

氏名(本籍)	須藤和寛(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2959号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells (加齢マウス造血幹細胞の性状の解析)
主査	筑波大学教授 医学博士 長澤俊郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 小島寛
副査	筑波大学講師 博士(医学) 谷口英樹

論文の内容の要旨

(目的)

造血幹細胞は全ての血液細胞の源となる細胞であり、分化と自己複製のバランスを保ちながら個体の一生に渡り血液細胞を供給し続けると考えられている。一般的に個体の各組織を形成する体細胞は加齢によってその能力が低下するが、造血幹細胞の能力を維持できる期間は個体の寿命よりもはるかに長いことが示唆されている。これまで、加齢マウス骨髄中に存在する造血細胞の能力については、造血幹細胞以外の細胞を多数含んだ細胞集団を用いて行われてきた。本研究では、加齢によって個々の造血幹細胞がどのように変化するかを詳細に検討することを目的とした。

(対象と方法)

1：加齢マウス骨髄中 CD34⁻KSL 細胞の解析とソーティング

2, 6, 12, 18ヶ月齢マウス骨髄細胞をFITC化CD34抗体, PE化Sca-1抗体, APC化c-Kit抗体, ビオチン化Lineage抗体にストレプトアビジン化TRを加えて染色し, それぞれのマウス骨髄中に存在するCD34⁻KSL細胞の頻度をFACSによって解析し, 必要に応じてソーティングした。CD34⁻KSL細胞は2ヶ月齢マウスにおいて少なくとも3個に1個以上の頻度で造血幹細胞を含む細胞分画である。

2：競合的骨髄再構築法

2, 6, 12, 18ヶ月齢マウスより採取したテスト細胞(全骨髄細胞またはCD34⁻KSL細胞)を, 2ヶ月齢マウスより採取した全骨髄細胞 2×10^5 個と混合し, 致死量放射線照射したマウスに尾静注によって移植した。移植後3ヶ月以上経過した時点で, 眼窩静脈より末梢血を採取し, 移植したテスト細胞由来の血液細胞の存在頻度を骨髓球系細胞, B細胞, T細胞それぞれについてFACSによって解析した。骨髓球系, B, T細胞すべての系統の細胞中において, テスト細胞由来の細胞が1%を越えた場合についてのみ, テスト細胞中に造血幹細胞が含まれていたと判断した。

3：コロニーアッセイ

a) in vitro コロニーアッセイ

2, 6, 12, 18ヶ月齢マウスCD34⁻KSL細胞をFACS Vantageによって一個ずつ96穴プレートにソーティングし, 10%FCSを含んだRPMIにSCF(10ng/ml)とIL-3(10ng/ml), またはIL-3(10ng/ml)単独を加えた液体培地中

で培養した。約2週間後にコロニーを形成した細胞の頻度を測定した。

b) in vivo CFU-S アッセイ

致死量放射線照射したマウスに2, 6, 12, 18ヶ月齢マウスCD34⁻KSL細胞をそれぞれ移植した。12日後に脾臓を取り出しそこに形成されたコロニーの数を計測することによって、各月齢マウスCD34⁻KSL細胞の持つCFU-Sとしての能力を測定した。

4: 二次移植

18ヶ月齢CD34⁻KSL細胞を移植したマウスから骨髓細胞を採取し、致死量放射線照射したマウスに 2×10^6 個ずつ移植し、初めに移植したCD34⁻KSL細胞由来の血液細胞が二次移植のレシピエント中においても長期に渡って産生され続けるかどうかを解析した。

(結果)

加齢に伴いCD34⁻KSL細胞は増加し、18ヶ月齢マウスにおいては2ヶ月齢マウスの約17倍の増加がみられた。これらの細胞のコロニー形成能に変化はなく、骨髓球系細胞への分化能は正常であることが示された。また、競合的骨髓再構築法による結果から、18ヶ月齢マウス骨髓中のCD34⁻KSL細胞中には2ヶ月齢マウス骨髓中の造血幹細胞と同様の能力を持つ造血幹細胞が存在することと共に、リンパ球系細胞への分化能の低下した欠陥型造血幹細胞が増加していることが明らかとなった。限界希釈法を用いた実験の結果、18ヶ月齢マウス骨髓中には造血幹細胞が2ヶ月齢マウスの約2倍存在し、CD34⁻KSL細胞中に含まれる造血幹細胞の頻度は23個に1個であることが示された。

(考察)

分化能に変化があっても自己複製能には変化がない欠陥型造血幹細胞を解析することにより、これまで不明な点が多かった分化と自己複製の制御のメカニズムが明らかにされる可能性が考えられた。また、これまで、骨髓移植のドナーとして高齢者の骨髓が用いられることはなかったが、今回マウスの研究によって得られた結果がそのままヒトにもあてはまるとすれば、高齢者をドナーとしても骨髓移植が成立する可能性が示唆された。

(結論)

マウス骨髓中において、長期骨髓構築能を持つ造血幹細胞は加齢によってその数を増加させ、18ヶ月齢マウスにおいては2ヶ月齢マウスの約2倍にまで増加していた。

加齢マウス骨髓中にはリンパ球系細胞、特にB細胞への分化能が低下した欠陥型造血幹細胞が増加していた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

造血幹細胞は分化と自己複製のバランスを保ちながら個体の一生に渡り血液細胞を供給し続けると考えられている。本研究は造血幹細胞の加齢について研究した論文であり、造血幹細胞はマウス骨髓中において、加齢によってその数を増加させ、18ヶ月齢マウスにおいては2ヶ月齢マウスの約2倍にまで増加し、リンパ球系細胞、特にB細胞への分化能が低下した欠陥型造血幹細胞が増加することを明らかにした。本研究から得られた結果は造血幹細胞の研究上重要な知見を含み、今後の研究にも指針を与える研究と評価した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。