

審査結果の要旨

氏名 大畑 慎也

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, 生殖隆起, 中腎に囲まれた 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、そこで増殖・分化する。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、造血幹細胞が肝に留まる分子機構については不明な点が多く残されている。「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」と題する本論文においては、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、胎仔肝を抗原に肝に存在する細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体を複数取得し、それらを用いた解析から、造血幹細胞の肝への接着には、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て分化するとともに、亜鉛結合型プロテアーゼであるカルボキシペプチダーゼ D によって CD44 が切断され肝から流出する機構が存在する可能性を見出している。

1. 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。

2. 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にされた。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を見出した。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示された。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、そこを造血の場として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された。

3. 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^{-/-}* マウス胎仔肝の抗 Liv8 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^{-/-}* マウスの肝領域では観察されなかった。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に依存して Liv8 抗原が発現することが示された。

4. Liv8 抗原の同定

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 付近に検出された。LO 細胞を出発材料とし、抗 Liv8 ウェスタンブロットングを指標に、各種カラムを用いて Liv8 抗原を約 12,000 倍にまで精製した。Liv8 抗原のアミノ酸配列を MS-MS 解析によって決定し、ホーミングレセプター CD44 を同定した。培養細胞への CD44 遺伝子導入等から、Liv8 抗原が CD44 であることを確認した。

5. 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て細胞移動に関与することから、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。これらの結果から、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された。

6. 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を解析し、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て機能することが示された。さらに、CPD との共発現によって、CD44 が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 が細胞表層からの CD44 の切断に関与する可能性が示された。

本論文から、マウス胎仔肝形成・造血において以下のようなモデルが提示される。1) AGM 領域で発生した CD44 陽性な造血幹細胞が肝に流入する、2) 造血幹細胞は CD44 を介してヒアルロン酸に接着し、肝に留まる、3) 造血幹細胞が肝芽細胞に対して CD44 の発現を誘導し、肝芽細胞が CD44 を発現する、4) 造血幹細胞が赤血球などに分化すると、CPD が CD44 を切断して CD44 の発現を消失させる。これらの知見は胎仔肝形成・造血機構の理解に有用な情報を提供しており、博士(薬学)の学位として十分な価値があるものと認められる。