

氏名(本籍)	まつ さき ゆ み (茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,744号		
学位授与年月日	平成9年3月24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	Role of Bcl-2 in the Development of Lymphoid Cells from the Hematopoietic Stem Cell. (造血幹細胞からリンパ球系細胞への分化における Bcl-2 の役割)		
主査	筑波大学教授	医学博士	三輪正信
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	山本雅之
副査	筑波大学教授	医学博士	渡邊照男
副査	筑波大学助教授	医学博士	長澤俊郎

論文の内容の要旨

(目的)

Bcl-2 はアポトーシスを抑制する機能を持った分子量25 kd の膜蛋白として知られている。bcl-2 は細胞の分化段階に応じて発現が調節されており、このことから細胞分化あるいは生存に何らかの役割を果しているのではないかと考えられてきた。しかしながら、bcl-2 の生体内での T 細胞分化などにおける役割およびその生化学的な性質については未だ明らかではない。

我々は bcl-2 の生理的役割を明らかにすることを目的として、ES 細胞とジーンターゲットングの技術を用い、bcl-2 遺伝子の loss of function の変異マウスを作製した。その結果、bcl-2 はリンパ球の分化そのものには関与せず、成熟リンパ球細胞の生存とそれによる免疫系の維持に関与していると考えられた。しかしながら、これらのノックアウトマウスの解析では幾つかの疑問点が不明のままであった。第一に、胸腺細胞の特定の分面には変動が見られずに胸腺細胞数全体が低下していることは成熟細胞の寿命が短いことのみでは説明ができない。bcl-2 の発現は CD 4 又は CD 8 のいずれか一方が陽性 (SP) の細胞ばかりでなく、CD 4, CD 8 の両方が陰性 (DN) の未熟な胸腺細胞においてもみられることから、DN 以前の段階でも bcl-2 の欠損によって何等かの異常が起こっている可能性がある。第二に、何故、生後 1-2 週までは正常にリンパ球が分化するのに、その後リンパ球のみが強く傷害されるのかの理由が不明である。

bcl-2 欠損マウスは多嚢胞腎のために生後 6 週を限度として殆どのマウスが多嚢胞腎を原因とする尿毒症で死亡してしまうため、これらのことを明らかにするのに必須な長期的な観察が困難である。本研究ではこの問題を解決するため、bcl-2 欠損マウス造血幹細胞を正常マウスに移植することにより骨髓キメラマウスを作製し、bcl-2 欠損血球細胞自身の造血能の長期的な解析を行った。また、リンパ球減少がどの分化段階で起こるのかを明らかにするため、初期分化を含むさまざまな分化段階でのリンパ球分化を解析した。

(対象および方法)

1) 4 週齢の bcl-2 ノックアウトマウスにおける、各種リンパ組織中に含まれる細胞数およびそのポピュレーションの FACS 解析を行なった。2) 3-4 週齢の bcl-2 ノックアウトマウスの骨髓細胞に対し c-kit, Sca-1,

Lineage marker (Lin) で染色し, c-kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻細胞を FACS にてソーティング, 致死量放射線照射マウスに静注後, 週を追って末梢血を採取し, キメリズムおよび Myeloid Lymphoid 細胞の末梢血における割合を解析した。3) bcl-2 欠損造血幹細胞のキメラマウス作製後 8 カ月が経過したところで, マウスを屠殺して骨髓細胞を採取し, 骨髓における B 細胞分化および胸腺における T 細胞分化の解析を行った。4) 半致死量放射線照射 B6-Ly5. 1 マウス胸腺に 2×10^3 個の c-kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻細胞を移入し, 4 週後に Ly-5. 2 陽性の bcl-2 欠損マウス由来胸腺細胞について CD4, CD8, TCR の発現を解析した。

(結果および考察)

骨髓に生着した成熟マウス由来の bcl-2 欠損造血幹細胞は長期的に造血系を再構築し, 正常数の非リンパ球系細胞を産出した。その一方, リンパ球は著明に減少し, 特に成熟 T 細胞は全く検出されなかった。また, リンパ臓器特異的にキメリズムが低下していた。特に胸腺のキメリズムは骨髓中と比較し有意に低く, T 細胞分化は全く観察されなかった。しかしながら bcl-2 欠損造血幹細胞は胸腺に直接移入されることにより正常な T 細胞分化を行い得た。また, 骨髓中の B 細胞分化は観察されたものの, その絶対数は優位に低かった。したがって, 成熟マウスにおける bcl-2 欠損造血幹細胞からの T 細胞分化は, 胸腺以前の前駆細胞の段階で強い阻害を受け, 胸腺への前駆細胞の供給が阻害されていることが示唆された。一方, 胎仔肝由来の造血幹細胞を移植したレシピエントマウスでは, 移植後 3 ヶ月まで正常数の成熟 T・B リンパ球が検出された。したがって, 成熟マウス由来の造血幹細胞と胎仔肝由来の造血幹細胞ではアポトーシス刺激に対する感受性が本来異なっていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は bcl-2 遺伝子ターゲティングマウス造血幹細胞を用い, 正常マウスに移植することにより血球細胞内の bcl-2 を欠損した造血系を再構築し, 血球細胞分化における bcl-2 遺伝子の役割を検討している。その結果, 1) 造血幹細胞の自己増殖と長期的な造血系の維持および非リンパ球細胞の分化増殖には bcl-2 を必要としないこと 2) リンパ球分化は T・B 共通の前駆細胞のレベルで強く阻害されていること 3) 胸腺内 T 細胞分化を維持するために前駆細胞を恒常的に供給するには, リンパ球幹細胞のレベルで bcl-2 の発現を必要とすること 4) 成熟マウス造血幹細胞と胎仔性造血幹細胞とではリンパ球初期分化における bcl-2 の必要性が異なっていること, などが示唆された。

以上のように, 本研究によって bcl-2 と血球分化に関する多くの知見が得られ, またその報告は国際誌に掲載されるなど, 高く評価されるものである。

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。