

論文の内容の要旨

論文題目： 造血システムにおけるエンドムチン分子の解析

指導教員： 中内啓光教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名： 松原 梓

造血幹細胞のより効率良い純化方法の確立と、ニッチとの相互作用による造血幹細胞活性の維持機構の解明に向けて、造血幹細胞に特異的な膜表面分子の探索が所属研究室で行われてきた。造血幹細胞分画である分化抗原陰性 CD34⁻c-Kit⁺Sca-1⁺ (CD34⁻KSL) 細胞の遺伝子ライブラリーに対してシグナルシーケンストラップ法が用いられたところ、シグナルシーケンスを有する遺伝子、すなわち、分泌タンパクおよび膜タンパクが 86 分子同定された。既知の遺伝子は 46 分子あり、RT-PCR により Endomucin、CLEC (c-type lectin like receptor)、PEDF (pigment epithelium-derived factor)、Serpentine の遺伝子が未分化な骨髄造血細胞に特異的に発現することが確認された。

同定された膜表面分子の一つである Endomucin 分子は、血管内皮に発現する分子として報告されていたが、造血系での発現は知られていなかった。Endomucin mRNA は CD34⁻KSL 分画に特異的に発現すること、CD34 類似のシアロムチンファミリーに属する分子であることから、本研究では、Endomucin 分子が造血幹細胞の優れたポジティブマーカーと成り得るかを検討することを目的とした。その方法として、Endomucin のモノクローナル抗体を用いて、胎仔から成体に至る造血システムの Endomucin 発現

細胞を分画し、その造血能を検討した。

成体マウスの骨髄、脾臓細胞を解析したところ、Endomucin 分子は分化した血球にはほとんど発現しないが、造血前駆細胞の細胞表面に発現していることが確認された。成体骨髄、脾臓細胞では Endomucin と Gr-1、Mac-1（好中球マーカー）、B220（リンパ球前駆細胞、成熟 B 細胞マーカー）、CD4、CD8（T 細胞マーカー）、TER119（赤芽球細胞マーカー）とを共発現する細胞はほとんど存在せず、Endomucin 高発現分画ほど造血幹・前駆細胞分画である KSL 細胞を濃縮していた。また逆に、80%以上の KSL 細胞が Endomucin 陽性であった。KSL 細胞のうち、造血幹細胞分画である CD34⁻KSL 細胞の約 70%、長期骨髄再建能を持たない CD34⁺KSL 細胞の約 78% に Endomucin が発現していた。これらより、Endomucin 分子は分化した血球にはほとんど発現しないが、mRNA の発現とは異なり、タンパクレベルでは造血幹細胞だけでなく、前駆細胞の細胞表面にも発現することを明らかにした。ただし、CD34⁻KSL 細胞の方が CD34⁺KSL 細胞分画よりも Endomucin を高発現していた。

骨髄球誘導サイトカイン存在下におけるコロニー形成実験では、KSL 分画のうち Endomucin⁺CD34⁻細胞が最も高頻度でコロニーを形成し、また、この分画の細胞が最も高頻度に多分化コロニーを形成した。Endomucin 発現細胞の長期骨髄再建能を調べたところ、Endomucin⁺ CD34⁻KSL 細胞を移植した場合にだけ移植後 6 ヶ月経過したマウスの末梢血にドナー細胞の寄与が認められた。また、異なるマーカーの組み合わせで分画した場合も、Lin⁻CD34⁻Endomucin⁺ 細胞の移植群にのみ骨髄再建能が認められた。これらの結果より、成体マウスにおける全ての造血幹細胞は Endomucin を発現することが示された。

胎仔造血幹細胞についてその発生部位や時期は詳細に調べられているが、発生期を通して一貫して使用できる有用なマーカーは同定されていない。そこで、全ての成体造血幹細胞に発現する Endomucin が胎仔においても発生期の造血幹細胞の指標と成り得るのか解析した。造血が始まる E8.5 では、マクロファージまたは胎仔型赤血球（Ery^P）より構成されるコロニーが YS から形成されるが、Endomucin、CD41、CD45 の発現を解析したところ、E8.5 YS の造血分画に Endomucin の発現は認められなかった。半固形培地を用いてコロニー形成能を比較したところ Ery^P コロニーは Endomucin⁻ の細

