

| | | | |
|---------|-----------------------------------|------|---------|
| 氏名(本籍) | こめの 野 琢 哉 (福井県) | | |
| 学位の種類 | 博 士 (医 学) | | |
| 学位記番号 | 博 乙 第 1,232 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平 成 8 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 | トロンボポエチンによるマウス骨髓造血幹細胞からの巨核球系細胞の誘導 | | |
| 主 査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 山 本 雅 之 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 小 山 哲 夫 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 中 山 凱 夫 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 三 澤 章 吾 |
| 副 査 | 筑波大学助教授 | 医学博士 | 中 原 朗 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

血球の産出・調節機構は重要な研究課題である。巨核球-血小板系においては、巨核球が骨髓中に少ないことや、分離、精製が困難な事、また、長年、巨核球-血小板系統特異的サイトカインとして想定されてきたトロンボポエチン (thrombopoietin : TPO) の存在が明らかでなかったことにより、他の血球に比し研究が遅れてきた。しかし、1994年に TPO がクローニングされ、さらに、造血幹細胞純化技術の進歩により、造血幹細胞から巨核球系細胞へと至る分化増殖機構を *in vitro* で解析することが可能となった。全骨髓細胞を用いた検討および *in vitro* での検討結果では、TPO は巨核球コロニー刺激活性と巨核球成熟活性の双方の作用を持つと考えられている。

ところで、造血に関与するサイトカインの作用を検討する場合、純化された細胞を用いることで、各サイトカインの標的細胞に対する影響をより正確に評価できることが知られている。本研究では、マウス骨髓造血幹細胞から巨核球造血に至る過程で TPO が果たす役割を、そのような純化した標的細胞を用いることにより解明することを目的とし、最終的に、骨髓造血幹細胞および巨核球前駆細胞 (CFU-Meg) の培養系を少数の細胞 (細胞数200/well) を用いて確立した。

(対象と方法)

マウス骨髓細胞から比重遠心法で単核球分画を分離後、ピチオン化した各分化抗原に対する抗体 (抗 Lineage (Lin) 抗体) とアビジン結合マグネットビーズを用いて分化抗原陰性分画 (Lin⁻細胞分画) を濃縮し、蛍光標識した抗 Sca-1抗体、抗 c-Kit 抗体、抗 Lin 抗体で濃縮 Lin⁻細胞を3重染色後、フローサイトメトリーにより Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺細胞を分離し、造血幹細胞として用いた。この Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺細胞は、致死量放射線照射マウスに100個移植することで顆粒球系、リンパ球系双方の長期骨髓再構築が可能な細胞である。

巨核球前駆細胞は、マウス骨髓細胞から濃縮 Lin⁻細胞を作成後、蛍光標識した抗 c-Kit 抗体および血小板糖蛋白に対する抗 GP II b 抗体で染色し、フローサイトメトリーで c-Kit⁺/GP II b⁺細胞を分離して用いた。

(結果及び考察)

造血幹細胞の培養では、TPO 単独で細胞の増殖や巨核球産生は認められなかった。すなわち、TPO は単独で

造血幹細胞に作用し、巨核球産生を誘導することはできないと結論された。巨核球の出現には、同培養環境に Stem Cell Factor (SCF) と Interleukin-3 (IL-3) の存在を必要とし、なかでも SCF⁺/IL-3⁺/TPO⁺/EPO (erythropoietin) の組み合わせでもっとも高率に巨核球が誘導されることが判明した。一方、巨核球前駆細胞の培養では、TPO 単独で巨核球コロニーが出現し、TPO は単能性前駆細胞である CFU-Meg に対してコロニー増殖活性を有し、それ以後の巨核球-血小板系の制御に関与するものと考えられた。同様に巨核球コロニー増殖活性を持つとされる IL-3 との比較では、IL-3 単独の培養系で、造血幹細胞から少数の巨核球が誘導され、IL-3 は TPO に比しより未分化な造血細胞レベルに対し作用するものと推察された。

造血幹細胞の液体培養では、TPO と他のサイトカイン (特に SCF) との共存下において、巨核球の誘導のみならず、顆粒球、単球、赤芽球などの細胞増殖の増強が観察された。また、半固形培地によるコロニーアッセイでは、培養早期のクラスター数は TPO 添加により増加した。この結果から TPO が SCF などと相乗作用により造血幹細胞からの分化過程の早期に、巨核球系を含む多血球系に作用する可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、トロンボポエチン (TPO) という新しく発見されたサイトカインの造血幹細胞と巨核球前駆細胞への作用を血液学・細胞生物学的に解析したものである。本解析から、1) TPO は単独では造血幹細胞の増殖促進活性はないものの、SCF や IL-3 と組み合わせると顕著な同活性を示すこと、2) TPO は巨核球前駆細胞 (CFU-Meg) に相当する細胞には単独で増殖と分化の促進活性を示すことを明らかにした。本研究過程で、候補者らは巨核球前駆細胞 (CFU-Meg) が、c-Kit と GP II b の両者の発現が陽性な画分として単離できることも明らかにしている。このように、本研究は巨核球分化の研究の一局面を切り開いたものと評価される。

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。