

氏名(本籍) 小^こ松^{まつ}真^ま理^り

学位の種類 医学博士

学位記番号 医第 1939 号

学位授与年月日 昭和 63 年 2 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最終学歴 昭和 53 年 3 月
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 正常ヒト骨髓多能性幹細胞の増殖・分化の研究

(主 査)

論文審査委員 教授 後藤 由夫 教授 林 典夫

教授 伊藤 恒敏

論文内容要旨

目 的

赤血球, 白血球等の血液細胞の母細胞である多能性幹細胞 pluripotent stem cell の研究は, 1978年 Fauser 及び Messner によって CFU-GEMM (granulocyte, erythroblast, macrophage and megakaryocyte colony forming unit) の培養がはじめて報告されて以来, 数多く発表されている。しかし, その実験方法は, 各研究者により種々様々であり, 統一されたものは未だ決まっていない。今回我々は, CFU-GEMM分析法において, plating efficiencyを高め, かつ培養条件を一定のものとし, 標準化することを試みた。

また, 多能性幹細胞の成熟, 分化において外部の環境や刺激因子が, どの様に調節しているかを明らかにするために実験を行なったので, その結果を報告する。

方 法

健康人10人の骨髓細胞を用い, Fauser 及び Messner の方法に準じ, CFU-GEMM assayを行なった。骨髓血より, Ficoll-Hypaque gradient を用い単核細胞層を集め, 20%ウシ胎児血清: FCSを含んだ RPMI 1640 溶液で洗った後, adherent cell を除去し, non adherent cell 浮遊液を作成した。また conditioned medium は PHA-LCM の代りに PHA-bone marrow conditioned medium: PHA-BMCM を用いた。骨髓 non adherent cell 2×10^5 個/ml をエリスロポエチン 2 U/plate, 10% PHA-BMCM, 20% FCS, 3% 軟寒天を含んだ RPMI 1640 溶液で溶解し, 培養皿に 1 ml ずつ入れ 5% CO₂, 湿度 100%, 37°C で培養した。また, この培養法その他, 300 µg/ml purified human transferrin 及び 0.8×10^{-7} M FeCl₃ 添加, 更に 20% ヒト新鮮自己血漿を添加する実験系を用い, コロニー形成能について検討を加えた。コロニーは培養 7, 10, 14 日目にカウントした後, すべてを先の細いパスツール・ピペットで取り出し, May-Giemsa 染色を行ない, 形態学的分析を行なった。erythroid colony と同定されたコロニーは, すべて erythroid cell から構成されているものを CFU-E (8~64 cells/colony) と BFU-E (> 64 cells/colony または 8 個以上の細胞から成る subcolony が 3 個以上のもの) に分け, mixed erythroid colony を CFU-GEMM (erythroid cell 8~64 cells/colony) と BFU-GEMM (> 64 cells/colony または多数の erythroid subcolony から成るもの) に分類した。

次にヒト骨髓 non adherent cell を 10% PHA-BMCM, 20% FCS, 20% 新鮮自己血漿と共に培養開始後 3 日目, 5 日目, 7 日目と種々の時期にエリスロポエチン 2 U/plate を各培養皿

に加え、コロニー形成能を調べた。

結 果

各種培養条件下でのCFU-GEMM assayにおけるコロニー数およびコロニータイプをみると、FCSとエリスロポエチンのみで培養を行なうと、macrophage colony, granulocyte-macrophage colonyの割合が高く、erythroid colonyの形成は低かったがPHA-BMCM添加、トランスフェリンと鉄添加と順次erythroid colonyの割合増加を認め、新鮮自己血漿を添加するとplating efficiencyがFCSとエリスロポエチンのみで培養した場合の3～4倍に増加した。コロニーの種類では、主に、erythroid colonyが増加した。従ってerythroid colonyの観察、多能性幹細胞の研究には、新鮮自己血漿を用いた方法が質的、量的に最も適していると思われた。

