

氏名 (本籍) まつ だ けん いち
松 田 賢 一

学位の種類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬 博 第 2 6 1 号

学位授与年月日 平 成 11 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目 Bリンパ系幹細胞株B31-1の自己複製・分化の制御
機構の解析

(主 査)
論文審査委員 教授 寺 崎 哲 也 教授 榎 本 武 美
教授 大 内 和 雄

論文内容要旨

造血幹細胞は、1つの細胞から全ての成熟血球細胞へ分化する能力を有すると同時に、自己複製能をあわせてもつ血球細胞である。この造血幹細胞が自己複製して自らのコピーを保存しながら、一部が自己複製をやめ多能性を失い、ある一つの血球系列へと自らの運命を決定し前駆細胞へと分化することで、一生にわたって個体の造血が枯渇することなしに維持されている。しかしながらこの造血幹細胞は骨髄中にならずかしか存在しないことから実験的解析を行うことは困難であり、造血幹細胞から各血球系列への分化(決定)メカニズムの解明を行うためには、造血幹細胞様の性質を保持している細胞株が必要であると思われる。一方、未分化血球細胞の増殖・分化の制御には、血球前駆細胞と造血組織の線維芽細胞、前脂肪細胞、内皮細胞などの間質細胞と共培養すると造血幹細胞の自己複製を含めて造血が長期維持されることから、間質細胞が構成する造血微小環境が重要な働きをしているものと考えられている。

そこで本研究第1章では、多数樹立した骨髄間質細胞株の中から、造血幹細胞支持能の指標のひとつである cobblestone area の形成を最も長期維持する細胞株として選択した、骨髄間質細胞株 TBR31-1 と純化した造血幹細胞 ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$) とを長期共培養して造血幹細胞株の樹立を試み、間質細胞依存的に cobblestone area 形成しながら増殖を続ける血球細胞株 B31-1 を得た。B31-1 は B リンパ系列特異的分化抗原の B 220 を発現しているので、B リンパ系の細胞株であることが明らかになったが、cobblestone area 形成能は造血幹細胞の指標の一つであることから、幹細胞に近い極めて未分化な B リンパ系細胞株であることが予想された。実際に、B31-1 は CD43, HSA あるいは sIgM といった、B リンパ球分化に伴って順に発現する分化段階特異的抗原を全く、もしくはほとんど発現しておらず、また、分化初期段階から起こる IgH 遺伝子の D-J 再構成がおきていない胚細胞型であることが明らかになり、B31-1 は非常に未分化な性状を保持した細胞であることが明らかになった。さらに、B31-1 には B220⁻ の細胞が存在し、この細胞は B220⁺ の細胞の前駆細胞であることが示された。この B220⁻ の細胞はこれまでに造血幹細胞から B リンパ系に分化が決定すると同時に発現するとされてきた B220 を発現していないことから、造血幹細胞から B リンパ系に分化決定する前後の未分化な段階で自己複製していることが明らかになった。一方、B31-1 は IL-7 の添加、別の間質細胞株 ST2 との共培養、あるいは、生体内への移植によって、分化段階特異的抗原の発現や IgH 遺伝子の D_H-J_H 再構築が誘導されることが分かり、B リンパ球初期分化過程を再現できる能力も合わせて持つことが明らかになった。このように、B31-1 は多能性は失われているものの、B220⁻ かつ Ig 遺伝子が再構成せずに胚細胞型という分化決定前の性状を保持したまま間質細胞依存的に自己複製し、分化誘導に伴って初期分化過程を再現するという、これまでの細胞株には見られなかった幹細胞としての性質を持つことから、本共培養系は解析が困難であった造血幹細胞を含めた未分化血球細胞の自己複製・分化の制御機構を解明する上で極めて有用であると考え、本研究では本共培養系を用いてこの制御機構の解明を試みた。

B31-1 は具体的に TBR31-1 が産生するどのような分子と相互作用することによって、幹細胞様の未分化な性状が維持されているのかどうか解明するために、第2章ではまず、B リンパ球造血に関与すること

が明らかになっているいくつかの因子の B31-1 の未分化的増殖に対する関与について検討を行った。その結果、TBR31-1 が産生する SCF と IL-7 のシグナルおよび VCAM-1/VLA-4 を介した TBR31-1 との細胞接着が B31-1 のような未分化な段階から維持・増殖に必須であり、IL-3 は IL-7 と協調的に働いて B31-1 の増殖を促進していることが明らかになった。しかし、これらの因子のみでは B リンパ球造血維持には十分でないことが明らかになっている。したがって、造血恒常性を維持するための、分化段階特異的かつ血球系列特異的な造血微小環境を構築する未知の分子機構が存在するものと考えられる。

そこで、第 3 章ではこの未知の分子機構のうち特に未分化な細胞に対して機能するものを同定するために、B31-1 の細胞表面分子に対するモノクローナル抗体を作成、B31-1 で強く脾臓の有核細胞では弱く反応するもので、FACS が可能であるものを選択基準としスクリーニングを行った。その結果、9 クローンが c-Kit を認識する抗体であり、そのうち 3 クローンは c-Kit の機能を部分的に阻害する活性を持つものであった。このような分子に対する抗体が複数選択されてくるということは、このスクリーニングは未分化血球細胞の自己複製・分化を制御する分子に対する抗体を得る系として十分であることを示しているものと考えられる。選択した抗体の一つ、6BA4-2 抗体は B リンパ系の細胞の Pro-B 段階以降の細胞の一部のみと反応することが明らかになった。もう一つの抗体 6FF8-1 はさまざまな骨髄細胞と反応するものの、確かに Lin⁻ のなかの造血幹細胞でも発現していることがわかり、また、この抗体は顆粒球系の細胞に対しては前駆細胞とは反応するが、成熟した細胞とは反応しないことが明らかになった。この二つの抗体は骨髄細胞の興味深いフラクションの細胞と反応することから、これらの抗体が認識する分子は未分化血球の自己複製・分化に何らかの機能を果たしている可能性が考えられた。そこで、いくつかの方法でこの抗体が認識する分子の同定し、その機能に迫ることを試みたが、抗体の性質故か、同定には至らなかった。

