

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

**論文題目** Stimulation of Mouse and Human Primitive Hematopoiesis by Murine Embryonic Aorta-Gonad-Mesonephros-Derived Stromal Cell Lines

**和訳** マウス胎仔大動脈一性腺一中腎領域由来ストローマ細胞株によるマウスおよびヒトの未分化な造血に対する作用の解析

**指導教官** 辻 浩一郎

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月1日入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 許明江

中胚葉から発生する脊椎動物の造血機構は、最初に卵黄嚢、あるいはこれに相当する臓器に出現する一次造血と、これに引き続いて胚体内に発生する二次造血に分けられるが、鳥類や両生類では、その後の一生にわたる造血を担う二次造血は胚体内に起源を有することが示されている。一方哺乳類においては、マウスの実験から、卵黄嚢に発生した二次造血が、胎仔肝、次いで骨髄へと造血の場を移動すると考えられてきた。しかし最近になって、マウスにおいても、鳥類や両生類と同様に、二次造血は胚体内 aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域に発生する可能性が報告された。特に、長期造血再構築能を有する造血幹細胞 (LTR-HSC: long-term repopulating hematopoietic stem cell) は、胎生 10 日の AGM 領域に初めて認められ、胎生 11 日にかけて著明な増幅をした後、造血の場を胎仔肝に移動することが示された。このことより、胎生 10~11 日の AGM 領域には、造血幹細胞の発達を支持する環境が形成されていると推測されるが、その詳細なメカニズムについては全く解っていない。本研究においては、AGM 領域における造血支持機構を明らかにするために、胎生 10.5 日の AGM 領域からストローマ細胞株を樹立し、その造血能を検討した。

## (方法)

### 1. ストローマ細胞株の樹立

胎生 10.5 日のマウス胎仔(C3H/HeN)より AGM 領域組織を分離し、約 0.3mm に細切した組織片を 24 穴プレート底に付置した。これに 1 滴の 10%牛胎仔血清を含む  $\alpha$  メディウムを重層した後、37°C 5 %CO<sub>2</sub> の条件下で 1 晩培養し、翌日 1 ml の培養液を添加した。培養 1 週間後には、組織片の周辺に付着細胞が出現した。組織片を取り除いて、更に 1 週間培養し、付着細胞 0.53mmol EDTA を含む 0.05%トリプシンにて処理した後、採取した。採取された付着細胞は 6 穴プレートで 2 週間培養された後、900rad の放射線照射を受け、更に培養は継続された。2 週間後、付着細胞はトリプシン処理にて採取された。採取された細胞は 50~100 個づつに分けて 24 穴プレートで再び培養され、個々の穴の中で増殖した細胞群を用いて、限界希釈法によりクローニングされた。

### 2. ストローマ細胞の性状の検討

樹立された細胞株は、フローサイトメトリーにより、CD34、Sca-1、c-Kit、CD3、CD4、CD8、B220、Mac-1、Gr-1、TR119、VCAM-1、PECAM-1、Eセレクトイン、Pセレクトイン、CD13 の発現が検討された。また、RT-PCR にて、IL-3、IL-6、オンコスタチン M (OSM: oncostatin M)、LIF、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、SCF、Flk2 リガンド、TPO、IL-11 等のサイトカイン mRNA の発現が検討された。また、比較対象として、成体マウス骨髄細胞由来ストローマ細胞株、MS-5 が用いられた。

### 3. ストローマ細胞の造血支持能の検討

#### ①マウス造血細胞に対する作用の検討

マウス骨髄細胞(C57BL/6)、あるいはマウス骨髄細胞から蛍光活性化細胞分離装置にてソーティングされた血球特異的マーカー陰性(Lin<sup>-</sup>)c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>細胞、または Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞を樹立されたストローマ細胞上で培養し、コブルストーン・コロニーの形成を観察した。また、培養細胞中に含まれる造血前駆細胞を測定するために、メチルセルロースクローナル培養を、マウス(m)SCF 100ng/ml、mIL-3 20ng/ml、ヒト(h)IL-6 100ng/ml、hEPO 2U/ml、hG-CSF 10ng/ml、hTPO 4ng/ml 存在下で行った。形成されたコロニーの種類と数は、培養 7~8 日めに判定された。また、培養細胞中に含まれる脾コロニー形成細胞(CFU-S: spleen colony-forming unit)を測定するために、920rad の放射線照射を受けた C57BL/6 マウスに尾静脈から注射し、8 日と 12 日にレシピエントの脾臓に形成されるコロニーを観察した。さらに、LTR-HSC を測定するために、培養細胞を Ly-5.1 コンジェニックマウスに移植し、移植後 10 週の末梢血中の Ly-5.2 発現ドナー細胞の存在をフローサイトメトリーで検討した。

#### ②ヒト造血細胞に対する作用の検討

ヒト臍帯血、あるいは臍帯血より分離された CD34<sup>+</sup>細胞、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞、

CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞を、ストローマ細胞上で共培養した後、培養細胞中に含まれる造血前駆細胞を測定するために、メチルセルロースクローナル培養を、hSCF 100ng/ml、hIL-3 20ng/ml、IL-6 100ng/ml、hEPO 2U/ml、hG-CSF 10ng/ml、hTPO 4ng/ml 存在下で行った。形成されたコロニーの種類と数は、培養 12~16 日に判定した。また、LTR-HSC を測定するために、培養細胞を 300rad の放射線照射を受けた免疫不全 NOD/SCID マウスに移植し、移植後 5 週の骨髄中のヒト CD45<sup>+</sup>血液細胞の存在をフローサイトメトリーで検討した。

