

学 位 論 文 題 名

ONTOGENIC EMERGENCE OF BLOOD CELLS IN *XENOPUS*
LAEVIS LARVAE AS STUDIED BY MONOCLONAL ANTIBODIES.

（アフリカツメガエル幼生における血球の
個体発生—単クローン抗体による研究）

学位論文内容の要旨

脊椎動物における血球の発生は、胚期の卵黄嚢に存在する多分化能を持つ造血幹細胞が、血流を介して様々な造血器官に移動した後、その場所の特異な微細環境の影響を受けて増殖・分化することによってと考えられてきた。しかし鳥類および無尾両生類で行われた異種間キメラや倍数性の違いを利用した近年の細胞標識実験により、羊膜類の卵黄嚢に存在するいわゆる血島以外に起源を持つ別の造血幹細胞集団の存在が指摘されている。すなわち無尾両生類の尾芽胚では、従来知られていた腹部血島（VBI）中胚葉の他に、背部側板（DLP）中胚葉が 後期幼生および成体の赤血球とリンパ球を供給する造血幹細胞を含む事が明らかとなった。しかしリンパ球以外の白血球の起源に関しては、一部の幼生マクロファージが VBI起源であることが指摘されている以外明確な報告はない。また幼生期の最初の赤血球分化は 心拍開始前のVBIで起こることが知られているが、血流開始以後の幼生のどの器官で赤血球分化が起こるかについても明らかではない。個体発生過程における血球の起源・移動様式に関するこのような疑問に答えることを目的として、本研究を行った。

従来の血球分化に関する研究では、リンパ球を除く白血球を特異的に検出する標識分子を有効に用いた例はない。そこで本研究では、アフリカツメガエル (*X. laevis*) 成体の腹腔マクロファージ および幼生型ヘモグロビン (LHb) をマウスで免疫して得た、白血球とLHbをそれぞれ特異的に認識する単クローン抗体 (mAb) をプローブとして、白血球と赤血球の初期発生を調べた。また、分化した血球の胚体内での由来を追

跡するための標識として、キナクリンにより核が特異的に染まる *Xenopus borealis* 細胞を用いた。この目的を達成するため、*X. laevis* 卵を、*X. borealis* の精子で媒精し得た種間雑種を *LB* 胚として、これを通常の *X. laevis* 二倍体 (*LL*) 胚と区別し、両者の間でキメラをつくった。結果の概要は以下の通りである。

I. 胚における白血球の分化

抗白血球 mAb で認識される抗原 (XL-1) は、成体および幼生の全てのタイプの白血球 (リンパ球、顆粒球、栓球、単球/マクロファージ) 上に発現し、赤血球には存在しない。一方、抗 Lhb mAb は 成体の Hb とは反応せず Lhb のグロビン鎖とのみ反応する。抗原 XL-1 を認識する mAb を用いて胚、幼生の免疫組織化学的観察を行った結果、XL-1⁺ 細胞は顆粒球やマクロファージ様細胞として st. 36-37 の肝臓、st. 44-45 の中腎ならびに胸腺、st. 47 の脾臓の各原基で 最初に検出された。また この XL-1 抗原は st. 46-47 の胸腺原基中の T 前駆細胞、st. 47 の肝臓原基中の B 前駆細胞、st. 48-49 の脾臓原基中のリンパ球に発現していた。したがって、XL-1 は白血球の分化マーカーとしてきわめて有用な分子である、といえる。ところで、両生類胚の血島として知られる VBI についてみると、st. 35/36 胚では Lhb を発現した分化赤血球がすでに見られるが、XL-1⁺ 細胞はごく少数しか存在しなかった。しかし、マクロファージ様の XL-1⁺ 細胞が、心拍開始 (st. 33/34) に先立つ st. 32 胚の間充織中に出現するのが注目された。

