

## 論 文 審 査 の 要 旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

工藤 浩也

主論文の題目

題 目 Induction of macrophage-like immunosuppressive cells from mouse ES cells that contribute to prolong allogeneic graft survival.

(マウス ES 細胞からのアログラフト生着延長に寄与するマクロファージ様免疫抑制細胞の誘導)

および

掲載・審査委員名

掲載誌 PLOS ONE 2014;9:e111826

主査 北川 博昭

副査 鈴木 登

副査 佐藤 雄一

### [論文の要旨・価値]

**はじめに：**泌尿器科という立場から将来的に腎移植の Donor 不足に対して再生医療での対応を考えたが ES 細胞での再生医療では免疫抑制療法が必要となる。そこで多能性幹細胞を用いた新しい免疫抑制細胞を誘導し、その免疫効果について検討した。

**方法：**マウス ES 細胞(129X1/SvJmsS1c 由来の E14)を用い、培地に  $\alpha$ -MEN に 20% fetal bovine serum (FBS)を使用して day5 に embryoid body (EB)に誘導した。その後 OP9 細胞上で Granulocyte macrophage-stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)を添加して day10 まで培養を継続し、day15 に培地を交換、IL-4 を添加して、day20 に lipopolysaccharide (LPS) を添加して 48 時間後に細胞皿に強固に付着する細胞を回収した。この方法で培養した細胞を用いて、これが免疫抑制作用を示すのか検討を行った。

**結果：**アロリンパ球混合培養反応における T 細胞の増殖反応を carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE)を用いて測定する方法と thymidine up take を測定する方法を用いて ES-SCs が免疫抑制機能を持つことを証明した。次いで ES-SCs に発現する表面抗原を flow cytometry を用いて解析をおこない、マクロファージと類似した細胞表面抗原を持つことが示された。また、抑制機序を解明するために各種 inhibitor による抑制解除試験をおこなっている。最後に ES 細胞から誘導した心筋細胞をマウスに移植してその生着の差を確認した。以上の検討から、この細胞が免疫抑制機能を示すことから ES derived suppressor cells(ES-SCs)と命名している。

**考察：**免疫抑制解除試験では ES-SCs の免疫抑制能は NO の放出により T 細胞の活性化を抑制することが機序として考えられた。in vivo の実験として ES 細胞由来の心筋細胞をアロ腎被膜下に移植すると無治療群と比較して生着の延長が見られた。この ES-SCs は移植モデルでもその免疫抑制効果を示すことから、将来の臨床応用の可能性が示唆された。

**結論：**ES 細胞から誘導した免疫抑制細胞の抑制機序と抑制能を示すことができた。

### [審査概要]

2015 年 2 月 12 日に主査、副査、数名の陪席者の下におこなった。実験は留学先の北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野でおこなわれ、多能性幹細胞を用いた免疫抑制方の研究を vitro, vivo にわたり詳細におこない IF の高い雑誌に掲載された。マウス ES 細胞から免疫抑制細胞の誘導、接着細胞が免疫抑制能があることをどのような発想で考えたかなどの回答から、ご自身で苦労した様子がうかがえた。表題の Macrophage like immunosuppressive cells の部分で Macrophage とは言い切れなかった点が議論になったが紳士的に回答した。今後は食食能や CD 16, 32 について調べることが必要である点が指摘された。臨床応用についても質問があったが、効率よく誘導させることが必要であった。

## 最 終 試 験 結 果 の 要 旨

### [研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価]

大学院の決められた時間内に試験管内でおこなった vitro の実験を基に動物の腎皮膜下に細胞を植え込み、ES 細胞から誘導した心筋細胞をマウスに移植するなど、多彩なアイディアと優れた研究能力が認められた。また、あらゆる質問に対しても紳士的に回答し、専門的知識を持っていることが伺えた。英語に関してはこの論文を仕上げたことは十分な英語力があると確信し、Nature の一文を音読し翻訳してもらった。発音に関しては今後期待する。