

氏名(本籍)	たかのひな 高野 弥 奈 (茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第2073号		
学位授与年月日	平成16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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Asymmetric Division and Lineage Commitment at the Level of Hematopoietic Stem Cells : Inference from Differentiation in Daughter Cell and Granddaughter Cell Pairs (造血幹細胞における不均等分裂と系統分化：娘細胞対および孫細胞対の分化能からの推測)		
主査	筑波大学教授	医学博士	長澤 俊郎
副査	筑波大学教授	医学博士	高橋 智
副査	筑波大学講師	医学博士	今川 重彦
副査	筑波大学講師	博士(医学)	小野寺 雅史
副査	筑波大学講師	博士(医学)	福島 敬

論文の内容の要旨

(目的)

造血幹細胞の分化様式に関していくつかのモデルが提唱されている。偶然が支配する stochastic model と、外的因子が重要な役割を果たす instructive model がその代表である。これまで造血幹細胞を直接的に解析することが困難であったため、これらのモデルは検証されてこなかった。そこで本研究は高度に純化したマウス造血幹細胞を用いて造血幹細胞の分化様式を明らかとするとともに、外的因子の代表であるサイトカインの造血幹細胞の運命決定に及ぼす影響を調べることを目的とした。

(対象と方法)

C57BL/6(B6)-Ly5.1 マウスの骨髄より分化抗原陽性細胞を免疫ビーズ法によって除去した後、抗 CD34, c-Kit, Sca-1 抗体による染色を行い、フローサイトメータを用いて分化抗原陰性、CD34 陰性、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性細胞 (CD34⁻KSL 細胞) を分離した。分離した 1 個の CD34⁻KSL 細胞を B6-F1 (Ly5.1/Ly5.2) マウス由来の 2×10^5 個の骨髄細胞とともに致死量放射線照射した B6-Ly5.2 マウスに移植し長期骨髄再構築能を調べた。CD34⁻KSL 細胞の生着の有無はレシピエントマウス末梢血の免疫染色解析によって判定した。培養実験では 1 個の CD34⁻KSL 細胞を SCF, IL-3, TP0 を添加した無血清培地で培養し細胞分裂を誘導した。マイクロマニピュレーターを用いて娘細胞を分離した後、10% ウシ血清と SCF+IL-3+TP0+EP0 存在下に 14 日間培養してコロニー形成能を観察した。さらに、分離した娘細胞をもう一度分裂させて得た孫細胞を分離しそれぞれのコロニー形成能を解析した。すべてのコロニーに対してサイトスピン標本を用意し、May-Gruenwald-Giemsa 染色後にコロニー構成細胞中に neutrophil(n), macrophage(m), erythroblast(E), Megakaryocyte(M), blast-like(bl) を同定した。

(結果)

CD34⁻KSL 細胞 1 個を移植したマウスの 40% の例において末梢血中に CD34⁻KSL 細胞由来の顆粒球・

マクロファージ系, B および T リンパ球系細胞を同時に検出した。また, いずれかひとつの系統の細胞を 25% のマウスで検出した。培養実験では 90% 以上の CD34⁺KSL 細胞がコロニーを形成した。そのうち, 約 40% のコロニーは nmEM の 4 系統の細胞で構成されていた。次に CD34⁺KSL 細胞を異なるサイトカインの培養条件下で 1 回分裂させ娘細胞のコロニー形成能を調べたところ, 培養条件に関わらず親細胞が nmEM への分化能を持っていたと推定された場合, 娘細胞対の片方の娘細胞が 3 系統以下の分化能しか持たなかった「不均等分裂」が認められた。SCF 単独による細胞分裂では 52% が不均等分裂であり, SCF+IL-3 でも 62% が不均等分裂であった。しかし SCF+TP0 では不均等分裂は 17% と有意に低値を示した。また不均等分裂の中には nmEM と単系統もしくは 2 系統コロニーである M, m, nm, EM がそれぞれ対を成していたもの認められた。CD34⁺KSL 細胞を 2 回分裂させて生じた孫細胞について調べた結果, 不均等分裂は SCF+IL-3 では 58% であったが SCF+TP0 では 32% と有意に低下していた。

(考察)

移植実験では CD34⁺KSL 細胞中の 65% が多系統ないし単系統の再構築能を示し, 単細胞培養では CD34⁺KSL 細胞の 90% 以上がコロニーを形成したことから, 多くの再構築能を有する細胞はコロニー形成細胞として検出でき, 特に造血幹細胞は nmEM コロニー形成細胞として検出できる可能性があるため, nmEM コロニー形成能をもつ細胞を選択的に解析することにより造血幹細胞の分化様式を考察した。今回, 不均等分裂がおこる機序や誘導する因子は発見されていないが, 例えば, 娘細胞対間のエピジェネティックの違いや転写因子などの蛋白の不均等分布が原因している可能性がある。我々は以前, CD34⁺KSL 細胞を SCF+TP0 で培養すると片側ないし両側の娘細胞から自己複製能が消失することを報告した。従って培養後には多くの nmEM コロニー形成細胞からは自己複製能が失われている可能性が高いと推察している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

造血幹細胞の分化様式に関してのモデルには偶然が支配する stochastic model と, 外的因子が重要な役割を果たす instructive model が提唱されている。本研究では造血幹細胞の分化は不均等分裂を基本としていること, 造血幹細胞の分化様式はサイトカインの種類によって強く影響されることから, サイトカインには instructive な役割があることを示し, instructive model の存在を示唆する結果を示した。しかし, 不均等分裂がおこる機序や誘導する因子は発見されておらず, 今回の結果は使用されたサイトカインの範囲内に限定される結果ではあるが, 今後の造血幹細胞の分化研究の方向性を示す価値ある研究と評価した。

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。