

## 論文内容の要旨

# マウス胎仔肝を抗原としたモノクローナル抗体の 作製による肝形成・造血機構の解析

大畑 慎也

### 【序】

マウス胎仔における造血は、胎生 10 日(E10) から E12 にかけて造血幹細胞が大動脈(Aorta)、生殖隆起(Gonad)、中腎(Mesonephros)に囲まれた AGM 領域の大動脈内皮細胞から出芽することにより始まる。発生した造血幹細胞は胎仔期の造血の場である肝へと流入し、胎生期を通じてそこを造血の場として増殖・分化し、さらに脾臓や骨髄へと造血の場を移していく。胎仔期の肝は、肝幹細胞である肝芽細胞から構成され、肝芽細胞と造血幹細胞は相互作用しながら増殖・分化する。しかしながら、どのような分子機構によって造血幹細胞が肝に留まるかは不明なままである。本論文で、胎仔肝形成・造血の解析に有用なツールの開発を目的として胎仔肝を抗原としてモノクローナル抗体を作製し、肝に存在する細胞を特

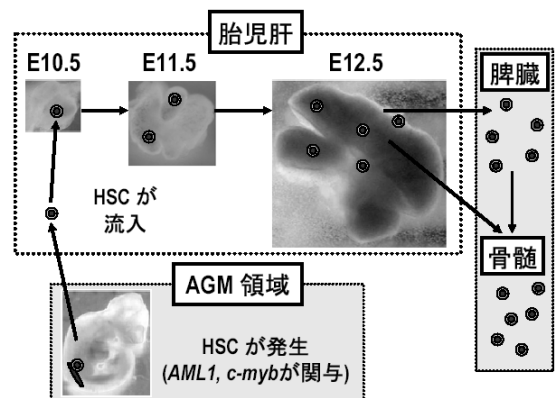


図1 マウス胎仔の造血

異的に認識する抗体を複数取得した。造血幹細胞の肝への接着には、造血幹細胞や肝芽細胞の表面に発現した分子が機能することが期待されることから、これらの抗体の中から細胞の表面を認識するモノクローナル抗体を選別し、解析に用いた。そして造血幹細胞が CD44 とヒアルロン酸の結合を介して肝に接着し、分化するとともにプロテアーゼによって CD44 が切断され肝から流出する可能性が見出された。

## 【方法と結果】

### マウス胎仔肝を抗原としたモノクローナル抗体の作製

E11.5 マウス胎仔肝を抗原としてラットに免疫しハイブリドーマを得た。それらが産生した抗体の中からパラフィン切片の染色によって胎仔肝領域を特異的に認識する抗体を 12 クローン取得した。得られた抗体を抗 Liv1~12 と命名した (図 2)。

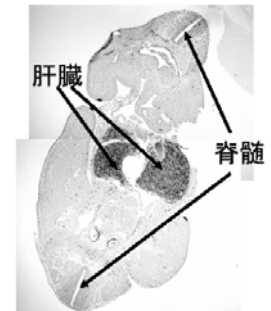


図2 マウス胎仔横断切片の抗Liv8染色 (E11.5)

### 細胞表面抗原を認識する抗体の選別と造血幹細胞における発現

細胞表面抗原を認識する抗体を得るべく、抗 Liv1~12 抗体をフローサイトメトリーによって選別し、抗 Liv8 抗体を得た。この抗体が認識する Liv8 抗原が胎仔造血に関与するかを検討すべく胎生期を追って AGM 領域のパラフィン切片染色を行った。その結果、AGM 領域の造血能獲得と時期を一致させて血管内皮細胞での Liv8 抗原の発現が認められ、さらには形態的に血管内皮から出芽していると思われる血球様の細胞も Liv8 抗原を発現していることが明らかとなった。肝に存在する造血幹細胞が Liv8 抗原を発現しているかを検討するために、肝が造血の場となる E11.5 胎仔肝を造血幹細胞マーカーと抗 Liv8 抗体によって二重染色を行った。その結果、両陽性細胞の存在が確認され、胎仔肝においても造血幹細胞が Liv8 抗原を発現していることが明らかとなった。さらに、造血幹細胞の分化に伴う Liv8 抗原の発現の変化を検討すべく、胎仔肝を分化マーカーと抗 Liv8 抗体によって多重染色しフローサイトメトリーにより解析した。その結果、Liv8 抗原の発現が造血幹細胞の分化とともに失われることが明らかとなった。これらの結果から、AGM 領域において発生した Liv8 陽性な造血幹細胞が肝へと流入してそこを造血の場とし、造血幹細胞が分化するとともに Liv8 抗原の発現が失われることが示唆された。

