

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 許明江

本研究では、胎仔マウスの aorta-gonad-mesonephros (AGM)領域における二次造血の発生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、その造血能の検討を行い、以下の結果を得ている。

### 1. ストローマ細胞株の樹立とその性状

17 のストローマ細胞株が胎生 10.5 日の AGM 領域から樹立された。そのうち、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。これらの細胞株はいずれもマウスおよびヒトの造血を支持したが、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。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ことが示された。

### 2. AGM-S3 細胞の造血支持能

#### 1) マウス造血細胞に対する作用

AGM-S3 細胞のマウス造血支持作用の標的細胞を明らかにするために、マウス骨髄細胞を lineage markers (Lin)<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>細胞とより未分化な Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞に分画し、AGM-S3 細胞と共培養したところ、後者の培養においてのみ造血前駆細胞、脾コロニー形成細胞の増加が認められた。さらに、Ly-5.2 マウス Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞を 7 日間 AGM-S3 細胞と共培養した後、Ly-5.1 マウスに移植したところ、10 週後のレシピエントにドナータイプの造血が再構築された。これらることより、AGM-S3 細胞はマウスの未分化な造血前駆細胞/幹細胞に作用することが示された。

## 2) ヒト造血細胞に対する作用

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、ヒト臍帯血から CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞とより未分化な CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞を分画し、AGM-S3 細胞と共培養したところ、前者と比較して、後者からは多数の造血前駆細胞が産生され、それらには赤芽球系前駆細胞や多能性造血前駆細胞も含まれていた。さらに、臍帯血単核球を AGM-S3 細胞上で3週間共培養した後、免疫不全 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髄にはヒト造血が再構築されていた。これらの結果より、AGM-S3 細胞はヒトの未分化な造血前駆細胞/幹細胞に作用することが示された。

## 3. AGM-S3 細胞に発現されている造血支持分子の性状の検討

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)では、AGM-S3 細胞は、stem cell factor、IL-6、oncostatin M 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、その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。

以上、本論文は胎生 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、マウスおよびヒトの未分化な造血前駆細胞/幹細胞に対する作用を有していることが明らかとなった。本研究により得られた成果は、胎仔マウスの AGM-S3 細胞における二次造血の発生機構の理解に大きく貢献するものであり、また、将来的にはヒト移植造血幹細胞の増幅に応用可能と考えられる。従って、学位の授与に値するものと考えられる。