

審査の結果の要旨

氏名 杉山 大介

本研究は哺乳類胎生期において、血管内皮細胞と血液細胞の関係を明らかにするために、全胚胎仔培養を用いて、赤血球系造血に注目し解析を試みたもので下記の結果を得ている。

1. 血管内皮細胞とマクロファージに特異的に取り込まれる Ac-LDL-DiI を 10.0 日目マウス胎仔へ注射し、全胚胎仔培養装置で培養した。子宮内手術を行って、同じ母胎より注射後培養した胎仔と、注射しないで培養もしないものを比較した。注射し培養した胎仔の体節数は 31.5 ± 0.6 (n=4)、注射せず子宮内で発生した胎仔の体節数は 31.8 ± 1.5 (n=4) であり、顕著な違いは認められなかった。よって、注射した胎仔が正常発生に準ずることが示唆された。
2. 注射した胎仔のうち約 50%が正常発生に準ずるものと判断し、解析を行った。培養 1 時間後、DiI の蛍光は、卵黄囊を含んだ胎仔全身の血管の走行に沿って観察された。これらの胎仔を薄切し、検鏡したところ、DiI の蛍光は一層の血管内皮に沿って観察された。これは、全身の血管内皮で認められた。マクロファージも Ac-LDL-DiI を取り込むことがわかっているため、さらに、フローサイトメトリー解析を行った。卵黄囊、AGM 領域、残りの体部をバラバラにし、それぞれ解析したところ、TOPRO-1 を取り込む死細胞と Mac-1 陽性細胞を除いた後、DiI 陽性細胞は CD31 陽性、CD34 陽性、CD45 陰性だった。よって、大部分の DiI 陽性細胞は血管内皮由来と考えられた。
3. Ac-LDL-DiI を取り込む血管内皮細胞から血流中へ細胞が放出されるかどうかを検討するため、注射した胎仔を 12 時間全胚胎仔培養後、血液サンプルを採取し、フローサイトメトリー解析を行った。血液細胞中、 $1.4 \pm 0.4\%$ (n=5) が DiI 陽性細胞だった。この DiI 陽性細胞は、全胚胎仔培養 6 時間後から検出され、その後徐々に増加し、12 時間後にピークを迎えた。この血流中に存在する DiI 陽性細胞がどのような細胞か検討するため、DiI 陽性細胞をセルソーターで採取し、検鏡した。22 から 24 体節期に注射した胎仔より採取した DiI 陽性細胞は、その 43%が赤血球系細胞であり、そ

の成熟段階は様々だった。また、マクロファージや骨髄球系細胞も同時に検出された。29 体節期を過ぎると、DiI 陽性赤血球系細胞の比率は減少し始め、34 から 36 体節期では赤血球系細胞の比率は、22 から 24 体節期の三分の一であった。更に、22 から 24 体節期に注射した胎仔より採取した血液細胞で、Ter119（赤血球系細胞のマーカー）の発現をフローサイトメトリー解析したところ、形態学的所見に一致して、おおよそ半分が($51 \pm 7\%$, $n=4$)陽性だった。

4. この赤血球系造血が成体型ないし胎仔型か同定するため、採取した DiI 陽性細胞を用いて、RT-PCR 解析を行った。解析には胎仔型 β H1 グロビン遺伝子に対するプライマーと成体型 β -major グロビン遺伝子に対するものを使用した。DiI 陽性細胞では、 β H1 グロビン mRNA の発現は認められず、 β -major グロビン mRNA の発現のみ認められた。よって、DiI 陽性赤血球系細胞が成体型造血に含まれることが示唆された。
5. この DiI 陽性細胞中に赤血球系前駆細胞が含まれているかどうかを検討するため、DiI 陽性細胞を用いて、半固形培地（メチルセルロース）で培養を行った。1 x 10⁴ 個の DiI 陽性細胞を、SCF、IL-3、Epo 存在下で培養したところ、 5.7 ± 4.0 個($n=3$) の CFU-E と 47.7 ± 8.5 個($n=3$) の BFU-E が検出された。この赤血球系前駆細胞が成体型造血に由来することを確認するため、各々の 10 個の BFU-E を採取して、同様に RT-PCR 解析を行ったところ、すべてのコロニーで、 β H1 グロビン mRNA の発現は認められず、 β -major グロビン mRNA だけが認められた。以上の結果より、Ac-LDL-DiI を取り込む血管内皮細胞より血流中へ放出された細胞は、成体型赤血球系前駆細胞を含むことが示唆された。

以上、本論文はマウス胎仔において、全胚胎仔培養を用いて、血管内皮細胞に由来する赤血球造血を明らかにした。本研究は哺乳類造血発生の in vivo 解析において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。