

審査の結果の要旨

氏名 竹内眞樹

本研究では、成体型造血幹細胞の AGM 領域における発生と、その直後の胎仔肝における造血幹細胞の増殖・分化・成熟機構を解明する目的として、以下の二つの初代分散培養系を確立している。

1：AGM 分散培養系

成体型造血幹細胞の発生部位である AGM 領域での造血を解析する目的で、胎生 11.5 日の AGM 領域を分離し、分散培養する AGM 分散培養系を製作した。

2：AGM/胎仔肝共培養系

胎仔肝での造血を再現する目的で、胎生 14.5 日胎仔肝由来細胞を造血支持細胞として、胎生 11.5 日 AGM 由来造血幹細胞との共培養系（AGM/胎仔肝共培養系）を確立した。

これらの培養系において産生された血液細胞の性状を、フローサイトメトリー、*in vitro* コロニー形成法によって解析した。さらに培養で産生された血液細胞を放射線照射したマウスに移植して造血幹細胞活性を検討し、以下の結果を得ている。

1：造血支持環境の比較

AGM 領域の造血幹細胞からの血液細胞の産生を比較すると、胎生 14.5 日の胎仔肝を支持細胞とした AGM/胎仔肝共培養系が AGM 領域の細胞を支持細胞とする AGM 培養系より多くの血液細胞を産生できた。

さらにサイトカイン要求性を検討したところ、これら二つの培養系で Stem cell factor(SCF)は造血に必須であった。またインターロイキン 6 ファミリーに属するサイトカインであるオンコスタチン M(OSM)は、AGM 分散培養系では造血に必須であったが、AGM/胎仔肝共培養系では造血促進効果があるものの必須ではなかった。

2：造血幹細胞の比較

胎生 14.5 日の胎仔肝を造血支持細胞として、胎生 11.5 日 AGM, 胎生 14.5 日及び 18.5 日の胎仔肝由来の造血幹細胞を共培養し、産生される血液細胞の総数を比較した。共培養系において、胎生 14.5 日及び胎生 18.5 日胎

仔肝由来の造血幹細胞からも血液細胞を産生したが、胎生 11.5 日 AGM 由来造血幹細胞より産生量ははるかに低く、胎生 18.5 日胎仔肝由来造血幹細胞は胎生 14.5 日よりさらに低かった。また、AGM 由来造血幹細胞からの造血には強い促進効果のあった OSM は、胎仔肝由来の造血幹細胞からの造血には抑制的に働いた。このことから、AGM 由来造血幹細胞と胎仔肝由来造血幹細胞では明らかに質的な相違があると考えられた。また、発生過程が進むにしたがって、血液細胞の産生能は低下していくことが明らかとなった。

3 : 培養系における造血幹細胞の増幅

これらの培養系で産生される血液細胞を放射線照射マウスに移植して骨髄再構築能を検討した。OSM は移植可能な造血前駆細胞の支持・増殖に必須であった。AGM 培養系由来の細胞を移植したマウスでは次第に末梢血におけるドナー細胞率が低下したのに対して、OSM を添加した AGM/胎仔肝共培養系由来の細胞を移植したマウスでは 5 ヶ月間に渡って高いドナー細胞率を維持した。AGM 細胞では 6 胎児相当を移植して、末梢血ドナー細胞率が約 50%であったが、胎児 2/3 相当の AGM 細胞を OSM を添加した AGM/胎仔肝共培養系で培養して移植するとドナー寄与率が約 80%になったことから、この培養系は AGM 由来の造血幹細胞を著しく増幅していることが示唆された。

以上、本論文は、これまで未知に等しかった胎生期における造血幹細胞及び造血環境の変化を *in vitro* 培養系を用いて解析し、造血細胞と肝造血環境との相互作用によって互いに成熟していくモデルを提示している。さらに本研究の AGM/胎仔肝共培養系は、これまで極めて困難だった造血幹細胞の *in vitro* の増幅を可能にしており、造血幹細胞の基礎・応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位に授与に値するものと考えられる。