

氏名(本籍)	小 ^こ 松 ^{まつ} 恒 ^{つね} 彦 ^{ひこ} (茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,284号		
学位授与年月日	平成6年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	血管内皮細胞上における巨核球の細胞突起形成		
主査	筑波大学教授	工学博士	大島 宣雄
副査	筑波大学教授	医学博士	板井 悠二
副査	筑波大学教授	医学博士	中内 啓光
副査	筑波大学教授	医学博士	深尾 立
副査	筑波大学助教授	理学博士	牧野 誠夫

論文の要旨

〈目的〉

血液細胞の分化、増殖には骨髄の造血微小環境が大きな役割を担っている。多能性幹細胞が周囲の細胞の影響を受け段階的に各系統の血球細胞へと分化する。血小板も巨核球を母細胞として分化・派生するが、巨核球の分離、培養が困難であったため、その成熟過程には未解明の部分が多い。成熟した巨核球は骨髄静脈洞の血管内皮細胞の背面に基底膜を介して存在する。そして基底膜の小開口から内皮細胞の細胞質を貫いて細胞突起を静脈洞内に延ばし、血小板を血流中に放出すると考えられている。よって、巨核球成熟の最終段階に血管内皮細胞が大きく関与することが想定される。

そこで本研究では、臍帯静脈由来の血管内皮細胞の上で、ヒト骨髄から分離精製した巨核球を培養して、その形態変化を経時的に追跡するとともに、巨核球と血管内皮細胞あるいは細胞外基質との間に、接着分子(adhesion molecule)を介在した巨核球造血促進機構が存在するか否かを明らかにすることを目的とした。

〈実験方法と結果〉

(1) 巨核球の分離法の確立

まず、ヒト骨髄からの巨核球分離法を確立するために、Percoll液を用いる物理的分離法を改良することを試みた。この方法の特徴は、細胞を密度差でまず分離し、次いで細胞のサイズで分離する二段階の分離法を採用したことにある。これにより、巨核球の回収率、純度、精製率を改善することができた。

(2) 巨核球の細胞突起形成過程の観察

次に、ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞のシート上で、分離された巨核球を培養し、巨核球の細胞突起形成過程の観察及び細胞突起形成に影響を与える因子の検討を行った。

内皮細胞上で培養すると、巨核球は血管内皮細胞または細胞外基質に接着し、外因性の造血因子を加えることなしに細胞突起(proplatelet process)を形成した。細胞突起を形成する巨核球は、形態的には、一本の突起を伸ばし、細胞本体は球状を保つ single-process type と、複数の突起を伸ばして細胞本体も泡状に変化する multi-process type の2種類に大別することができた。また、各々のタイプの突起形成の連続的な過程をビデオ撮影によって初めて記録することに成功した。

Single-process type の細胞突起の形成過程は、まず細胞表面に小隆起(notch)が生じ、notch が細胞質を糸状に引きながら遠ざかり約1時間で胞体から分離した。また multi-process type の細胞突起形成過程は、まず細胞表面が不明瞭になり、続いて細い突起が複数出現し、約6時間にわたり次々と新しい突起が出現し、その後、巨核球本体は縮小して細胞突起形成は終了した。

(3) 巨核球の細胞突起形成に対するサイトカイン及び接着分子の影響

次に IL(interleukin)-1 β , 抗 PECAM(platelet/endothelial cell adhesion molecule)-1抗体, 抗 ICAM(intercellular adhesion molecule)-1抗体の血管内皮細胞を介した巨核球細胞突起形成への影響を検討した。ここで、培養細胞の機能の指標としては、細胞突起形成率—すなわち、全体の巨核球に対する、細胞突起を形成した巨核球の割合を用いた。

血管内皮細胞または巨核球に抗 PECAM-1抗体を作用させた系では、培養2日目の細胞突起形成率は対照に比べ大きく減少したが、以後増加し、培養6日目にはほぼ対照と同じ値となった。

血管内皮細胞を IL-1 β で刺激した実験では、培養2, 4日目の細胞突起形成率が上昇し、4日目に peak を示した。培養2, 4日目には細胞突起形成率の上昇が抑制された。また、IL-1 β で刺激された血管内皮細胞に抗 PECAM-1抗体を作用させると、培養2日目の細胞突起形成率が大きく減少したが、4日目にはやや増加し、6日目にはほぼ対照と同じ値となった。

Multi-process type 及び single-process type の細胞突起形成率に関しては、対照の系では培養2, 4日目に multi-process type が優位であったが、血管内皮細胞に抗 PECAM-1抗体を作用させた系では常に single-process type が優位であり、巨核球に抗 PECAM-1抗体を作用させた系では、培養2日目は single-process type が優位であり、培養4, 6日目は multi-process type が優位であった。しかし細胞突起形成率自体はいずれも減少していた。IL-1 β で血管内皮細胞を刺激した系では、培養2日目には multi-process type が優位であったが、培養4日目以降には single-process type が優位であった。しかし、この系では細胞突起形成率は両方のタイプの細胞においても増加を示した。IL-1 β で刺激された血管内皮細胞に抗 ICAM-1抗体を作用させた系では、常に multi-process type が優位であった。また IL-1 β で刺激された血管内皮細胞に抗 PECAM-1抗体を作用させた系では、培養2日目は single-process type が優位であったが、以後はこの傾向は逆転し、培養6日目には multi-process type が大きく増加した。

<考察>

以上の結果から、巨核球の細胞突起形成の様式には少なくとも2種類があることが考えられ、IL-1

β で血管内皮細胞を刺激すると細胞突起形成率は上昇し、抗 PECAM-1抗体、抗 ICAM-1抗体などの接着因子に対する抗体によって細胞突起形成率は正または負に制御された。また細胞突起形成率の検討から、single-process type の細胞突起形成には接着因子が重要な役割を占め、multi-process type には液性因子が重要な役割を担い、その作用が巨核球に現れるまでに一定の時間を要することが観察された。本研究で用いた実験系は、他の巨核球成熟刺激(または阻害)因子の assay 系としても有用と思われる。

審 査 の 要 旨

本研究の主たる成果として、ヒト巨核球の培養に供するための巨核球分離法を確立し得たこと、更にその手法を基礎として巨核球の培養を行い、細胞突起形成の経時過程を鮮明なビデオ画像として内外で初めて観察、記録したことは、造血制御機構の解明という重要な意義をもつ研究領域に貢献するものとして、積極的に評価できる。

著者はまた、細胞突起形成過程に及ぼす因子の検討のため、二、三の接着分子の影響を検討しているが、データ量がやや不十分であり、また実験の性格に由来する制約として、データのバラツキが大きく、確定的な結論を得るには、培養法の改善を含めた今後の検討が必要と思われる。しかしながら著者は、本研究を通じて、臨床医学研究の基本的な能力を習得したと判定される。

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。