エリスロポエチン遅延添加実験では、培養開始時と3日目にエリスロポエチンを添加した場合はBFU-GEMMの形成に著変は認められなかったが、5日目以降にエリスロポエチンを添加するとBFU-GEMMの形成は急激に低下した。しかしCFU-GEMMの形成はエリスロポエチンを遅延添加しても変化をみなかった。granulocyte-macrophage colony, macrophage colonyの形成はエリスロポエチンの遅延添加により減少しなかった。またコロニー数については、培養5日目以降にエリスロポエチンを添加すると、最初からエリスロポエチンを加えた場合の50～70%であった。

考 案

エリスロポエチンにPHA-BMCMを加えると、加えない場合よりerythropoiesisが促進され、更に新鮮自己血漿を用いると、著明なburstの増加によるplating efficiencyの増加を認めたとより、血清、PHA-BMCM中には造血、中でもerythropoiesisを支持する因子が多く含まれていることが推測された。従ってエリスロポエチン遅延添加実験では、PHA-BMCMに新鮮自己血漿を加える方法を用いた。

遅延添加実験では、5日目以降にエリスロポエチンを添加するとmixed colony(中でもBFU-GEMM)の形成が急激に減少したことより、pluripotent stem cellに近い段階にmulti colony stimulating-factor, エリスロポエチン等が作用し、BFU-GEMM形成を促進するが、5日目以降の分化したstem cellに対しては、もはやBFU-GEMM形成は促進しえないものと考えられた。

審査結果の要旨

この研究は多能性幹細胞の研究に用いられるCFU-GEMM (granulocyte, erythroblast, macrophage and megakaryocyte colony forming unit) の培養の plating efficiency を高め、かつ培養条件を標準化することを試み、また、多能性幹細胞の成熟・分化において外部の環境や刺激因子がどの様に調節しているかを明らかにするために行ったものである。

方法は Fauser 及び Messner の方法に準じ、健康人10人の骨髓細胞を用い、CFU-GEMM assay を行った。conditioned medium は PHA-LCM の代わりに PHA-bone marrow conditioned medium (PHA-BMCM) を用いた。また 300 $\mu\text{g/ml}$ purified human transferrin 及び $0.8 \times 10^{-7}\text{M}$ FeCl_3 添加、更に20%ヒト新鮮自己血漿を添加する実験系を用い、コロニー形成能について検討を加えた。コロニーは培養 7, 10, 14日目にカウントし、すべてを先の細かいパスツールピペットで取り出し、形態学的分析を行った。次に Erythropoietin (EPO) のみを培養 3, 5, 7日目に添加した場合のコロニー形成能についても調べ、次の成績を得ている。

各種培養条件下でのCFU-GEMM assay におけるコロニー数及びコロニータイプをみると、FCSとEPOのみで培養すると、macrophage colony, Granulocyte-Macrophage colony の割合が高く、PHA-BMCM添加、transferrin と FeCl_3 添加と順次 erythroid colony の割合増加を認め、新鮮自己血漿を添加すると plating efficiency が3~4倍増加し、主に erythroid colony が増加した。EPO 遅延添加実験では、数、構成細胞のタイプとも、ほぼ同様であったが、5日目以降にEPOを添加すると、BFU-GEMM (granulocyte, erythroblast macrophage and megakaryocyte burst forming unit) の形成は急激に低下した。EPOにPHA-BMCMを加えると、加えない場合より erythrocytosisが促進され、更に新鮮自己血漿を用いると著明な burst の増加による plating efficiency の増加を認めたことより、著者は血清、PHA-BMCM中に造血、中でも erythropoiesis を支持する因子が多く含まれていることを推測し、EPO遅延添加実験では、PHA-BMCMに新鮮自己血漿を加える方法を用いている。遅延添加実験では、5日目以降にEPOを添加するとmixed colony (中でもBFU-GEMM) の形成が急激に減少したことより、著者は pluripotent stem cell に近い段階に multi colony stimulating factor, EPO等が作用しBFU-GEMM形成を促進するが5日目以降の分化した stem cell に対しては、もはやBFU-GEMM形成は促進しえないものとしている。

この研究は、幹細胞の研究方法に重要な知見を加えたものであり、学位授与に値する。