赤血球、リンパ球に先がけて出現する XL-1⁺ 細胞の由来を明らかにするため、st. 22-23 の尾芽胚を用い、(a) *LB* 胚の VBI 域を *LL* 胚に同所移植した VBI キメラ、(b) VBI 域を含めよう *LB* 胚頭部を鰓原基の位置で切断し、同じレベルで切断した *LL* 胚胴尾部と接合させた前後キメラを作製し、さらに (c) st. 14 (初期神経胚) と st. 22-23 に胚頭部を分離し培養した外植体をつくり、これらをリンパ球が分化する以前の st. 44-45 に固定・検索した。その結果、VBI 由来の血球で XL-1⁺ 細胞の占める割合は赤血球のそれよりも常に少なく、また VBI とは独立に頭部に起源を持つ XL-1⁺ 細胞が 多数分化し始めることが確かめられた。一方、*LB* 胚の VBI を移植後 心臓原基摘除により血流を阻害した実験個体では、移植片由来の XL-1⁺ 細胞が st. 40 から st. 46-47 の間に多数分化することも確認されたので、初期幼生に出現する非リンパ系白血球には VBI 由来とそれ以外の 2 つの異なる集団が存在すると結論される。

II. 初期幼生における赤血球造血

抗LHb mAbを用いた免疫組織化学的観察により、LHb⁺細胞は st.28のVBIに初めて現れ、st.33/34に循環系が確立すると同時にVBIから分散することが示された。st.31とst.40の2回にわたるフェニルヒドラジン処理により完全な貧血を誘導された幼生では、まず肝臓および消化管原基において最初の再生LHb⁺細胞が出現し、その後血管内に分布した。心臓原基摘除後貧血を誘導された個体では、LHb⁺細胞の回復が、著しく阻害された。さらに、LB胚由来のVBI移植を施されたLL個体に貧血処理を施すことにより、全実験個体でVBI由来の細胞が再生LHb⁺細胞に分化することが実証された。これらの結果は、VBIが個体発生における最初の赤血球分化の場であるだけでなく、幼生の肝臓原基に移動して幼生赤血球に分化する赤血球前駆細胞の供給源でもあることを示すと結論した。

本研究は、*Xenopus*白血球並びにLHbに対するmAbを作製することにより、個体発生初期における白血球および赤血球の分化に関する幾つかの疑問に答えることを可能とした。とりわけ、XL-1は全ての白血球のみに分布する信頼性の高い分化マーカーであり、これを標識にすると初期発生胸腺におけるT細胞分化マーカー(XT-1)、肝臓におけるB細胞分化マーカー(Ig M)などに先立ってこれらリンパ球がその前駆細胞の段階で検出できることが実証された。また、XL-1を指標にすることにより、リンパ球が分化・出現する遙か以前の幼生体内に多数の非リンパ系白血球が存在すること、それらはVBIに起源を持たないことが発見された。したがって、本研究及び従来の見解を総合すると、白血球は由来からみて、(a)VBI以外の体各部の間充織由来のマクロファージ様の集団、(b)VBI由来のリンパ球を含めた白血球、及び(c)DLP由来の白血球、の3つの集団からなるといえる。このうち(a)は、孵化により受精膜を脱ぎ捨ててからVBIに起源を持つ非リンパ系白血球やリンパ球が出現するまでの初期幼生において、外来の非自己成分に対する生体防御機構に役割を担っている可能性があり、生体防御の個体発生と系統発生を結ぶ候補として注目される。一方、LHbを指標にすることにより、VBIは個体発生で最初に赤血球が分化する場であると共に、血流を介し移動した後肝臓原基で分化する赤血球前駆細胞集団をも含むことが新たに明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 桐 千 明

副 査 教 授 久 田 光 彦

副 査 助教授 枡 内 新

学 位 論 文 題 名

ONTOGENIC EMERGENCE OF BLOOD CELLS IN XENOPUS LAEVIS LARVAE

AS STUDIED BY MONOCLONAL ANTIBODIES

(アフリカツメガエル幼生における血球の個体発生—単クロン抗体による研究)

