

学位論文題名

新しい遺伝子発現系を用いた骨髓ストローマ細胞株
MC3T3-G2/PA6の造血支持能の解析に関する研究

学位論文内容の要旨

すべての血液細胞は、幼若で多分化能を持つ造血幹細胞から増殖・分化して造られる。顆粒球コロニー刺激因子やエリスロポイエチンなどを始めとする多くのサイトカインが、この血液細胞の分化の過程に関与することが明らかにされてきたが、未分化な造血幹細胞の増殖メカニズムについては今なお不明な点が多い。造血幹細胞の増殖および分化は、骨髓の造血微小環境によってコントロールされており、その造血微小環境は造血支持能を有する間質のストローマ細胞によって構成されていると考えられている。骨髓のある限られた場所において造血微小環境は構成され、その場において造血幹細胞が自己複製を繰り返しながら各種血球細胞を生みだしている。したがって、その造血微小環境を解析することが造血幹細胞の増殖のメカニズムを解明する上で重要である。しかしながら、造血幹細胞とストローマ細胞の間では接触を介した複雑な細胞間細胞間相互作用が行われていること、造血幹細胞なるものの正体が未だ曖昧である上に推定されるその存在量が非常に少ないことなどから、その研究は難航している。多くの研究者によって、造血が行われている場である造血微小環境の解析が試みられているが、有力な解析方法が確立されておらず、ストローマ細胞が持つとされている造血支持能力の分子レベルでの把握は進んでいない。そこで、本研究では、まず、造血微小環境を解析することを考慮したいくつかの解析法について検討し、次に、実際に開発したその手法を用いて、あるストローマ細胞株が構成する造血微小環境の解析を行った。

具体的には、*in vitro*で数週間に渡って造血幹細胞を増殖維持させる能力を有するマウス間質細胞株MC3T3-G2/PA6 (PA6) に注目し、PA6細胞が持つ高い造血支持能を分子レベルで解析することで、造血幹細胞の増殖メカニズムを明らかにしたいと考えた。以前より、PA6細胞が造血幹細胞を維持するためには、造血幹細胞と直接接触している必要があることが明らかにされており、PA6細胞の高い造血支持能には膜結合型サイトカインであるstem cell factor (SCF) 以外の分子も関与することが示唆されていた。そこで、PA6細胞が持つ高い造血支持能を担っている機能分子の単離同定を、造血系細胞の増殖性という生物活性を指標に、発現クローニング法を用い

て行うこととした。特に、造血系細胞の増殖を支持するストローマ細胞側の細胞膜上の因子として、SCF以外の因子にどのような分子が存在するかを明らかにすることを目標とした。発現クローニング法としては、COS細胞を宿主としSimian virus 40をベースとした発現ベクターを用いる系が最も一般的であり、多くのサイトカインがこの系を用いてクローニングされている。しかしながら、造血細胞とストローマ細胞との相互作用に関与する膜因子を取得するという本研究の目的のためには、この系が必ずしも適しているとはいえない。すなわち、COS細胞の系は一過性の発現系であるために造血細胞との長期相互作用を観察しにくいこと、宿主が接着細胞であるためフローサイトメーターなどを用いた細胞表面分子の解析がしにくいことが挙げられる。そこで、まず、これらの問題点を克服するために、浮遊細胞を用いた安定な形質発現クローニング系の開発を行った。その結果、Namalwa KJM-1細胞を宿主とし、moloney murine leukemia virusのlong terminal repeatに存在するプロモーターと、Epstein-Barr virusのoriP配列を含む発現ベクターを用いる系を、本研究の目的に合った実用性の高い系として構築した。また、造血系細胞とストローマ細胞との複雑な細胞間細胞間相互作用を解析するために、ストローマ細胞から造血系細胞への細胞膜上の分子を介した直接的な増殖シグナルを検出するための系の開発も合わせて行った。その結果、c-fos転写調節領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーター系を用いた効率的な膜結合型増殖因子の活性の測定系を構築した。

