

氏名(本籍)	しょう ぎき ゆ か 正 壽 由 香 (広 島 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 2674 号		
学位授与年月日	平成13年3月23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	Characterization of mouse hematopoietic stem cells (マウス造血幹細胞の性状解析)		
主査	筑波大学教授	医学博士	中内啓光
副査	筑波大学教授	博士(医学)	高橋智
副査	筑波大学助教授	医学博士	長田道夫
副査	筑波大学助教授	医学博士	松井良樹

論文の内容の要旨

(目的)

造血幹細胞は自己複製能と種々の血球に分化できる能力を兼ね備え、一生にわたり血球を供給する重要な細胞であるが、その存在頻度の低さや、ポジティブマーカーの欠如、有効な ex vivo での増幅法の欠如などから実体の解明が遅れていた。最近、新たなヒト造血幹細胞のポジティブマーカーとして KDR (別名 VEGFR2/マウス Flk-1) が報告された。そこで、KDR がマウス造血幹細胞に対しても有効なポジティブマーカーとなりうるかどうかを調べるとともに、造血幹細胞の自己複製因子の同定を目指して、マウスストローマ細胞株 S1 細胞を用いて造血幹細胞の長期培養を行い長期骨髄再建能を持つ幹細胞の ex vivo での増幅法を検討した。

(対象と方法)

C57BL/6 マウス (8~10 週齢) より骨髄細胞を分取し、Hoechst33342 で染色後、CD34, Flk-1 抗体あるいは Rhodamine123 で染色し、FACS 解析と幹細胞分画のソーティングを行った。ソーティング後の細胞を致死量の放射線照射したマウスに 100 個/匹となるように尾静脈投与し、移植 2-6 カ月後に FACS 解析により長期骨髄再建の有無を検討した。新たに樹立されたマウスストローマ細胞株 S1 細胞上にソーティング後の細胞を共培養し、幹細胞・血球前駆細胞増殖の指標となるとされる cobblestone area-forming cells assay を行った。S1 細胞の造血幹細胞支持能のうち、細胞接着と分泌物のどちらが重要であるかを調べるため、セルインサートを用いた三次元培養を行った。共培養後、各種系統のマーカーで免疫染色し、多分化能を調べるとともに、共培養後の細胞中に造血幹細胞が存在するかどうか調べ、Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺細胞をソーティング後、致死量の放射線照射したマウスに尾静脈投与し、2 カ月後と 6 カ月後に FACS 解析を行い長期骨髄再建能について検討した。

(結果)

- (1) Hoechst33342 で同定される SP 細胞中には、Flk-1⁺CD34⁺細胞と Flk-1⁺CD34⁻細胞のいずれもが存在しなかった。また、Rhodamine123 陰性 side population (SPR) 細胞、Flk-1⁺CD34⁺細胞と Flk-1⁺CD34⁻細胞を致死量の放射線照射したマウスに尾静脈投与したところ、SPR 細胞のみで長期骨髄再建再構成が可能であった。
- (2) SPR 細胞、Flk-1⁺CD34⁺細胞、Flk-1⁺CD34⁻細胞のそれぞれをマウスストローマ細胞株 S1 細胞上で共培養す

ると、SPR細胞においてのみcobblestone areaの形成を伴う長期のex vivoでの増殖が観察された。また、セルインサートを用いた三次元培養の結果から、ストローマ細胞と幹細胞を接着させたものでは増殖が確認されたが、ストローマ細胞分泌物を共有するのみの形態では増殖が確認できなかった。

(3) SPR細胞とS1細胞の共培養後の細胞を各種系統のマーカーで免疫染色し、多分化能を調べたところ、15日目～20日目までは赤血球系、モノサイト/マクロファージ系が、その後はリンパ球系細胞が観察された。この間、SP cells, Flk-1⁺CD34⁺細胞, Flk-1⁺CD34⁻細胞ともに、減少する傾向が見られた。また、共培養後の細胞集団にSca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺細胞が存在し、これらの細胞が長期骨髄再建能を持っていることが確認された。

(考察)

ヒトにおいては造血幹細胞ポジティブマーカーとして報告されたKDRだが、マウスにおいてはむしろCD34陰性の分画に造血幹細胞が存在することを示唆する結果となった。CD34マーカーと同様に、その造血幹細胞のマーカーとしての扱いに関してさらなる検討が必要と考えられた。SPR細胞とS1細胞の共培養実験の結果から、S1細胞は造血幹細胞の自己複製をある程度支持する能力を持っていると考えられる。その際に細胞接着が必須であることから造血幹細胞のex vivoでの培養には、S1細胞の細胞表面上の膜タンパク質が関与している可能性が示唆された。今後この分子の遺伝子単離同定と、マウス及びヒト造血幹細胞のex vivoでの増幅法を開発することが重要である。

(結論)

マウスにおいてKDRは造血幹細胞のポジティブセレクションマーカーとしての使用は難しいと判断した。

造血幹細胞のex vivoでの維持・培養には、S1細胞の細胞表面上の膜タンパク質が重要な役割をはたしていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

骨髄移植に纏わるドナー不足、拒絶反応、GVHD、倫理的な問題等を解決し、遺伝子治療、自己免疫病、癌の治療などに適応を広げるうえで造血幹細胞のex vivo培養法の確立は必要不可欠である。本研究ではマウス骨髄細胞中に存在する造血幹細胞を同定分離するためのポジティブマーカーの探索と、ストローマ細胞との共培養系を造血幹細胞のex vivo培養法を目指した。その結果、ヒト造血幹細胞となり、マウス造血幹細胞はKDRを発現しておらず、ポジティブマーカーとして使用できないことが判明した。しかしながらストローマ細胞との共培養によりある程度造血幹細胞を維持・培養できること、細胞間の接触が造血幹細胞の維持・培養に必須であることを明らかにした。造血幹細胞の自己複製に関する因子の分離同定につながる重要な研究である。

以上より、本研究は博士論文として十分であると評価した。

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。