

氏名(本籍)	いし がき た ろう (神奈川県) 石 垣 太 郎 (神奈川県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5182 号		
学位授与年月日	平成 21 年 7 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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ヒト血液細胞の長期培養系の開発		
主 査	筑波大学教授	博士 (医学)	大根田 修
副 査	筑波大学准教授	博士 (医学)	渋谷 和子
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	三好 浩稔
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	大越 靖

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

ヒト造血幹細胞は CD34 陽性細胞に含まれていると考えられ、*in vitro* での増幅が試みられてきたが、*in vitro* におけるヒト造血幹細胞の生存期間に関する報告は少ない。本研究では、造血再構築能を有する造血幹細胞が *in vitro* において長期間生存しうるのかを明らかにすることを目的に解析を行った。

(対象と方法)

臍帯血由来 CD34 陽性細胞を SCF、Flt-3L、TPO を用いて栄養細胞 (マウス由来 OP9 細胞、C3H10T1/2 細胞) と共培養を行った。培養を開始して 24 時間後に浮遊細胞とともに培養液を除去し、新しい培養液で置換した。その後、培地交換は一週間に 2 回行い、付着細胞の継代は 3~4 週間に 1 回行った。培地交換時に回収された浮遊細胞は、細胞数を測定するとともに、Flow cytometry による解析や、コロニー形成能解析を行った。また、長期培養後に得られた浮遊細胞を免疫不全マウスに移植し、*in vivo* での機能解析を行った。

(結果)

OP9 細胞および C3H10T1/2 細胞ともに、浮遊細胞が数ヶ月にわたって産生され続けることが分かった。浮遊細胞数は実験間で異なり、この結果は培養開始時の CD34 陽性細胞数とは相関しないことを示唆していた。

浮遊細胞の多くは形態的に、単球/マクロファージ系細胞であるが、一部、芽球様の細胞も含まれていた。多くの細胞は、顆粒球/マクロファージ系の表面抗原である CD33 を発現していた。また、培養 7 ヶ月後でも骨髓球系の幼若細胞である CD34 + CD33 + 細胞が浮遊細胞中に大量に観察された。コロニーアッセイでは、顆粒球、マクロファージ、赤血球前駆細胞が浮遊細胞に含まれていることが明らかとなり、培養後約 4 ヶ月たった時点でもコロニー形成細胞を豊富に含んでいることが分かった。また、長期間の培養により産生された浮遊細胞を用いて免疫不全マウス (NOD/Shi-scid IL-2R γ^{null} 以下 NOG マウス) への移植実験を行った。合計 25 匹の NOG マウスに対して浮遊細胞の移植を行い、4 ヶ月以上生存し骨髓解析を行ったマウスは、25 匹中 11 匹だった。このうち 2 匹の骨髓でヒト血液細胞由来リンパ球や骨髓球系細胞を確認した。

(考察)

初期 5 週間の最高産生細胞数と培養可能期間との間に強い正の相関を認めた。長期間培養可能な臍帯血は

免疫不全マウスへの移植でも良好な成績を示しており、造血能力の高い造血幹細胞 LT-HSC (long-term hematopoietic stem cell) を含んでいる可能性が示唆された。移植実験では、2匹の免疫不全マウス骨髄でヒトリンパ球系細胞やヒト骨髄球系細胞が確認されたが、巨核球や赤芽球は確認されなかった。移植された細胞について、さらに詳細な解析が必要である。

(結論)

本研究において用いた共培養法により、臍帯血由来の造血幹/前駆細胞を数ヶ月にわたって培養可能であることを示した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、長期間にわたり幹細胞と栄養細胞との共培養を行い、未分化細胞の維持について解析を行った。共培養開始後、初期5週間の最高産生細胞数と培養可能期間との間に強い正の相関が認めることから、本研究で用いた方法により、CD34細胞の質的検証を短期間に行うことが可能であることが強く示唆された点が高く評価できる。一方で、移植免疫不全マウスの骨髄において、myeloid系細胞、Bリンパ球は確認されたが、巨核球系細胞や赤芽球系細胞は認められなかったことから、移植された血液細胞の未分化性について、詳細に検討する必要があると思われる。

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。