### 肝芽細胞における Liv8 抗原の発現

肝芽細胞における Liv8 抗原の発現を検討すべく、肝芽細胞マーカーと Liv8 抗原による染色を行った。AGM 領域からの造血幹細胞の流入以前の E9.5 では肝芽細胞は Liv8 抗原陰性であったが、流入後の E11.5 では陽性であった。この発現が造血幹細胞依存的であるかを検討するために、造血幹細胞を欠損する *AML1*<sup>-/-</sup>マウス胎仔肝の Liv8 抗原染色を行っ

た。野生型マウスの肝領域では Liv8 抗原の発現が観察されたが、興味深いことに *AML1*<sup>-/-</sup> マウスの肝領域では観察されなかった。また、同様の結果は同じく造血幹細胞形成不全である *c-myb*<sup>-/-</sup> マウスにおいても得られた。これらの結果から、肝芽細胞においては造血幹細胞の肝への流入依存的に Liv8 抗原の発現が行われることが示唆された。

### Liv8 抗原の同定

胎仔肝からの Liv8 抗原の精製は量的に困難であるため、Liv8 抗原を発現する培養細胞を探索し、マウス胎仔 AGM 領域由来の LO 細胞株を見出した。胎仔肝、LO 細胞を用いた抗 Liv8 ウェスタンブロットによって、特異的なバンドが約 90 kDa 付近にブロードに検出された。この結果より Liv8 抗原が翻訳後修飾を受けることが予想された。Liv8 抗原と各種レクチンとの結合を検討したところ、N 結合糖鎖に対するレクチンとの結合が見出され、Liv8 抗原が糖タンパク質であることが明らかとなった。LO 細胞を材料とし、抗 Liv8 ウェスタンブロッティングを指標に、レクチンカラム等を用いて Liv8 抗原を精製し、約 12,000 倍の精製度を達成した(図 3)。MS-MS 解析によりアミノ酸配列を決定し、ホーミングレセプター CD44 を見出し、培養細胞への CD44 遺伝子導入等によって、Liv8 抗原が CD44 であることを明らかにした。