## (結果と考察)

### 1. ストローマ細胞の性状

樹立された 17 の細胞株のうち、14 の細胞株は線維芽細胞様の形態を呈していた。残りの 3 細胞株はいずれも形態的には比較的大型の扁平細胞で、AGM-S1、S2、S3 と名付けられた。フローサイトメトリーでは、AGM-S3 細胞は VCAM-1、CD13、CD34、Sca-1 を発現しており、内皮細胞に近い性状を有するものと推測された。RT-PCR では、AGM-S3 細胞は、SCF、IL-6、OSM を発現していた。

### 2. ストローマ細胞の造血支持能

#### ①マウス造血細胞に対する作用の検討

1 x 10<sup>5</sup> 個のマウス骨髄細胞を、AGM-S1、S2、S3 細胞上で共培養したところ、いずれのストローマ細胞上でもコブルストーン・コロニーが形成されたが、AGM-S1、S3 細胞では、AGM-S2 細胞と比較して約 2 倍のコロニーが形成された。また、骨髄細胞中の造血前駆細胞は、いずれのストローマ細胞株との共培養によっても増加したが、その増加率は、AGM-S1、S3 細胞では AGM-S2 細胞の約 5~7 倍に達した。また、AGM-S1、S3 細胞との共培養では day8CFU-S、day12CFU-S いずれも増加した。以上の結果より、樹立された AGM-S1、S2、S3 細胞はいずれも造血支持能を有していたが、その作用は AGM-S1、S3 細胞で強く、特に AGM-S3 細胞は安定して維持可能であったため、多くの実験において AGM-S3 細胞が用いられた。

AGM-S3 細胞の造血支持作用の標的細胞を明らかにするために、マウス骨髄細胞から Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>細胞と未分化な Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞を分画し、各々 100 個の細胞を 10 日間 AGM-S3 細胞と共培養した。後者の培養中には造血前駆細胞は認められなかったが、前者の培養においては、種々の造血前駆細胞、CFU-S が著明に増幅していた。また、Ly-5.2 マウス骨髄から分離した 1000 個の Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞を AGM-S3 細胞上で 7 日間培養した後、Ly-5.1 マウスに移植したところ、10 週後のレシピエントの末梢血中に、ドナー・タイプの B220<sup>+</sup>B 細胞、Thy-1<sup>+</sup>T 細胞、Mac-1/Gr-1<sup>+</sup>骨髄系細胞が認められた。この結果より、AGM-S3 細胞は未分化な造血前駆細胞/幹細胞に作用し、その増殖を支持すると考えられた。

## ②ヒト造血細胞に対する作用の検討

500 個のヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞を、AGM-S1、S2、S3 細胞、あるいは MS-5 細胞上で3週間共培養し、培養細胞中の造血前駆細胞を検討したところ、いずれのストローマ細胞もその増幅を支持したが、その作用はやはり AGM-S1、S3 細胞で強かった。6週間の共培養での培養中の造血前駆細胞数は、AGM-S1、S3 細胞では、AGM-S2 細胞、MS-5 細胞の約5倍に達した。興味深いことに、後者の培養中には骨髓系前駆細胞のみが認められたが、前者の培養中には、骨髓系前駆細胞ばかりでなく、赤芽球系前駆細胞や多能性前駆細胞が多数存在した。

AGM-S3 細胞のヒト造血支持作用の標的細胞を明らかにするために、ヒト臍帯血細胞から CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞と未分化な CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞を分画し、各々 500 個の細胞を AGM-S3 細胞上で6週間共培養した。前者と比較して、後者の培養中にはより多数の造血前駆細胞が存在し、それらには赤芽球系前駆細胞や多能性前駆細胞も含まれていた。このことより、AGM-S3 細胞はヒトの未分化な造血前駆細胞にも作用すると考えられた。

そこで、AGM-S3 細胞のヒト造血幹細胞に対する作用を明らかにするために、 $1 \times 10^6$  個の臍帯血単核球を AGM-S3 細胞上で3週間共培養した後、NOD/SCID マウスに移植したところ、5週間後のレシピエントの骨髓中にはヒト CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>B 細胞、CD45<sup>+</sup>CD13/CD14<sup>+</sup>骨髓系細胞、CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>未分化細胞が存在した。この結果より、AGM-S3 細胞はヒト造血幹細胞にも作用することが明らかとなった。

RT-PCR の結果より、AGM-S3 細胞は SCF、IL-6、OSM を発現していたが、これらのサイトカインの組合せだけでは、AGM-S3 細胞の造血支持能を再現することはできない。従って、AGM-S3 細胞には検討されたサイトカイン以外の造血支持作用を有する分子(群)が発現されていると推測された。そこで、こうした分子の性状を明らかにするために、臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞を AGM-S3 細胞上に挿入されたトランスウェル上で2~4週間培養したところ、AGM-S3 細胞上で培養した場合と比較して、産生された造血前駆細胞は明らかに少なく、骨髓系前駆細胞のみで、赤芽球系前駆細胞、多能性前駆細胞は産生されなかった。この結果より、AGM-S3 細胞上には、未分化な造血細胞に作用する膜結合型分子が発現されており、この分子はヒト造血細胞とも交差反応性を有すると考えられた。

### (まとめ)

胎生 10,5 日の胎仔マウスの AGM 領域から樹立されたストローマ細胞株、AGM-S3 は、内皮細胞様の性状を有し、マウスばかりでなく、ヒトの未分化な造血細胞に対する作用を有していた。この造血支持作用は、AGM-S3 細胞上の未知の膜結合型分子(群)により担われていると考えられた。