

論文内容の要旨

Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells

JAM-A は長期骨髄再構築能を有する

造血幹細胞の新規表面抗原である

指導教員 北村 俊雄 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

生殖・発達・加齢医学

菅野 安喜

細胞表面分子の発現プロファイルにて血液細胞の系統および分化状態を識別することが行われており大沢らの先進的な研究によって、1 個の CD34 陰性 KSL 細胞が長期に渡って全血液システムを再構築することが示され、成体骨髄において、CD34 陰性 KSL 細胞が長期の骨髄再構築能を有する造血幹細胞として確立されていた。最近、松崎らは CD34 陰性 KSL 細胞中の Hoechst33342 による side population (SP) の先端が、最も純化した造血幹細胞と報告した。直近では、SLAM family 分子により造血幹細胞を純化した報告があった。しかしながら、これらの純化方法は、多くの抗体の組み合わせによる大がかりな細胞採取

を必要とし、より効率的に造血幹細胞を純化する新規の造血幹細胞マーカーが求められていた。

我々の研究室では、マウス胎生 14.5 日の胎児肝臓細胞に発現している新規の造血因子の探索過程において、Junctional adhesion molecule-A (JAM-A/JAM-1/F11R) が、胎児肝臓細胞に発現していることを見だし、JAM-A に対する抗体を得た。JAM-A は、約 36kD の 2 個の免疫グロブリン様ドメインを有する I 型膜貫通蛋白で、上皮細胞や内皮細胞のタイトジャンクションを構成する接着分子として知られていた。また成熟血球である白血球、血小板、赤血球などでの発現も知られていたが、未分化な細胞集団である造血前駆細胞、造血幹細胞レベルでの発現は知られていなかった。

そこで、私は JAM-A がマウス造血器官で、どのように発現しているかを検討することになった。主要な造血器官として、発生順に大動脈生殖腺中腎領域 (AGM)、胎児肝臓 (FL)、成体骨髄 (BM) を見た。それぞれの組織全体の JAM-A の発現は、胎生 11.5 日 AGM で約 80.3% と非常に高く、FL では約 40% (胎生 11.5 日 ; 42.1%、胎生 14.5 日 ; 44.0%、胎生 18.5 日 ; 33.6%) と減少した。8-12 週齢の BM では、約 2.1% と激減した。次に、未分化造血幹細胞を多く含む造血幹細胞分画について検討した。造血幹細胞分画に関しては、既知の知見より胎生 11.5 日 AGM、胎生 11.5 日 FL では CD34 陽性/c-Kit 陽性細胞を用い、胎生 14.5 日以降の FL、成体 BM では c-Kit 陽性/Sca-1 陽性/分化抗原陰性 (KSL) 細胞集団を解析した。造血幹細胞では、AGM ではほとんどの細胞が JAM-A 陽性 (約 98.8%) であり、FL においても発現が高く維持されていた (胎生 11.5 日 ; 88.1%、胎生 14.5 日 ; 89.0%、胎生 18.5 日 ; 71.1%)。8-12 週齢の BM は、組織全

体では JAM-A の発現が約 2.1%と低かったが、造血幹細胞分画では約 65.3%と高い発現が維持されていた。これらの結果から、胎児期から成体の造血組織において造血幹細胞分画では、JAM-A が高く発現維持されていた (Figure 1)。

次に、JAM-A 陽性細胞、JAM-A 陰性細胞の中で、この造血幹細胞分画をどれくらいの頻度で含んでいるか検討した。胎生 11.5 日 AGM と胎生 11.5 日から胎生 18.5 日の FL のどの時期でも JAM-A 陰性細胞集団に比べ、JAM-A 陽性細胞集団が顕著に造血幹細胞分画を多く含んでいる事がわかった。また、マウスの発生に従ってその傾向が強くなることもわかった。この結果は、JAM-A を用いることで造血未分化細胞の濃縮出来ることを示唆した。次に、成体の骨髄について検討した。胎児期で得られた結果と同様に、JAM-A 陰性の細胞集団に比べ、JAM-A 陽性細胞集団が顕著に造血幹細胞分画を多く含んでいることがわかった。若い週齢 (1 週齢) および老齢 (36-40 週齢) のマウスでもその結果は維持されていた。また成熟マーカーを除かない細胞集団において、JAM-A 陽性細胞集団が JAM-A 陰性細胞集団に比べ、c-Kit 陽性/Sca-1 陽性の未分化な細胞集団を濃縮 ($29.99 \pm 8.72\%$ vs $0.15 \pm 0.08\%$; $P < .001$) していた。

JAM-A 抗体を用いることで、未分化造血細胞を前向き方向に選別出来るかを検討した。抗 JAM-A 抗体で染色した細胞を FACS Vantage で細胞分種し、JAM-A 陽性細胞、JAM-A 陰性細胞に分けた。それぞれの細胞群を May-Giemsa 染色し、顕微鏡で形態観察した。形態的に、核 / 細胞質比の高い未熟な細胞が JAM-A 陽性細胞集団により多く含まれている事がわかった (Figure 2)。細胞を未熟な細胞と 3 つの成熟細胞集団として 4 つに分けて定量した結果、JAM-A 陽性細胞集団に未熟な細胞が多く含まれていることがわかった ($27.75 \pm 0.25\%$ vs