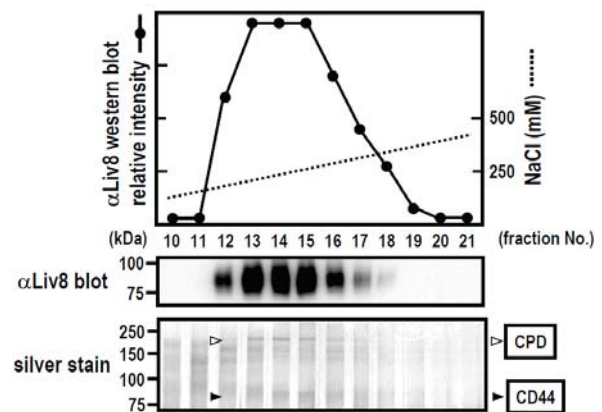


図3 Liv8 最終精製クロマトグラフ

### AGM 領域、胎仔肝におけるヒアルロン酸の局在

CD44 は細胞外マトリックスの構成因子ヒアルロン酸と結合し細胞移動に関与することから、CD44 の発現とヒアルロン酸の局在の相関を検討すべく、これらの共染色を行った。E11.5 の AGM 領域においては血管内皮細胞および血球様細胞での共局在は認められなかった。しかしながら、E11.5 肝においては CD44 とヒアルロン酸の局在が良く一致した。さらに、肝芽細胞マーカーとの共染色によって胎仔肝におけるヒアルロン酸の局在を検討したところ、肝芽細胞クラスターの縁およびクラスター間隙を埋めるようにしたヒアルロン酸の局在が確認された。これらの結果から、AGM 領域の血管内皮においてはヒアルロン酸が存在せず造血幹細胞が流出しやすい環境にあるが、肝ではヒアルロン酸によって造血幹細胞がとどまりやすい環境が形成されており、CD44 が造血幹細胞の造血の場への接着に関与することが示唆された。

## 新規 CD44 結合因子の同定

抗原精製過程においてクロマトグラフ上 CD44 と挙動を一致させる因子が約 180 kDa に認められたことから、この因子が CD44 の結合因子である可能性が期待された。この因子の質量分析を行い、膜貫通型ペプチド分解酵素ファミリーに属するカルボキシペプチダーゼ D (CPD) を同定した。共沈降実験によって CPD が CD44 と結合することを確認した。さらに、胎仔肝における CPD の発現を検討したところ、CD44 と一致した増減が観察され、胎仔肝においてこれらが実際に結合し機能していることが示唆された。さらには、CPD との共発現によって細胞ライセート中の CD44 量が顕著に減少し、培養上清中に放出されることを見出した。これらの結果から、CPD が CD44 の切断に関与していることが期待された。

### 【考察】

本研究において、マウス胎仔肝を抗原として複数のモノクローナル抗体を作成し、胎仔肝に存在する細胞の表面抗原を認識する抗体が取得された。この抗原を精製し、質量解析によってこの抗原が CD44 であることを明らかにした。この抗体を用いた解析により、AGM 領域および胎仔肝の造血幹細胞が CD44 を発現し、その分化とともに発現を失うことが見出された。また、AGM 領域と胎仔肝における CD44 とヒアルロン酸の局在を検討したところ、AGM 領域の血管内皮細胞では共局在は確認されなかったが、胎仔肝ではよく一致して観察された。さらに、肝芽細胞においても CD44 の発現が確認されたが、*AML1*<sup>-/-</sup>マウスの肝芽細胞では発現が確認されなかった。そして、CD44 の新規結合因子としてペプチド分解酵素 CPD を同定した。以上の結果から、AGM 領域で発生した CD44 陽性な造血幹細胞が肝に流入した後、CD44 を介してヒアルロン酸に接着し肝に留まると考えられた。

また、肝芽細胞における CD44 発現が造血幹細胞依存的であることが示唆されたことから、造血幹細胞が肝芽細胞に対して CD44 発現誘導を行うことが期待された。そして、CD44 の新規結合因子 CPD の機能としては、造血幹細胞が赤血球などに分化した際に CD44 を切断することによって CD44 の発現消失に関与することが期待された。

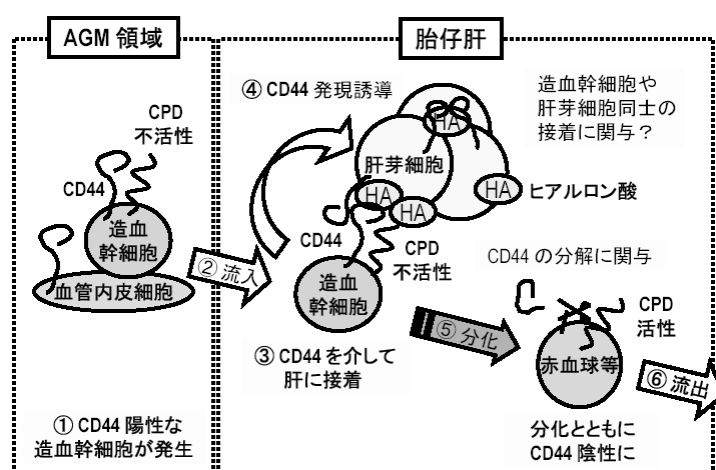


図5 胎仔造血におけるCD44の機能モデル