胞からのみ産生された。E10.5 の YS においても同様に CFU-E や BFU-E は Endomucin⁻ 分画にだけ存在し、Endomucin⁺ 細胞は、他系譜の血球を含む混合コロニーを形成した。成体に生着する細胞が報告されている AGM 領域では、E10.5 AGM CD41^{dim} Endomucin⁺ 細胞は半固形培地でコロニーをほとんど作らず、コロニーを産生するのは CD41⁺ Endomucin⁻ であった。これらのコロニー形成実験より、YS および E10.5 AGM では、コロニー形成能を有する造血前駆細胞は Endomucin⁻ であると結論した。ところが、OP-9 ストローマ細胞と AGM 細胞との共培養実験を行い、ストローマ細胞による造血刺激を付与したところ、半固形培地ではコロニーを形成しなかった CD45⁻CD41^{dim}Endomucin⁺ 細胞は 38 倍以上もの形成率でコロニーを形成し、顕著な増殖活性を示した。以上より、E10.5 AGM CD45⁻ CD41^{dim}Endomucin⁺ 細胞はコロニーを形成する能力を得るためにストローマなどからの刺激を必要とする、より未分化な造血細胞であると考えた。E11.5 AGM では CD45⁺ 細胞が高い造血活性を示し、Endomucin⁺ 細胞は半固形培地でも、OP-9 共培養系でも高い造血能を示した。発生期の胎仔内胚葉系のモデルとなる ES 細胞由来の胚葉体においても CD41^{dim}Endomucin⁺ 細胞は OP-9 上で高い造血能を示した。

成体マウスをレシピエントとして Endomucin⁻ で分画した胎仔 AGM 細胞の造血幹細胞活性を調べたところ、E10.5 AGM では CD45⁻ CD41⁺Endomucin⁺ 細胞、E11.5 AGM では CD45⁺Endomucin⁺ 細胞のみが長期骨髄生着能を示し、その他の分画は全く生着しなかった。E10.5 AGM の CD45⁻CD41⁺Endomucin⁺ 細胞は B 細胞優位の不完全な造血能をしめしたが、E11.5 の CD45⁺Endomucin⁺ 細胞は多系譜に寄与した。これらの結果より、AGM において成体骨髄に生着する全ての細胞が Endomucin⁻ を発現することが明らかとなった。

さらに、E10.5 AGM の造血関連遺伝子の発現プロファイルから、E10.5 AGM の CD45⁻CD41⁺Endomucin⁺ 分画には発生途中の造血幹細胞が存在し、CD45⁻CD41⁺Endomucin⁻ 分画には赤血球系譜に分化した細胞が含まれることが示唆された。CD41⁺Endomucin⁺ 細胞は、c-Kit と CD34 を発現していたが、CD41⁺Endomucin⁻ 細胞における発現は顕著に低かった。また、CD45⁻CD41⁺ Endomucin⁺ 細胞は、造血幹細胞の発生に重要と考えられる SCL、Runx-1、GATA-2 を高発現しており、

CD45⁻ CD41⁺Endomucin⁻ 細胞は赤血球系譜に分化決定した細胞に発現が見られる GATA-1 が高発現していた。

これらの知見より、私は造血幹細胞の発生過程について次のような仮説を考えた。造血幹細胞はまず、血管の一部に存在すると考えられる特別な内皮細胞から CD41⁺ 細胞として分岐する。CD41⁺ 細胞のうち、Endomucin⁻ 細胞は胎仔初期の造血を支える赤芽球細胞であり、Endomucin⁺ 細胞は造血幹細胞となる前段階の細胞である。この時点ではまだ CD45⁻ であるが、何らかの刺激によって成熟し、CD45 を発現するとともに、成体型造血幹細胞に匹敵する能力をもつ細胞に変化する。そして、この時期から形成され始める骨髄にホーミングして、成体マウスの造血を支えるようになる。この仮説を証明するためには、発生過程を擬似する実験系の確立が必要である。

本研究では Endomucin の機能を直接明らかにすることはできなかったが、それを示唆する知見が得られた。OP-9 ストローマ細胞と AGM 細胞の共培養実験では OP-9 ストローマ細胞の下に潜り込んでいる細胞がクラスターを形成して増殖している部分が観察され、細胞表面の片側に Endomucin が集積していた。また、成体 CD34⁻KSL 細胞では、SCF+TPO で 30 分刺激すると Endomucin の集積がみられた。同じシアロムチンファミリーに属する CD43 でも同様の知見が報告されていることから、造血幹細胞とニッチェ細胞との接点の対極に Endomucin が集積し、このことによって分化シグナルの伝達、あるいは抑制、または造血幹細胞の免疫寛容を獲得しているのではないだろうか。

本研究により、Endomucin はマウスの発生時期を通して有用な造血幹細胞マーカーであることが明らかとなり、また、造血幹細胞の発生過程を探る上で造血幹細胞の前駆細胞と考えられる CD45⁻CD41⁺Endomucin⁺ 分画を見出した。さらに、ニッチェにおける造血幹細胞の分化または維持に Endomucin の集積が関わることが示された。Endomucin を指標に用いることによって、造血システムの発生過程、およびニッチェとの相互作用がより明らかとなっていくことが期待される。