、イヌ iPSC 分化プロトコルの培養 5-7 日における SB431542 添加の影響を定量 RT-PCR を用いて評価した。その結果、造血幹細胞マーカーである *KIT*、*GATA2*、*Runx1* はいずれも分化培養 7 日後に有意な発現増加が見られたが、SB431542 添加群では非添加群に比べやや発現増加傾向を示すものの有意な差は見られなかった。HE マーカーである *CD34* は SB431542 添加によってむしろ発現低下傾向が見られた。また、同じく HE マーカーである *SOX17* では分化培養 7 日後で有意な発現増加が見られたが、SB431542 添加による影響を示さなかった。以上の結果から、イヌ iPSC の中胚葉・HE 分化過程において、CHIR99021 は中胚葉分化に有用である一方、SB431542 は HE 分化を阻害する可能性が示唆された。これらの結果を基に CHIR99021 を主軸とした HSPC 分化プロトコルを作成した。また、残存する iPSC を除去する目的で脂肪酸代謝阻害剤である Orlistat を添加することで、より純度の高い分化細胞を得ることを試みた。作成したプロトコルで分化培養を行ったところ、単一分散された細胞は分化培養 9 日後に顕微鏡下で内皮細胞様の形態を示した。続けて、分化培養 11 日後には近傍に浮遊細胞を伴った内皮細胞様細胞が確認された。分化培養 14 日後にフローサイトメトリー解析を実施した結果、イヌ HSPC マーカーである CD34⁺/CD45^{dim} 細胞群が 0.20 % 出現していた。これらをセルソーティングで単離し、CFU-A により造血能を評価したところ、BFU-E、CFU-E、CFU-GM の形成は見られなかった。第 1 章で得られた結果から CD34⁺/CD45^{dim} 群の造血コロニー形成率は約 6.7% であったことから、造血コロニー形成を確認するにはさらなる HSPC の分化効率の向上が必要であると考えられた。

本研究は、CD34⁺/CD45^{dim} 細胞群が活発な造血能と既知の HSPC 関連遺伝子発現が認められ、イヌ HSPC の有力な候補であることを明らかにした。さらに、イヌ iPSC からイヌ HSPC の分化誘導を試みたところ、中胚葉および HSPC 発生に関与する HE 関連遺伝子および表面抗原の発現が認められた。また、イヌ iPSC から少数ではあるが CD34⁺/CD45^{dim} 細胞群を誘導することにも成功し、世界で初めてイヌ iPSC から HSPC の性状を持つ細胞集団への分化誘導が可能であることを明らかにした。本研究の成果は、これまで不明確であった造血能が活発で純度の高いイヌ HSPC の性質を明らかにし、その定義づけに寄与すると思われる。造血の起点となるイヌ HSPC の性質が明らかになったことで、今後イヌ造血のメカニズム解明や iPSC 由来人工赤血球の開発が大きく推進するものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

この度、綾部太郎氏が博士課程において実施した論文「イヌ造血幹/前駆細胞の特性評価とイヌ iPS 細胞からの分化」について審査を行いました。以下、その概要について記載いたします。

1. 研究の背景

現代の医療・獣医療において、輸血療法は外科手術等の安全性向上や救急救命率向上に不可欠であり、重要な治療法である。一方、国内における獣医療では輸血自体が特殊な治療法であり、献血の普及や血液供給システムの整備はほとんど進んでいない。献血-輸血システムによる輸血用血液の代替となる人工赤血球の開発とその実用化が切望されている。そのためにもイヌやネコにおける造血メカニズムの解明が重要となる。

造血幹/前駆細胞 (Hematopoietic stem and progenitor cells: HSPC) とは、脊椎動物の血液細胞の源となる体性幹細胞である。ヒト医療において HSPC は、抗腫瘍療法として重度の化学療法を受けた患者の造血機能を再構築するための造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transfusion: HSCT) に使用される。また、血液再生医療研究に用いられる多能性幹細胞から赤血球、白血球、血小板を作製する過程においても必ず経由する重要な細胞である。

2. 研究の内容

イヌの HSPC に特異的な表面抗原や遺伝子発現プロファイル等については未だ明らかになっていない。そこで、本研究では将来的な *in vitro* における赤血球の再生を目指し、イヌ HSPC の性状解析とイヌ iPS 細胞からの HSPC 分化誘導を実施することとした。

研究 1 イヌ骨髄中造血幹/前駆細胞の性状解析

そこで本研究の第 1 章では、健康なイヌで造血能を持つ骨髄中 HSPC の遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにすることを目的とした。イヌにおける HSPC の表面抗原マーカーはさまざま、CD34 陽性 (CD34⁺)、CD34⁺/Lineage negative (Lin⁻)、Wheat germ agglutinin (WGA)^{high}/Rhodamin 123 (Rh)^{low} などが報告されている。本研究では、ヒトとイヌに共通して報告されている CD34⁺細胞および CD34⁺/CD45-diminished (CD45^{dim}) 細胞を HSPC として仮定しその性状を解析した。まず健康犬から骨髄穿刺針および比重遠心法によりイヌ骨髄単核球細胞 (Bone marrow derived mononuclear cells: BM-MNC) を分離し、セルソーターを用いて全生細胞群、CD34⁺細胞群、CD34⁺/CD45^{dim}細胞群の 3 群に分離した。その結果、全生存細胞群、CD34⁺群、CD34⁺/CD45^{dim}群の陽性率はそれぞれ 49.42 ± 3.67%、0.36 ± 0.06%、0.16 ± 0.03%であった。続いて、全生細胞群をコントロールとし、CD34⁺細胞群、CD34⁺/CD45^{dim}細胞群の造血能をコロニーフォーミングユニットアッセイ (CFU-A) にて評価した。その結果、セルソーティングで採取したすべての細胞群において造血コロニー形成