脊椎動物の個体発生における血球の起源を胚期の卵黄嚢に局在する幹細胞に求めると云う定説は、信頼性の高い標識細胞を活用して胚の顕微操作に成功した近年の研究により、再検討を迫られている。大日向 浩提出の学位論文は、アフリカツメガエルの白血球および赤血球の分化を的確に検出し得る単クロン抗体を作製し、これを初期胚期につくった異種間キメラ個体に適用して胚における血球幹細胞の局在と移動のパターンを明らかにすることを通じて、個体発生過程における血球の由来について新しい見解を提出したものである。論文は主論文と参考論文4編からなる。

血球分化に関する従来の研究で、白血球一般に共通に発現する標識分子が有効に利用された例はない。申請者はアフリカツメガエルの幼生および成体のすべてのタイプの白血球に特異的に発現する糖蛋白質(XL-1)を認識する単クロン抗体(抗XL-1)、および幼生型グロビン鎖(LHb)のみと反応する単クロン抗体(抗LHb)を作成した。これらをプローブとした免疫組織化学的観察によればLHb⁺細胞はSt.28の腹部血島に初めて検出され、ここの中胚葉が古典的研究でも知られる通り胚の赤血球の最初の供給源であることが確認される。ところがXL-1⁺細胞はこの部

域ではSt. 35/36に出現し且つ細胞集団としても極めて貧弱であり、代わりにそれに先立つSt. 32胚の各領域にマクロファージ様のX L-1⁺細胞が散在するという注目すべき発見をしている。胚における心拍開始がSt. 32/34であることを考慮すると、これらX L-1⁺細胞を血島由来とみなすのは無理があり、つぎに申請者はこの白血球の由来を徹底的に追求している。細胞の由来を明らかにするためには、核クロマチンの特異な染色性から*Xenopus laevis*と識別が可能な*X. borealis*の形質をもつ雑種LB胚を利用して*laevis*胚との間で血島の同所キメラをつくり、また血流による移動の影響を排除するため胚の外植体や心臓原基の摘除個体を作成するなど、両生類の胚ではじめて可能なデザインの操作を行なった。このような実験個体で分化した血球を抗X L-1と抗L H bで、またその由来を核標識の有無で決定するという丹念な追跡の結果、いかなる意味でもリンパ球が分化する以前のSt. 44/45の胚で頭部および背側中胚葉間充織由来の非リンパ系白血球が分化することを確認している。これらの観察に関連して腹部血島の役割をより明瞭にすべく、上記LB標識細胞から成る血島キメラ個体にフェニルヒドラジンで完全貧血を誘導した後L H b⁺細胞の再生パターンを追跡し、肝臓原基で再生する赤血球が腹部血島由来の細胞集団からなることを見いだした。

これら一連の成果の意義は、(a)胚の腹部血島がこれまで知られていたように幼生型赤血球の最初の出現場所であると同時に、肝臓に赤血球幹細胞を供給する機能を持ち、且つ非リンパ系白血球の分化の場でもあることを証拠づけたこと、および(b)血島以外に起源をもつ白血球集団の存在を証明したこと、にある。とくに血島以外の中胚葉に由来する白血球はマクロファージ様形態から食細胞機能をもつことが示唆され、リンパ球を動員した獲得免疫系が作動する以前の胚で異物処理にあたっている可能性があることは、注目に値する。今後、この血球集団の機能解析を通じて生体防御の個体発生的見解に新たな視点が導入されることが期待できるからである。

4編の参考論文は主論文の根幹をなす内容を含み、いずれも国際雑誌に掲載され高い評価を受けている。申請者に対する最終試験は、1月31日論文の口頭発表と質疑応答の形で行なわれ、満足すべき結果であった。したがって、審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格があると認める。