HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト間葉細胞を用いた白血病幹細胞の長期培養法の樹立［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	伊藤, 沙和
Description	配架番号：2195
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12091号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61557
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sawa_Ito_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　伊藤　沙和

	主査	准教授　濵田　淳一
審査担当者	副査	教　授　山下　啓子
	副査	教　授　豊嶋　崇徳
	副査	教　授　秋田　弘俊

学 位 論 文 題 名

ヒト間葉細胞を用いた白血病幹細胞の長期培養法の樹立
(Development of an in vitro long-term maintenance system of myeloid leukemia stem cells using human mesenchymal stromal cells)

癌幹細胞は悪性新生物細胞の中でも特定の細胞群を指し、特性として癌細胞クローンを永久的に創造し、癌の母細胞となる細胞と定義されている。白血病幹細胞の研究では、マウス移植モデルが標準的実験方法とされていたが、最近はいくつかの限界が指摘されている。マウス移植モデルに比較して、生体外での癌幹細胞の長期培養は難しく、本来の癌幹細胞の特性を失わせてしまう可能性がある。癌幹細胞研究のさらなる発展のためにも、生体外での癌幹細胞培養法が必要である。申請者はヒト骨髄間葉細胞と白血病幹細胞の共培養により、白血病幹細胞の生体外培養モデルの確立を試みた。本研究において申請者は、第三者由来のヒト骨髄間葉細胞との共培養により、白血病幹細胞の表現型を維持し、主に静止期の細胞のまま長期間体外で培養することが可能であることを示した。さらに、体外培養後に採取した細胞が、幹細胞の性質であるマウスの骨髄への生着を維持していることも証明した。また白血病幹細胞の維持に、骨髄間葉細胞との細胞間接着が必要であることが、トランスウェル培養実験により証明された。以上の研究により、申請者はヒト骨髄間葉細胞による白血病幹細胞の長期培養法樹立が可能であることを示した。

審査にあたり、まず副査・山下教授から白血病幹細胞の概念、白血病細胞の表面マーカーと白血病幹細胞多様性の関係、症例毎の白血病幹細胞の多様性、白血病幹細胞と染色体異常の関係について質問があり、申請者は白血病幹細胞の概念の提唱者であるDick博士の知見を引用し、白血病幹細胞の概念自体も変遷していること、白血病幹細胞の表現型は多様であるが一般にCD34+CD38-分画に高頻度存在すると考えられていること、白血病幹細胞と染色体異常は必ずしも相関するものではなく、遺伝子変異あるいはエピジェネティックな異常などが白血病幹細胞に関与する仮説があると回答した。副査・豊嶋教授から、マウス移植モデルは特定のクローンを選択してしまう可能性があるが、骨髄間葉細胞との共

培養では元来のクローンを維持する利点があるかもしれないとのコメントの後、共培養後にCD34＋CD38-分画の細胞が相対的に増えているにも拘らずマウス移植モデルにて生着率が変化しない理由、移植片対宿主反応で最近保険採用された骨髄間葉細胞治療が白血病を促進してしまう危険性を本研究は示しているか、骨髄間葉細胞のみならず脂肪由来間葉細胞で同様の研究を行う意義、間葉細胞との相互作用が報告されている急性リンパ性白血病においても検討しているかについて質問があり、単一分画同士の比較ではない点、細胞集団が必ずしも同一で比較されていない点について、本研究の限界点として言及すべきであるとのコメントがあった。申請者は、共培養後にはCD45+の細胞を移植しておりCD34陽性細胞数で調節していないこと、本研究が間葉細胞治療の危険性に必ずしも直結しないこと、急性リンパ性白血病については今後検討する価値があること、同一患者検体から分画間の比較をしていない点および脂肪や胎盤由来の間葉細胞の検討がない点は本研究の限界であると回答した。副査・秋田教授から、本研究で細胞間接着の重要性が示されたが標的分子にはどのようなものが考えられるか、間葉細胞の標準化の具体的方法について質問があり、申請者は標的分子候補としてSDF-1-CXCR4系の接着因子が考えられ、この系がWntシグナルの活性化を促進して白血病の増殖に関与することが報告されていると回答した。間葉細胞の標準化には細胞株を使用するのが理想的だが、継代がより後期になると間葉細胞の機能が衰える報告もあるため、今後の検討が必要であると回答した。最後に主査・濵田准教授から、間葉細胞の培養条件、骨髄の微小環境の酸素濃度、この実験系に低酸素条件を加えること、細胞接着分子が同定されれば分子をコーティングすることにより体外での白血病幹細胞の培養が可能になるかについて質問があり、申請者は、間葉細胞の培養条件はすでに標準化されており臨床応用されていること、血小板溶解液などにより培養効率が改善されることを回答した。骨髄微小環境は低酸素状態であり実験をさらに低酸素状態で進めることにより新たな知見が生まれる可能性があること、細胞接着分子の同定により新しい培養系の創出が可能となることを回答した。

この論文は、ヒト骨髄間葉細胞と白血病幹細胞の共培養により白血病幹細胞の生体外培養方法を示した点で高く評価され、今後、骨髄微小環境における白血病幹細胞の維持機構を解明し、新たな治療法を開発するために有用な技術となることが期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。