が認められた。また、イヌ BM-MNC1,000 個に対して、全生存細胞群、CD34+群、CD34+/CD45^{dim}群が形成するコロニー率はそれぞれ 0.06 ± 0.005、1.95 ± 0.60、6.7 ± 0.185%であり、CD34+/CD45^{dim}群の造血コロニー形成能は、他の群と比較して有意に高かった。このことから、イヌ CD34+/CD45^{dim}細胞群は、他の群と比較して有意に高い造血能を有していることが示された。最後に、3群における遺伝子発現プロファイルを用いた RNA シーケンス (RNA-seq) 解析を用いて評価した。3群の遺伝子発現における主成分分析の結果、主成分 1 (PC1) では全生存細胞群と、CD34+群と CD34+/CD45^{dim}群を含むイヌ HSPC が明確に分離され、主成分 2 (PC2) では CD34+群と比較して、CD34+/CD45^{dim}群は収束していた。PC1 の寄与率は 93.96 % であり、PC2 の寄与率は 3.46%であった。イヌの CD34+群と CD34+/CD45^{dim}群の対応する遺伝子発現と比較する発現変動解析を実施した結果、148 の発現変動遺伝子 (Differentially expression genes: DEG) を検出し、このうち、CD34+/CD45^{dim}群において 7 遺伝子が発現増加、141 遺伝子が発現低下した遺伝子であった。発現増加した 7 遺伝子のうち、4 遺伝子はヒトおよびマウス HSPC で関連が報告されている遺伝子であった。さらに、CD34+/CD45^{dim}群で発現低下した遺伝子の中で既知のものであった 131 の DEG を Gene ontology (GO) 解析したところ、KEGG パスウェイ解析において、発現低下した DEG には免疫細胞である B 細胞の受容体シグナル伝達経路 (調整 p 値 = 1.699×10^{-2}) が含まれていた。このことから、CD34+群にはセルソーティング時に使用された抗 CD34 抗体に非特異的結合した B 細胞が混入している可能性が示唆された。以上の結果から、イヌ CD34+/CD45^{dim}細胞群では、他の 2 群と比較して最も高い造血能を有し、ヒトおよびマウス HSPC と類似した遺伝子発現プロファイルを示したことで、最も HSPC としての特徴を発現していることが明らかとなった。

研究 2 低分子化合物によるイヌ iPS 細胞の造血幹/前駆細胞分化促進

次に第 2 章として、ヒトやマウスの誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPSC) や胚性多能性幹細胞 (Embryonic pluripotent stem cells: ESC) のような無限増殖が可能な多能性幹細胞を原料とした体外での血液産生研究を応用し、イヌ iPSC を原料とした人工 CD34+/CD45^{dim}細胞の大量培養法の確立を試みた。具体的には、iPSC 分化研究で使用されている低分子化合物による効率的な HSPC 分化誘導法を参考にイヌ iPSC から CD34+/CD45^{dim}細胞を得るための分化培養実験を実施した。低分子化合物として中胚葉分化を促進させるとされる GSK3 阻害剤である CHIR99021 および造血性内皮細胞 (Hemogenic endothelium: HE) 分化を促進させるとされる ALK 阻害剤である SB431542 を選択し、分化培養中の遺伝子発現および表面抗原発現を定量 RT-PCR およびフローサイトメトリー解析を用いて評価した。まずはじめに、イヌ iPSC 分化プロトコルの培養 1-3 日における CHIR99021 添加の影響を定量 RT-PCR を用いて評価した結果、中胚葉マーカーである *T(Brachyury)* は CHIR99021 の濃度依存的に発現が増加し、10 μ M で有意な増加が確認された。一方、*Mix11* は CHIR99021 添加による発現に影響を示さなかった。HE・造血幹細胞マーカーである *CD34* および *GATA2* は、いずれにおいても培養 3 日後で増加が見られ、*CD34* 発現については CHIR99021 添加に

