

| | | | | |
|---------|-------------------------------|---------|----------|---------|
| 氏 名（本籍） | おく 奥 | やま 山 | りゅう 隆 | へい 平 |
| 学位の種類 | 博 士（医 学） | | | |
| 学位記番号 | 医 博 第 1 2 3 9 号 | | | |
| 学位授与年月日 | 平 成 7 年 3 月 24 日 | | | |
| 学位授与の条件 | 学位規則第4条第1項該当 | | | |
| 研究科専攻 | 東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻 | | | |
| 学位論文題目 | 間質細胞を用いた造血幹細胞の分化増殖の解析 | | | |

（主 査）

| | | |
|--------|------------|------------|
| 論文審査委員 | 教授 田 上 八 朗 | 教授 伊 藤 恒 敏 |
| | 教授 林 典 夫 | |

論 文 内 容 要 旨

造血幹細胞に対して、造血微小環境を構成する間質細胞が重要な役割を担っているものと考えられている。そこで Dexter 培養のような血球細胞と骨髄間質細胞との共培養が行われてきたが、骨髄細胞中の幹細胞の割合は非常に低く、また間質細胞も様々な細胞からなるため造血幹細胞の性質を調べる上で問題があった。そこで骨髄より樹立した間質細胞株に、cell sorter を用いて純化した幹細胞を加えて共培養し、幹細胞の自己再生と分化を調べた。幹細胞の純化は最初に成熟血球細胞を磁気ビーズで除き、次に c-Kit, Scal を反応させて両者に陽性の細胞 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ を回収した。間質細胞に関しては性状を保持したまま多数の骨髄間質細胞株を得るため、SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入マウスを用いて細胞株を樹立した。この中から骨髄細胞と共培養した際に最も長い期間血球産生を継続させる細胞株 TBR59 を用いた。骨髄間質細胞株 TBR59 に $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞を加え培養したところ、未分化な血球細胞の指標となる HPP-CFC の変化から造血幹細胞は 1 週間維持されていることが判った。また $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞は TBR59 にもぐり込んでコロニー Cobblestone Area を形成した。その数は 7 日に最大となり以後減少したが、13 日にもう一つピークが出現した。最初のピークの Cobblestone Area からは主として顆粒球が生じ、2 番目のピークからはリンパ球が生じてきたので、Cobblestone Area は 2 種類あるものと考えられた。これは $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞が c-Kit の発現の強さによってその性質が異なるためと考え、c-Kit^{high} と c-Kit^{low} にわけて培養したところ、Cobblestone Area の最初のピークは c-Kit^{high}、また 2 番目のピークは c-Kit^{low} によって形成された。さらに c-Kit^{high} からは主として顆粒球が分化し、c-Kit^{low} からは主としてリンパ球が分化してくることから、 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞は c-Kit の発現の強さによって分化の方向に偏りがあると考えられた。また単クローン抗体を使って $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞が TBR59 の間にもぐり込んで増殖する過程に関与する分子を調べた。その結果 c-Kit/SCF は両方のピークに関与し Meloid, Lymphoid 両系の分化に関わっていたが、VLA 4/VCAM 1 は 2 番目のピークに関与し主として Lymphoid 系の分化に関与すると考えられた。以上のことより $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞のうち c-Kit^{high} となった幹細胞は間質細胞上で Myeloid Stem Cell に、また c-Kit^{low} となった幹細胞は間質細胞上で Lymphoid Stem Cell に分化していくと考えられた。また長期間造血を支持する間質細胞は造血幹細胞を維持する能力と Myeloid Stem Cell と Lymphoid Stem Cell への分化決定の時期に作用する能力を持つものと思われた。

審査結果の要旨

これまで造血幹細胞の性質を調べるのは困難であった。本論文は骨髄より樹立した間質細胞株に、純化した幹細胞を加えて共培養し、幹細胞の自己再生と分化を調べたものである。奥山隆平は骨髄より樹立した間質細胞株に、cell sorter を用いて純化した幹細胞を加えて共培養し、幹細胞の自己再生と分化を調べた。幹細胞の純化には、まず成熟血球細胞を磁気ビーズで除き、次に c-Kit, Scal を反応させて両者に陽性の細胞 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ を回収した。一方、間質細胞は、SV40 ラージ T 抗原遺伝子導入マウスを用いて細胞株を樹立し、その中から骨髄細胞と共培養した際に最も長い期間血球産生を継続させる細胞株 TBR59 を用いた。まず、骨髄間質細胞株 TBR59 に $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞を加え培養し、造血幹細胞が 1 週間維持されていることを確かめた。また、 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞が TBR59 にもぐり込んでコロニー cobblestone area を形成することを観察した。その数は 7 日に最大となり以後減少したが、13 日にもう一つピークが出現することを認めた。最初のピークの cobblestone area からは主として顆粒球が生じ、2 番目のピークからはリンパ球が生じてきたことより、cobblestone area は 2 種類あり、 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞が c-Kit の発現の強さによってその性質が異なると考え、 $\text{c-Kit}^{\text{high}}$ と $\text{c-Kit}^{\text{low}}$ にわけて培養した。その結果、最初のピークは $\text{c-Kit}^{\text{high}}$ 、また 2 番目のピークは $\text{c-Kit}^{\text{low}}$ によって形成されることを確かめた。さらに $\text{c-Kit}^{\text{high}}$ からは顆粒球が分化し、 $\text{c-Kit}^{\text{low}}$ からはリンパ球が分化してくることから、 $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞は c-Kit の発現の強さによって分化の方向に偏りがあると考えた。彼はまた単クローン抗体を使って $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞が TBR59 の間にもぐり込んで増殖する過程に関与する分子を調べ、c-Kit/SCF は両方のピークに関与し Myeloid, Lymphoid 両系の分化に関わっていたが、VLA 4/VCAM 1 が 2 番目のピークに関与し主として Lymphoid 系の分化に関与することを示す結果をえた。以上のことより $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Scal}^+$ 細胞のうち $\text{c-Kit}^{\text{high}}$ となった幹細胞は間質細胞上で Myeloid Stem Cell に、また $\text{c-Kit}^{\text{low}}$ となった幹細胞は間質細胞上で Lymphoid Stem Cell に分化していくと結論した。

この長期間造血を支持する間質細胞が造血幹細胞を維持する能力と Myeloid Stem Cell と Lymphoid Stem Cell への分化決定の時期に作用する能力を持つことを示唆する試験管内での研究の意義は大きく、学位に十分値するものである。