

氏名(本籍)	おお さわ まさ たけ 大 沢 匡 毅 (群馬県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 1,316 号		
学位授与年月日	平 成 9 年 7 月 25 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	Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell (一個の CD34-Low/Negative 造血幹細胞による長期骨髓再建)		
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	深 尾 立
副 査	筑波大学教授	医学博士	三 輪 正 直
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)

赤血球・白血球などの血液細胞は、骨髓中に存在する造血幹細胞に由来する。造血幹細胞は、各種の血液細胞に分化する多分化能と自分を複製する自己複製能の2つの能力を保持している。動物個体においては、造血幹細胞の分化と自己複製が厳密に制御されることによって、一生にわたり血液細胞が供給され続ける。このような厳密な制御機構がどのように成り立っているのかを解明することは、細胞の増殖・分化の制御機構を探究する上で1つのモデル系となると考えられ、興味深い。また、造血系の制御機構の失調は各種血液疾患として現れるので、この機構を解明することは臨床的にも重要性が高いと思われる。造血幹細胞は存在頻度が極めて低いために、長い間その実体を同定することができなかったが、しかし、近年 FACS (細胞分離分取装置) をはじめとする細胞分離技術が飛躍的に向上し、多くの試行がなされるようになった。本研究は、造血幹細胞の単離と解析を目的とする。

(方法)

著者らは以前、c-Kit に注目し、FACS 法で得られる $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$ 細胞が造血幹細胞としての特性を持った細胞分画であることを報告した。 $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$ 細胞はマウス全骨髓細胞の約0.08%を占め、100個の細胞を移植するだけで致死量の放射線照射されたマウスの造血を長期に渡り再構築できる。しかし、 $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$ 細胞であっても、コロニー形成率は40%程度であり、さらに純化する必要がある。そこで、著者らは同細胞をさらに純化するための新たなマーカーとして CD 34 に注目した。CD 34 は分子量105~150 kDa の膜タンパク質であり、L-selectin のリガンドとして細胞接着に関与している。ヒトにおいては、造血前駆細胞や血管内皮細胞に発現している。そこで、著者はマウス CD 34 に対するモノクローナル抗体を利用して、FACS 法によりマウス CD 34 分子の発現様式について解析をおこなった。

(結果及び考察)

マウス骨髓単核細胞における CD 34 の発現様式は c-Kit の発現様式と似ており、CD 34 陽性細胞の多くが Lineage 陰性 (Lin^-) であった。 $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$ 細胞画分の90%以上が CD 34 により強く染色されたが、し

かし、僅かながら CD 34陰性または弱陽性の画分も存在した。Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞のうち、CD 34陽性画分と陰性画分のどちらに造血幹細胞としての活性が存在するのかわ、脾コロニー法 (CFU-S) と造血再構築法により調べたところ、CFU-S 形成細胞の大半が CD 34⁺/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞中に存在しており、同細胞は CD34⁻/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞中にほとんど認められなかった。CFU-S 形成細胞は若干分化の進んだ造血前駆細胞に相当し、最も未熟な幹細胞は CFU-S を形成しないと報告されていることから、CD 34⁺/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞中には若干分化の進んだ細胞が含まれていると考えられる。

次に、造血再構築能について調べたところ、CD 34⁺/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞を移植した場合には、短期の多系列に及ぶ造血再構築能のみが観察された。それに対し、CD 34⁻/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞を移植した場合には、初期の再構築能は低いが、移植後 2 週後から徐々にドナー由来の血液細胞が認められるようになり、その後 1 年以上の長期に渡って造血再構築能が維持された。以上より、長期造血再構築能を持つ最も未分化な造血幹細胞は CD 34⁻/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞中に特異的に存在していることが示唆された。

この細胞分画中の造血幹細胞の頻度を推定する目的で、ACDU 装置により 96 穴プレートに 1 穴につき 1 個ずつの細胞を分取し、1 個の細胞レベルでのコロニーアッセイを行った。その結果、CD34⁻/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞中の 80% 以上もの細胞が混合コロニーを形成した。このことから、同細胞がほぼ均一な幹細胞集団であることが示唆された。また、CD34⁻/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞がクローナルな性質を持った細胞であることを証明するために、この細胞 1 個ずつを 96 穴プレートに分取し、Rescue 細胞 (500 個の CD34⁺/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞) と共に致死量放射線照射したマウスに移植した。その結果、1 個の細胞を移植した場合でも約 20% の確率でドナー由来の多系列への血液細胞への分化が認められ、移植した 1 個の細胞による造血は、その後 1 年以上に渡って持続して観察された。これら結果より、純化した CD34⁻/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞分画中に非常に高頻度で造血幹細胞が存在していることが証明された。

審査の結果の要旨

本研究は、マウス骨髄中の CD34⁻/Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺細胞が造血幹細胞としての性質を持つ細胞であることを明らかにした。同細胞はマウス全骨髄細胞中の僅か 0.004% にしか満たない細胞であるが、著者は Magnet ピーズと FACS による純化法を組み合わせることで、このような細胞も分離することが可能であることを明らかにした。この結果は、ヒト造血幹細胞が CD34 陽性画分に存在しているという結果と矛盾しているように思われる。著者らはこのことの説明として、ヒトとマウスの CD34 分子の発現パターンに差が存在する可能性と、さらに、未分化なヒト造血幹細胞が CD34 陰性画分に存在する可能性を挙げている。ところで、現在臨床の場で行われつつある造血幹細胞移植では、CD34 分子の発現に注目して幹細胞の濃縮が行われているが、本研究が示すような CD34 陰性～弱陽性画分にヒト造血幹細胞が存在している可能性を考慮すれば、そのことには多少リスクがあるように感じる。ヒトについても CD34⁻分画に造血幹細胞が存在するか否かは、臨床医学的に極めて重要な問題であり、今後早急に研究を進める必要がある。

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。