これらの方法を用いることで、従来の方法では容易には解析が出来なかったいくつかの造血微小環境に関する現象を解明することが可能となった。すなわち、造血幹細胞の増殖を支えるストローマ側の細胞であるPA6細胞にもstem cell antigen-1 (Sca-1) 抗原が発現しており、この発現量はPA6細胞の造血支持能と相関することを明らかにした。PA6細胞が発現しているSca-1抗原はマウスアロ抗原Ly-6A.2であり、この分子がSCFと相乗的に作用して骨髄細胞の増殖を促進させる作用を有していることを明らかにした。PA6細胞依存的な増殖を示したNFS-60細胞株を造血幹細胞の代わりとして用い、その増殖性を指標に発現クローニングを行い、PA6細胞側の細胞膜上の造血増殖因子としてSCFとhepatocyte growth factor (HGF) を取得し、PA6細胞表面上には、SCFのみならずHGFも実際に造血に関与する機能分子として存在していることを明らかにした。以上のことから、ストローマ細胞株MC3T3-G2/PA6が構成する造血微小環境の重要な機能分子として、SCF以外にも、Sca-1やHGFが存在し、この細胞が持つ高い造血支持能の少なくとも一部にはこれら分子が関与しているという知見を得ることができた。本研究によって、造血幹細胞が自己複製を繰り返しながら各種血球細胞を生み出す場である造血微小環境の分子レベルでの理解が一步深まった。また、構築した発現クローニング系は、浮遊細胞を宿主として用いていること、安定な形質発現系であること、遺伝子の導入効率および発現量がCOS細胞を用いた系に匹敵することなどから、COS細胞を用いた一過性の発現系とは異なった特徴を有した実用性の高い系である。これまで解析が困難であった様々な生理現象への応用が可能である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 教 授 上 野 直 人
副 査 助 教 授 沢 田 均
副 査 助 教 授 渋 谷 浩 司

学位論文題名

新しい遺伝子発現系を用いた骨髓ストローマ細胞株 MC3T3-G2/PA6の造血支持能の解析に関する研究

造血幹細胞の増殖および分化は骨髓の造血微小環境によってコントロールされており、その造血微小環境は造血支持能を有する間質のストローマ細胞によって構成されていると考えられている。したがって、その造血微小環境の解析や、ストローマ細胞が持つとされている造血支持能力の分子レベルでの解析が、造血幹細胞の増殖のメカニズムを解明する上で重要であるが、それらを解析する有力な方法が確立されておらず、不明な点が多い。

本論文提出者は、造血が行われている場である造血微小環境を解析する方法と、造血微小環境を構成するストローマ細胞が有する増殖因子に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) 造血幹細胞とストローマ細胞との長期間にわたる相互作用の解析や、フローサイトメーターなどを用いた細胞表面分子の解析が容易な、浮遊細胞を用いた安定な形質発現クローニング系の開発を行い、浮遊細胞であるNamalwa KJM-1細胞を宿主とし、moloney murine leukemia virusのlong terminal repeatに存在するプロモーターと、Epstein-Barr virusのoriP配列を含む発現ベクターを用いる系を、実用性の高い発現クローニング系として構築した。

さらに、造血幹細胞とストローマ細胞との複雑な細胞-細胞間相互作用を解析するために、ストローマ細胞から造血幹細胞への細胞膜上の分子を介した直接的な増殖シグナルを検出するための系の開発も行い、c-fos遺伝子の転写調節領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレ

ポーター系を用いた、効率的な膜結合型増殖因子の活性の測定系を構築した。

(2) ストローマ細胞として、*in vitro*で数週間にわたって造血幹細胞を増殖維持させる能力を有するマウス間質細胞株MC3T3-G2/PA6 (PA6)に着目し、上記の開発した発現クローニング法を用いて、PA6細胞が持つ高い造血支持能を担っている機能分子の解析を行い、造血幹細胞の増殖を支えるストローマ側の細胞であるPA6細胞にも stem cell antigen-1 (Sca-1) 抗原が発現しており、その発現量はPA6細胞の造血支持能と相関することを明らかにした。PA6細胞が発現しているSca-1抗原はマウスアロ抗原Ly-6A.2であり、この分子が膜結合型サイトカインであるstem cell factor (SCF) と相乗的に作用して造血幹細胞の増殖を促進させる作用を有していることを明らかにした。

(3) ストローマ細胞であるPA6細胞に依存する増殖を示したNFS-60細胞株を造血幹細胞の代わりとして用い、その増殖性を指標にして発現クローニングを行い、PA6細胞膜上の造血増殖因子としてSCFとhepatocyte growth factor (HGF) を得、PA6細胞表面上にSCFに加えてHGFも造血に関与する機能分子として存在していることを明らかにした。

これらの結果は、ストローマ細胞株MC3T3-G2/PA6が構成する造血微小環境の重要な機能分子として、SCFに加えて、Sca-1やHGFが機能していることを示している。

以上の新知見およびそれを得るために用いた新研究技法は、造血幹細胞が自己複製を繰り返しながら各種血球細胞を生み出す場である造血微小環境の分子レベルでの理解にとどまらず、広範な生理現象の根幹をなす細胞-細胞間相互作用を解明する上で重要な寄与をなすものである。

審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。