一方、B31-1 は TBR31-1 との共培養において B220⁻ から B220⁺ の細胞への分化 (決定) が spontaneous に起こる。この分化 (決定) がどのようにして行われるのかを明らかにするために、第 4 章ではこれら二つの細胞における B リンパ球分化の制御因子の発現の変動について検討を行った。まずはじめに mRNA レベルでの発現の変動を検討したところ、Ikaros, E47 といった転写因子に若干発現の変動が見られただけで、その他の因子に関しては調べた限り優位な差は見られなかった。このことから分化決定を含む極初期の分化過程においては制御因子が単に mRNA として発現するだけにとどまらず、機能的なタンパクとして働くことが重要であることが示唆された。実際に B220⁻ から B220⁺ へと分化が進むにつれて E2A, Oct-2, Pax-5 の機能的タンパクの結合能は増大し、その中でも Pax-5 は顕著に増加することが明らかになった。したがって分化に伴う転写因子の発現の調節は転写というよりむしろ翻訳の段階で行われているのか、あるいはこれらのタンパクと DNA との結合に対して未知の因子による制御が行われていて、それによってもたらされる機能的タンパクの結合能の増大がこの分化 (決定) の過程において重要な役割を担っているものと考えられる。また、B31-1 は Ig 遺伝子の再構成が全く起きていない胚細胞型であったことから、再構成に必要な酵素が発現していないのではないかと考えられるが、TdT, Rag-1, Rag-2 のすべてが発現していることが明らかにされた。IgH 遺伝子の再構成には酵素の発現だけでなく μ E の活性化に

伴うクロマチンのリモデリングが必須であるが、この μ E 活性化の指標のひとつである I μ が B31-1 において発現していたにも関わらず、Ig 遺伝子の再構成が起きていないことが明らかになった。したがって、I μ の発現に必要な μ E の活性化だけでは Ig が再構成するには不十分であると同時に、これを制御する未知の因子の存在が示唆された。

本研究では B リンパ系幹細胞株 B31-1 を造血幹細胞を含めた未分化血球細胞の自己複製・分化を解明する一つのモデルとして、その制御機構の解明を試み、いくつかの新たな知見を得るに至った。しかし、未だ不明な点がほとんどであり、その解明は始まったばかりであると思われる。今後、この機構が少しずつでも明らかにされていくことを期待する。

審査結果の要旨

未分化血球細胞の自己複製・分化の制御の具体的な分子機構は、これまでに有用な実験系が存在しないためほとんど明らかになっていない。一方、未分化血球細胞を造血組織の間質細胞と共培養すると長期にわたり造血が維持されることが知られている。そこで本研究は、未分化血球細胞を間質細胞とともに継代培養すれば、自己複製・分化を解明するのに有用な細胞株を得ることができるとの考えに基づき、骨髄間質細胞株 TBR31-1 と鈍化した造血幹細胞とを長期共培養して、新たな血球細胞株 B31-1 を得た。この B31-1 は、Ig 遺伝子が胚細胞型の非常に未分化な性状を保持した V リンパ系の細胞株であることが明らかになった。さらに、B31-1 には B リンパ系マーカーの B220 を発現していない細胞が存在し、この細胞は B220⁺ の細胞の前駆細胞であることが示された。したがって、B31-1 はこれまで解析が困難であった未分化血球細胞の自己複製・分化の制御機構を解明する上で極めて有用であると考え、以下の二つの方向からこの制御機構の解析を行った。

まず第一に、B31-1 の B220⁻ から B220⁺ の細胞への分化が転写因子レベルでどのように行われるのかを明らかにするために、B220⁻ と B220⁺ の二つの細胞における B リンパ系特異的転写因子の発現の変動について検討を行った。その結果、B220⁻ から B220⁺ へと分化すると転写因子の DNA への結合能が増大することが明らかになった。したがって、機能的タンパクの結合能の増大が分化の過程において重要な役割を担っていることが示された。

第二に、未分化血球細胞は間質細胞とどのように相互作用して自己複製・分化の制御をしているのかを明らかにするために、これまでに B リンパ球造血に関与することが明らかになっている間質細胞が産生する因子の B31-1 の増殖に対する関与について検討を行った。その結果、SCF と IL-7 のシグナルおよび VCAM-1/VLA-4 を介した細胞接着が B31-1 の増殖に必須であることが明らかになった。しかし、これらの因子のみでは B リンパ球造血維持には十分でないことが示されているので、さらに自己複製・分化を制御する未知の分子機構に迫るために、B31-1 の細胞表面分子に対するモノクローナル抗体を作成し、未分化な細胞に反応する抗体のスクリーニングを行った。その結果、選択された 6FF8-1 抗体は未分化な血球に反応し、その中の造血幹細胞でも発現していることが明らかになった。したがって、この抗体が認識する分子は未分化血球の自己複製・分化に何らかの機能を果たしている可能性が示唆された。

以上本研究は、B リンパ系幹細胞株を樹立し、その自己複製と分化の制御機構を解析し種々の新しい知見を得ることができた。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。