

## 審査の結果の要旨

氏名 松原 梓

本研究は造血幹細胞の新規膜表面分子を同定するため、造血幹細胞遺伝子ライブラリーより得られていた候補遺伝子 **Endomucin** に着目し、マウス成体および胎仔、ES 細胞においてコロニー形成実験系、ストローマ細胞共培養実験系、骨髄移植実験系を用いて **Endomucin** 発現細胞の造血能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 抗 **Endomucin** モノクローナル抗体(V7C7)と主な分化抗原マーカー抗体を用いて、成体の造血組織である骨髄、脾臓細胞について **Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS)** を用いて解析し、骨髄の 0.33% が **B220<sup>+</sup>Endomucin<sup>+</sup>**、0.46% が **Mac-1<sup>low</sup>Endomucin<sup>+</sup>**、脾臓の 1.1% が **B220<sup>+</sup>Endomucin<sup>+</sup>** であった。短期骨髄再建能を有する造血前駆細胞は **Mac-1** 弱陽性であることから、**Endomucin** 分子は骨髄の分化細胞にはほとんど発現しないことが示された。
2. 成体骨髄の分化抗原(**Lin**)陰性分画について **Endomucin** の発現強度に応じて細胞を分画し、造血前駆細胞マーカーである **c-Kit** と **Sca-1** の発現について **FACS** で調べたところ、**Endomucin** を最も多く発現する分画ほど **Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> (KSL)** 細胞を濃縮していることが示された。また、造血幹細胞分画である **CD34<sup>+</sup>KSL** 細胞の約 70% が **Endomucin** 抗体で強く染色され、未分化な造血細胞に **Endomucin** 分子が高発現することが示された。
3. 成体骨髄の **KSL** 細胞について骨髄球系誘導サイトカイン存在下で培養してコロニーを形成させた結果、多分化系譜の細胞を産生する能力をもつ細胞は造血幹細胞分画の **Endomucin<sup>+</sup>** 細胞であることが示された。また、骨髄移植実験により、造血幹細胞分画の中では **Endomucin<sup>+</sup>** 細胞だけが、**Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>** の中では **Endomucin<sup>+</sup>** 細胞だけが造血幹細胞活性を示し、成体骨髄に存在する全ての造血幹細胞が **Endomucin** 分子を発現することを明らかにした。

4. マウス発生初期の胎齢 8.5 日(E8.5) の卵黄囊(YS) では、サイトカインを用いた血球誘導系で Endomucin<sup>+</sup> 細胞は血球コロニーを産生しないことを示した。同時に、この時期にサイトカイン刺激のみで血球コロニーを産生し得るのは CD41<sup>+</sup>Endomucin<sup>-</sup> 細胞であり、そのほとんどが胎仔型赤血球であることを示した。また、発生中期の E10.5 YS CD41<sup>+</sup> Endomucin<sup>+</sup> 細胞は多分化系譜を含む血球コロニーを産生することを示した。これらから、胎仔期の Endomucin<sup>+</sup> 細胞は特定の血球系譜に特化した細胞ではないという結論を導いた。
5. 造血幹細胞が検出されるマウス発生中期(E10.5、E11.5) の大動脈 - 生殖隆起 - 中腎 (AGM) 領域の細胞についてサイトカイン刺激およびストローマ細胞共培養により血球産生を誘導した結果、Endomucin<sup>+</sup> 細胞はストローマ刺激により顕著な増殖能を示し、逆にサイトカイン刺激で血球を産生した Endomucin<sup>-</sup> 細胞は増殖性を示さないことを明らかにした。これらの結果から胎仔期における Endomucin<sup>+</sup> 細胞は高い造血能を有する未分化な細胞であるという結論を導いた。ES 細胞から内胚葉へ誘導した胚様体においても同様の結果を示した。また、高い造血能を示す細胞は E10.5 AGM では CD45<sup>-</sup> であり、E11.5 AGM では CD45<sup>+</sup> であることも明らかにした。
6. E10.5、E11.5 AGM について骨髓移植実験により造血幹細胞活性を調べ、ストローマ共培養実験でそれぞれ高い造血能を示した分画にのみ、骨髓再構築能を有する細胞が含まれることを示した。ただし、E10.5 AGM の細胞は再構築の寄与率が低く、E11.5 AGM や成体造血幹細胞と質的に異なることから、造血幹細胞の前駆細胞が存在するという新たな仮説を導いた。

以上、本論文はマウス成体および胎仔期の Endomucin 発現細胞の解析から、発生期を通して全ての造血幹細胞が Endomucin 分子を発現することを明らかにした。これにより、これまでなかった発生過程を通して有用な造血幹細胞マーカーが同定された。胎仔 AGM 細胞を分画し、造血幹細胞活性の解析は世界でも初めての試みであり、本研究の結果は造血幹細胞の発生過程解明に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。