

氏名(本籍)	え ま ひで お (長 野 県) 依 馬 秀 夫		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 1673 号		
学位授与年月日	平成12年11月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo (マウス胎児肝における造血幹細胞の増幅)		
主査	筑波大学教授	医学博士	長 澤 俊 郎
副査	筑波大学教授	医学博士	山 本 雅 之
副査	筑波大学助教授	医学博士	須磨崎 亮
副査	筑波大学助教授	医学博士	松 井 良 樹
副査	筑波大学助教授	医学博士	洪 谷 彰

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

マウス造血幹細胞は胎生9日ないし10日にyolk sac (YS) や aorta-gonad-mesonephros (AGM) と呼ばれる領域に初めて検出される。造血幹細胞は胎生11日前後に肝臓に移動し、さらに胎生15日以降に骨髄や脾臓に移動すると考えられている。このように胎児期の造血は場所を変えながら次第に確立されていくが、胎児肝は造血幹細胞プールの増幅の場として位置づけることができる。しかしながら、胎児肝ではどの時期からどの程度の幹細胞増幅があるかは明らかにされていない。

造血幹細胞を測定する方法としては骨髄移植系を用いた競合的造血再構築法 (Competitive Repopulation Assay, CRA) がもっとも信頼性が高く、HarrisonはこのCRAを用いて造血幹細胞を定量的に評価するために、Repopulating Unit (RU) という単位を導入した。一方、EavesらはCRU (competitive repopulating unit) という単位を提唱した。RUは造血幹細胞の活性量を示すのに対してCRUは造血幹細胞数を示している。そこで、両者を求めることでRU/CRUで定義される平均幹細胞活性 (mean activity of stem cells, MAS) を知ることができ、より正確な造血幹細胞活性の評価ができた。

本研究ではマウス胎児肝臓中におけるRU, CRU, MASを経時的に測定し、胎児の成長に伴う造血幹細胞増加の定量的評価を行うことを目的とした。

### (方法)

C57BL/6マウスの胎生11日から出生前日の胎生18日までの胎児肝を対象とした。Ly5コンジェニックマウスを使用することによりドナー細胞、レシピエント細胞、コンペティター細胞をFACS解析によって区別してCRAを施行した。一定数 ( $2 \times 10^5$ ) の成体骨髄細胞に対してある細胞数の胎児肝細胞を混合して致死量の放射線照射したマウスに移植した。移植後レシピエントマウスの末梢血における胎児肝由来の細胞の占める割合 (T) と骨髄細胞由来の細胞の占める割合 (C) を測定し、キメラ比 (T/C) を算出した。RUは $2T/C$ で求めた。CRUは限界希釈法により求めた。MASはある再防中のRU/CRUと定義した。

## (結果)

発達中の胎児肝臓に含まれる造血幹細胞活性 (RU) を求めたところ、胎生11日の胎児肝臓の造血幹細胞活性は検出感度以下であったが、胎生12日には平均50RU/liverを検出した。その後、肝臓の発達に伴い造血幹細胞活性は増加し、胎生16日目には約1600RU/liverを示した。しかし、胎生17日以降は現象傾向にあった。

胎生12日から16日までのRUの増加が造血幹細胞の絶対数に依存するかどうかを検討するため、胎生12日と16日の胎児肝臓に造血幹細胞数 (CRU) を求めた。胎生12日には40CRU/liverで胎生16日には約1500CRU/liverであった。これらの結果を基に平均造血幹細胞活性 (MAS) を算出すると、胎生12日のMASは1.25RU/cellで胎生16日のMASは1.06RU/cellであり、大差が無いことが判明した。

以上の結果から、発達中のマウス胎児肝臓では造血幹細胞は胎生12日に初めて胎児肝臓内に検出され、その数は約40個であった。また、この時点の造血幹細胞と同等の能力を持った造血幹細胞が、胎生16日までに40倍近くにまで増加し、胎生17日移行は減少することを明らかにした。

## (考察)

本研究で用いたCRAは1個の造血幹細胞を検出できる感度を持っているため、胎生11日の胎児肝臓のすべてを移植しても、肝臓由来の造血を検出できなかったことは、胎生11日目の肝臓中に造血幹細胞はほとんど存在しないものと考えられた。一方、胎生12日には約40個の造血幹細胞を検出した。これらのデータは胎生11日と12日の間にYSやAGMから造血幹細胞が移動するという考えを支持するものと思われる。

この間に、造血幹細胞活性、造血幹細胞数の両方が肝臓内で30～40倍に増加することが認められたが、MASに大きな変化は観察されなかったことから、平均して同じレベルの能力を持った造血幹細胞が肝臓内で増加したと考えられた。しかしながら、このことを検証するためには、胎生12日と16日の胎児肝臓から造血幹細胞を純化して、個々の造血幹細胞レベルでRUを比較する必要がある。この間に肝臓以外で造血幹細胞増加に関わる造血の場は知られていないため、この造血幹細胞の増加は自己複製に起因すると考えられる。この事は、胎児肝臓から造血幹細胞を分離して胎児肝臓に移植し、移植細胞が実際に増幅されるかを解析すると、あるいは胎児肝臓器培養法等を開発し、*in vitro*で造血幹細胞の増幅を再現することによって確かめることができると考えられる。胎生16日をピークとして造血幹細胞活性は減少傾向を示した。これは、造血幹細胞の骨髄や脾臓への移動、造血幹細胞産生の低下やアポトーシスを反映していると考えられるが、そのメカニズムの解明は今後の課題である。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究ではマウス胎児肝臓中における幹細胞活性 (repopulating unit, RU)、造血幹細胞数 (competitive repopulation unit, CRU) を測定し、RU/CRUで定義される平均幹細胞活性 (mean activity of stem cells, MAS) 経時的測定により、造血幹細胞活性の定量的評価を行い、発達中のマウス胎児肝臓では胎生12日に初めて胎児肝臓内に40個の造血幹細胞が、この時点の造血幹細胞と同等の能力を持った造血幹細胞が、胎生16日までに40倍近くにまで増加し、胎生17日以降は減少することを明らかにした。胎児肝臓内では造血細胞活性、造血幹細胞数の両方が30～40倍に増加するが、MASに大きな変化は観察されなかったことから、平均して同じレベルの能力を持った造血幹細胞が肝臓内で増加した可能性を示した。本研究の成果は胎児造血幹細胞の動態を新たな概念により定量的に評価した研究であり、今後に応用価値の高い結果と評価した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分に資格を有するものと認める。