

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成10年度博士課程 進学

氏名 峯畑 健一

指導教官 今川 和彦

論文題目

Regulation of hematopoietic development by cytokines

サイトカインによる造血発生の制御

<序文>

個体の発生のなかで、造血細胞は欠かすことのできない存在であり、その発生、分化は他の多くの細胞分化に先駆けて解明されてきた。これらの造血細胞は、胎仔期の大動脈-精巣-中腎領域 (aorta-gonad-mesonephros region/ AGM region) から発生し、胎仔肝で増殖、後に脾臓および骨髄に造血の場が移行することが知られています。この造血発生および、造血組織での血液細胞の増殖、分化は、様々な因子によって制御されていることが多くの研究者によって明らかにされている。今論文では、AGM 領域を用いた初代培養と、その初代培養に必須の因子であるオンコスタチン M の遺伝子欠損マウスを用いることにより、それぞれの因子の造血に関する役割を解析した。

<M-CSF の AGM 培養での造血における役割>

機能的な M-CSF の産生を欠いた変異マウスである OP/OP マウスを用いて AGM

分散培養を行った。OP/OP マウスの AGM 分散培養において血球細胞は未分化な状態に維持されており、wild type のマウスに比べて CFU-Mix コロニーが増加していることが観察された。さらに、造血に関与するサイトカインの産生について、OP/OP マウスの AGM 分散培養系の付着細胞を用いて解析を行ったところ、IL-6, LIF, OSM, G-CSF の産生が下がっていることを確認した。この OP/OPAGM 培養系に M-CSF の添加を添加すると、産生される血球細胞の分化は wild type と同程度に促進される。このことは、血球分化に必要なサイトカインが M-CSF によって誘導されないためにサイトカインが作用できず、血球の分化の阻害が起こったのではないかと考えられた。

血球分化に必要なサイトカインの産生低下以外に、ヘマンジオブラストからの血球／血管分化という観点にたって考えると、この培養系において血管内皮細胞への分化に影響が観察することができる可能性が考えられた。このヘマンジオブラストから血管内皮細胞分化を検討するため、血管内皮細胞のマーカである Flk-1, VE-cad, ICAM-2 の発現を OP/OP マウスの AGM 培養系の付着細胞について解析した。その結果、Flk-1, VE-cad や他の血管内皮細胞のマーカ発現が低下している一方で、血管内皮の正常な分化に必要と考えられる VEGF の受容体のひとつである Flt-1 の発現や血管内皮に特有に起こるアセチル化 LDL の取り込みに関しては変化がなかった。このことから OP/OP マウスにおいて血管内皮様のクラスターの形成は認められたが、その分化が部分的に阻害されていると考えられた。実際に野生型の AGM 培養系に可溶性の Flt-1 を強制発現させた場合、産生されてくる血球細胞が、より未分化な状態に維持されていることが観察された。これはヘマンジオブラストからの血球／血管分化に VEGF の作用が影響していることを示唆するものであると考えられる。実際に、VEGF をこの培養系に添加すると、可溶性 Flt-1 を強発現したときとは逆に、未分化な血球によるコロニー形成の低下が見られた。また、AGM 分散培養系の血管内皮細胞のクラスターに多く発現している podocalyxin-like protein-1 (PCLP-1)を

発現している細胞とストローマ細胞である OP9 細胞との共培養させることにより、M-CSF の存在下、非存在下において、血管内皮細胞の分化を検討したところ、M-CSF は、血管の成熟に促進的に働くことがしめされた。さらに細胞染色および RT-PCR の解析により、このヘマンジオブラストを含むと考えられる PCLP-1 陽性の細胞集団は、M-CSF の受容体である c-fms を発現していることを明らかとした。これらの事実から、野生型の AGM 分散培養系において、M-CSF が直接的にヘマンジオブラストに作用し、VEGF と Flk-1 の相互作用を増強させ、血管内皮の分化が進行していくというモデルを考案することができた。

<オンコスタチン M(OSM)遺伝子欠損マウスを用いた造血に関する OSM の機能>

上記のように、AGM 領域での造血過程の一面を再現することができる培養系で必須である OSM の遺伝子欠損マウス解析した。

このマウスは生後も生存しており、外見上異常な点は発見できなかった。しかしながら、このマウスの末梢血を解析したところ、赤血球数および血小板数の減少が見られ、他の IL-6 サイトカインファミリーには見られない異常であった。さらに、骨髄中の赤血球の前駆細胞である CFU-E の減少、および血小板の前駆細胞である巨核球の減少も認められた。これとは反対に、脾臓における造血は未分化な段階から促進されており、髄外造血がこのマウスにおいて亢進していることが示唆された。造血細胞は、造血組織中に存在する造血支持細胞と相互作用することによって、その増殖や分化が制御されていることが知られている。OSM が直接造血細胞に作用しているわけ打破ないことがわかったため、この遺伝子欠損マウスにおいてみられる赤血球系の異常は、このストローマ細胞を介している可能性がある。事実、OSM 遺伝子欠損マウスの骨髄における CFU-F(造血支持細胞の個数をはかる指標)が増加していること、また、脂肪蓄積を行う条件で培養した場合に、野生型よりも脂肪蓄積しやすいことなどから、骨髄中の

造血支持細胞の細胞集団やその性質が変化していることが示唆された。

また、OSM の受容体である OSMR β が巨核球細胞上に発現していることから、血小板産生には OSM は直接関与していると考えられる。

このように OSM は胎仔期の造血発生においては、培養系で見られるような重要な役割が相補されてしまうと考えられるが、成体での正常な造血を行うために、特に血小板や赤血球の産生において重要な役割があり、造血支持細胞を介してその役割を果たしていると考えられる。