よる有意な発現増加が確認された。続いて、イヌ iPSC 分化プロトコルの培養 5-7 日における SB431542 添加の影響を定量 RT-PCR を用いて評価した。その結果、造血幹細胞マーカーである *KIT*、*GATA2*、*Runx1* はいずれも分化培養 7 日後に有意な発現増加が見られたが、SB431542 添加群では非添加群に比べやや発現増加傾向を示すものの有意な差は見られなかった。HE マーカーである *CD34* は SB431542 添加によってむしろ発現低下傾向が見られた。また、同じく HE マーカーである *SOX17* では分化培養 7 日後で有意な発現増加が見られたが、SB431542 添加による影響を示さなかった。以上の結果から、イヌ iPSC の中胚葉・HE 分化過程において、CHIR99021 は中胚葉分化に有用である一方、SB431542 は HE 分化を阻害する可能性が示唆された。これらの結果を基に CHIR99021 を主軸とした HSPC 分化プロトコルを作成した。また、残存する iPSC を除去する目的で脂肪酸代謝阻害剤である Orlistat を添加することで、より純度の高い分化細胞を得ることを試みた。作成したプロトコルで分化培養を行ったところ、単一分散された細胞は分化培養 9 日後に顕微鏡下で内皮細胞様の形態を示した。続けて、分化培養 11 日後には近傍に浮遊細胞を伴った内皮細胞様細胞が確認された。分化培養 14 日後にフローサイトメトリー解析を実施した結果、イヌ HSPC マーカーである CD34⁺/CD45^{dim} 細胞群が 0.20 % 出現していた。これらをセルソーティングで単離し、CFU-A により造血能を評価したところ、BFU-E、CFU-E、CFU-GM の形成は見られなかった。第 1 章で得られた結果から CD34⁺/CD45^{dim} 群の造血コロニー形成率は約 6.7% であったことから、造血コロニー形成を確認するにはさらなる HSPC の分化効率の向上が必要であると考えられた。

3. 考察

本研究は、CD34⁺/CD45^{dim} 細胞群が活発な造血能と既知の HSPC 関連遺伝子発現が認められ、イヌ HSPC の有力な候補であることを明らかにした。さらに、イヌ iPSC からイヌ HSPC の分化誘導を試みたところ、中胚葉および HSPC 発生に関与する HE 関連遺伝子および表面抗原の発現が認められた。また、イヌ iPSC から少数ではあるが CD34⁺/CD45^{dim} 細胞群を誘導することにも成功し、世界で初めてイヌ iPSC から HSPC の性状を持つ細胞集団への分化誘導が可能であることを明らかにした。

論文審査

1) テーマの立て方

本研究のテーマはイヌの造血幹細胞の特徴化することを目的に設定され、入念な事前 リサーチにより CD34 および CD45 が造血幹細胞に重要であるという仮説のもと研究計画を起草されている。

2) 研究の背景

イヌの造血幹細胞とその再生に関する知見は獣医領域では乏しく、もっとも科学的エビデンスの蓄積が遅れている研究対象の一つである。小動物臨床では多くの血液疾患の症例が存在し、かつ輸血医療も整備が遅れ人工赤血球の開発が急務となっている。早期に質の高い血液細胞培養法を確立するこ

とはこれらの問題を解決する新たな 突破口となる。

3) 研究の方法

本研究ではイヌ CD34+/CD45dim 細胞群では、高い造血能を有し、ヒトおよびマウス HSPC と類似した遺伝子発現プロファイルを示したことで、CD34+/CD45dim がイヌ HSPC の有力なマーカーとなりえることが示唆された。また、イヌ iPS 細胞から HSPC を試みたところ GSK3 阻害剤である低分子化合物 CHIR99021 を添加したところ造血幹細胞マーカーである CD34 の発現増加が見られ、本分子が HSPC への分化に寄与することを明らかにした。これらの手法は最先端技術を駆使しており高いレベルの研究であると言える。

4) 研究の結果

膨大な量のデータについて、それを取捨選択し適切に整理し客観的に分析し結果を導き、図表を用いてわかりやすく記載している。

(ア) 考察と結論

得られたデータを客観的かつ俯瞰的に解析し、かつ合理的な結論を見いだしている。また結果に対する考察についても、マウスやヒトの先行事例の情報と比較検討し、イヌ特有の生物学的な特徴についてもしっかり言及している。

(イ) 参考文献 本テーマに関する過去の論文を取捨選択し十分に網羅し、これまでの研究で解明されなかったことを洗い出している。造血幹細胞についてはマウスやラット、ヒトの情報が主であるが、結果を考察するにあたり適切な論文を拾い上げ引用されている。

5) 審査結果

本研究の成果は、これまで不明確であった造血能が活発で純度の高いイヌ HSPC の性質を明らかにし、その定義づけに寄与すると思われる。造血の起点となるイヌ HSPC の性質が明らかになったことで、今後イヌ造血のメカニズム解明や iPSC 由来人工赤血球の開発が大きく推進するものと考えられた。以上のことから、本論文は博士（獣医学）の学位の授与にふさわしい業績であると判定した。

4. 本研究の総括

以上の知見は、イヌ HSPC の特徴を明らかにしただけでなく造血の制御にかかわる分子の一部を明らかにすることができた。特に第 1 章のイヌ骨髄中造血幹/前駆細胞の性状解析は厳正なる審査の末、国際雑誌 Front Vet Sci (2022 年 9 月 12 日;9:936623) に掲載されている。したがって綾部太郎氏の研究成果は獣医学の血液および再生医療学の進展に大きく貢献し高く評価すべきと考えられ、博士課程の論文として相応しいと判断する。