

審査結果の要旨

論文題目 「異種移植モデルによる造血幹細胞の遺伝子発現解析」
学位申請者 松澤 秀之

本論文は、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞が、個体内にてどのような状態で維持されるかについて明らかにするため、重度免疫不全マウスへ移植した後のヒト造血幹細胞画分を回収し、元の細胞との性状の差異を、網羅的遺伝子発現解析（マイクロアレイ解析）の手法を用いて調べた結果である。使用された重度免疫不全マウス（NOG マウス、NOD・scid・ γ c 欠損）は、申請者らが実験動物中央研究所との共同研究にて開発した異種細胞移植実験系であり、きわめて独自性の高い研究である。

ヒト臍帯血由来造血幹細胞として $CD34^+/CD38^-/Lin^{-/low}$ 画分を分離し（この細胞を A 画分 とした）、放射線照射によって造血系を破壊した NOG マウスに 1×10^4 個を移植した。18 週後に同マウス骨髓細胞を採取し、先と同様にヒト造血幹細胞画分を分取した（B 画分）。この細胞をさらに NOG マウスへ移植（二次移植）し、18 週後のヒト造血幹細胞画分を採取した（C 画分）。対照細胞として、成人由来の骨髓造血幹細胞（D 画分）を用いている。以上の4種の細胞より mRNA を抽出し、cDNA を調製後標識し、マイクロアレイ（Human Genome U133 Plus 2.0、Affmetrix）による発現解析に供した。4 群間の遺伝子発現情報は、様々なソフトウェアにて解析され、特に KEGG データベースによる経路カテゴリーにて細分化された。それぞれの比較を介して、(1) 異種の骨髓微小環境下でのヒト臍帯血由来造血幹細胞の性状変化（A vs B）、(2) 同細胞の異種骨髓微小環境下での加齢に伴う性状変化（B vs C）、(3) 同細胞の経年変化（A vs D）、について詳細に調べている。

その結果、①ヒト臍帯血由来造血幹細胞をマウス骨髓環境下にて維持することで生じた変化（A vs B）は、ヒト体内での経年変化（A vs D）と概ね一致していた、②それは特に、細胞増殖関連経路（細胞周期、細胞死等に関連）に多かった、③加齢に伴う性状変化（B vs C）としては、電子伝達系、タンパク質分解、DNA 修復に関連した経路が検出された。こうした結果は、NOG マウス移植実験系により、ヒト造血幹細胞が生理的環境下と概ね近い状態で維持されていることを示しており、本系の有用性が確認された。得られたデータをさらに詳細に解析することにより、ヒト造血幹細胞維持に重要な様々な要素を見出せる可能性があり、さらなる解析が期待された。

このような新たな研究成果に対し、各審査委員から以下のような質疑がなされた。

- 1) 造血幹細胞の確立の経緯について
- 2) 造血幹細胞各群の不均一性の違いが結果に及ぼす影響について
- 3) 移植後に造血再生に伴う過度の細胞分裂により、ヒト造血幹細胞で活性酸素種の産生が亢進される機序
- 4) 今回のマイクロアレイによる解析により、移植したヒト造血幹細胞において活性酸素が発生していることを示す遺伝子発現変化は認められたか
- 5) 臍帯血由来の造血幹細胞がヒト体内で発達・分化した際の遺伝子発現変化を検証するためのコントロールとしては、臍帯血移植を行った患者から分離した造血幹細胞が最適と考えられるが、その点について検討を行ったのか、あるいは今後実施する予定はあるのか
- 6) 様々なパスイデータベースが知られているが、今回、KEGG を用いた理由はどのようなもの

か。

7) ヒト幹細胞分画として Lin⁻CD34⁺38⁻は適切な分画であるのか

8) 今回の結果を踏まえて今後どのような研究が必要か

9) 今回のデータから、マウスでの三次移植にて造血再構築が不十分になる原因についてわかったことは何か

これらの質疑に対し、申請者は、自身の研究から得られた知見に加え、既報にて発表されたデータやその考察を踏まえ、的確な答弁を行った。こうした質疑応答の過程で、本研究にて得られたデータの有用性やその限界についても明らかにされ、今後の研究の方向性が議論された。申請者は、新たに報告された様々なデータ解析手法についてもよく把握しており、今後の研究の発展が期待される。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 松澤 秀之 は東海大学博士（医学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	博士（薬学）	穂積 勝人	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	医学博士	竹腰 進	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	浅原 孝之	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	安藤 潔	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（理学）	亀谷 美恵	医学部准教授	（医学研究科先端医科学専攻）