1.5±1.25% ; P< .008)。

形態的に未熟な細胞群が機能的に多分化能を有する細胞群であるかを検討した。コロニーアッセイ法を用いて、CFU-Mix として多分化能を有する細胞頻度がわかるので、造血幹細胞分画を JAM-A 陽性、JAM-A 陰性細胞群に分けて FACS Vantage にてそれぞれの細胞群を採取し、コロニーアッセイ法にてそれぞれの細胞群の CFU-Mix の存在頻度を検討した。この結果、胎生 14.5 日以降の胎児期および成体骨髄において統計学的有意性をもって、JAM-A 陽性細胞群が多分化能を有する未分化造血幹細胞を多く含んでいることがわかった。これらの結果より歳時肝臓、骨髄において JAM-A 陽性細胞群に未分化造血細胞が高頻度で含まれていることがわかった。

造血幹細胞の JAM-A の発現を骨髄移植アッセイ法により検討した。移植結果は、陽性コントロールとして用いた KSL 細胞を 300 細胞移植したマウスでは、6 匹中 5 匹で長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞 (LTR-HSC) の生着を認めた。JAM-A 陰性 KSL 細胞では、移植細胞数を 1000 細胞まで増やしても LTR-HSC の生着を認めなかった。JAM-A 陽性 KSL 細胞を 100 細胞移植したマウスでは 9 匹中 7 匹で LTR-HSC の生着を認めた。JAM-A 陽性 KSL 細胞を 300 細胞移植したマウスでは、4 匹中全例で LTR-HSC の生着を認めた。この結果から、JAM-A 陽性細胞群のみに長期骨髄再構築能があることがわかった。さらに、骨髄から抗 JAM-A 抗体のみで選別した細胞を 100 細胞移植したマウスの 7 匹中 4 匹が LTR-HSC の生着を認めた (Table 1)。これは造血幹細胞を濃縮した KSL 分画の細胞を用いなくても、抗 JAM-A 抗体のみで、骨髄の中から造血幹細胞を選別出来るという結果を示した。また、造血幹細胞の存在頻度を dilution assay

法にて検討した。その結果、陽性コントロールとして用いた KSL 細胞群の約 109 細胞に 1 細胞が造血幹細胞であり、JAM-A 陽性 KSL 細胞群では約 65 細胞に 1 細胞が造血幹細胞であることがわかった。この結果は、KSL 細胞群を抗 JAM-A 抗体を用いることで、造血幹細胞を約 1.7 倍効率的に純化出来ることを示した。

これらの結果から、胎児期から成体骨髄を通じた造血器官の造血幹細胞分画では JAM-A 陽性細胞の比率は高く維持されていた。また、JAM-A 陽性群のみに長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞が含まれ、JAM-A が新規の造血幹細胞の表面抗原であることがわかった。さらに、抗 JAM-A 抗体を用いることで、造血幹細胞が効率的に分離・純化出来ることがわかった。

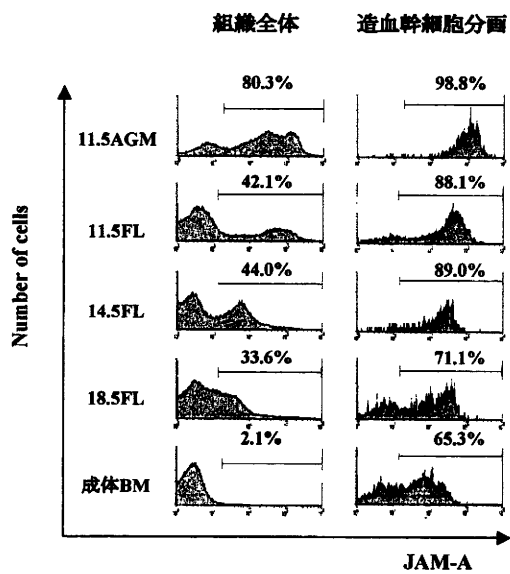


Fig.1

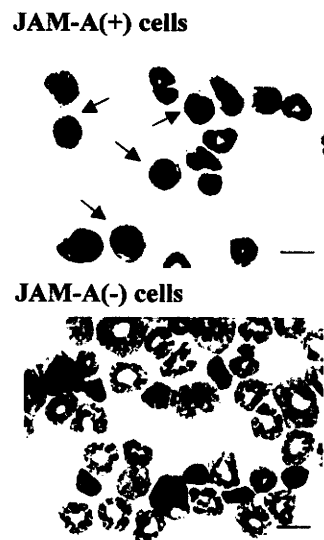


Fig.2

Cell population	Cell number	Engrafted mice	Total	Myeloid cells	T cells	B cells
KSL	300	5/6	16.7 ± 10.6	15.6 ± 17.2	32.1 ± 19.8	28.0 ± 17.0
KSL JAM-A-	100	0/4	-	-	-	-
	300	0/6	-	-	-	-
	1000	0/6	-	-	-	-
KSL JAM-A+	100	7/9	32.4 ± 26.4	29.7 ± 25.7	38.7 ± 25.3	24.6 ± 29.2
	300	4/4	77.4 ± 29.6	82.3 ± 20.8	73.8 ± 31.5	83.4 ± 17.1
JAM-A+	100	4/7	15.4 ± 24.4	13.8 ± 21.9	10.4 ± 13.6	14.5 ± 24.4

Table 1