

学 位 論 文 題 名

Expression of differentiation antigens and adhesion molecules on CD34⁺ cells in peripheral blood and bone marrow after chemotherapy followed by administration of granulocyte colony stimulating factor

(化学療法後顆粒球コロニー刺激因子を投与された末梢血および骨髓血中のCD34陽性細胞上の分化抗原および接着分子の発現)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

CD34分子は造血前駆・幹細胞関連抗原として知られ、種々の分化段階の造血前駆・幹細胞上での発現が確認されている。化学療法後の回復期や、完全寛解期の患者、平常時正常人に対しても、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を投与すると、CD34陽性細胞(CD34⁺)が末梢血中で増加することが知られている。これら末梢血に動員された造血前駆・幹細胞は、すでに臨床では自家あるいは同種造血幹細胞移植に利用され、骨髓由来造血幹細胞移植と同様の良好な成績を示しつつある。しかし、これらのCD34⁺の末梢血中での増加の機序については、未だ明らかではない。本研究では、CD34⁺の末梢血への移動におけるCD34⁺の分化とCD34⁺上の接着分子の関与を検討するため、化学療法後にG-CSFを投与した患者およびG-CSFを投与していない平常時正常人において、末梢血に移動したCD34⁺と骨髓に残るCD34⁺の分化抗原と接着分子の発現を検討した。

II. 対象と方法

悪性腫瘍患者7人に対し、化学療法後の白血球最低値時よりG-CSFを投与し、白血球数10000/ μ lまで回復した時点で、血液成分分離装置により計8回の末梢血幹細胞採取を行った。また正常volunteerおよび正常同胞骨髓ドナー計10人を正常対照群とした。各検体には、各分化抗原、接着分子に対する一次抗体およびphycoerythrin結合抗マウス免疫グロブリン(Ig)二次抗体を加え洗浄した。未結合の二次抗体の飽和洗浄後、Fluorescein isothiocyanate結合HPCA-2(抗CD34)抗体を加え、flow cytometerにてdual color解析を行った。各分化抗原、接着分子陽性率は、全CD34⁺中における、各々の陽性細胞の百分率とした。

患者群の末梢血幹細胞採取時の骨髓、末梢血または末梢血幹細胞採取液、正常対照群の骨髓血、末梢血について以下の測定を行った。

(1) 末梢血白血球数、骨髓有核細胞数および末梢血または骨髓血1 μ l中のCD34陽性細胞の絶対数。

(2) 末梢血幹細胞採取液または末梢血、骨髓血のCD34陽性細胞中の各分化抗原陽性細胞率。

(3) 末梢血幹細胞採取液または末梢血、骨髓血のCD34陽性細胞中の各接着分子陽性細胞率。

統計的有意差の検討はWilcoxon signed-ranks test および Mann-Whitney's U test にて行い、危険率 $p < 0.05$ を有意と判定した。

III. 結果

(1) 末梢血 1 枚中のCD34+絶対数は、患者群では正常対照群と比較して約9倍の増加を示した。一方、骨髓血 1 枚中のCD34+絶対数は、患者群、正常対照群間にて有意な差を認めなかった。

(2) 患者群、正常対照群内の末梢血CD34+・骨髓血CD34+の比較では、CD33、CD38、CD10陽性細胞率は、両群ともに有意な差を認めなかった。正常対照末梢血CD34+のHLA-DR陽性細胞率は骨髓血CD34+に比して低値であった。患者末梢血CD34+、骨髓血CD34+のCD33陽性細胞率は、正常対照に比較し、ともに高い傾向を示した。患者末梢血CD34+のCD10陽性細胞率は、正常対照末梢血CD34+と比較し、低値であった。患者末梢血CD34+のCD117陽性細胞率は、患者骨髓血CD34+および正常対照末梢血CD34+に比して低値であった。

(3) 正常対照骨髓血CD34+のCD11b、正常対照末梢血CD34+のCD62L、患者骨髓血CD34+および末梢血CD34+のCD11bを除き、測定したすべての接着分子は40%以上のCD34+上で発現が見られた。患者末梢血CD34+のCD49d陽性細胞率は骨髓血CD34+に比して少なく、正常対照群でも同様に末梢血CD34+は骨髓血CD34+に比して少ない傾向を示した。これらの末梢血CD34+と骨髓血CD34+間でのCD49d陽性細胞率の減少は、正常対照群に比して、患者群でより顕著であった。患者末梢血CD34+および骨髓血CD34+のCD11a陽性細胞率はともに、正常対照群と比べ各々高値であった。正常対照末梢血CD34+のCD11b陽性細胞率は、正常対照骨髓血CD34+および患者末梢血CD34+と比較して、高値であった。正常対照末梢血CD34+のCD62L陽性細胞率は、正常対照骨髓血CD34+および患者末梢血CD34+と比較して、低値であった。CD44、CD49e陽性細胞率は、末梢血、骨髓血間、患者群、正常対照群間ともに有意な差を認めなかった。

IV. 考察

患者末梢血1枚中のCD34+絶対数は正常対照群に比して、有意な増加を示したが、患者骨髓CD34+絶対数と比して僅かに少ない傾向を示した。この結果は、末梢血CD34+の顕著な増加が、骨髓よりの能動的な汲み出しには寄らず、CD34+の分化やCD34+上の接着分子の発現の減弱に起因するCD34+と骨髓間質細胞または細胞外基質との結合の解除が関与している可能性を示唆した。そのため、まず、本研究では化学療法後G-CSFを投与した患者の末梢血CD34+と骨髓血CD34+を検討した。

CD49dおよびCD117陽性細胞率は、患者末梢血CD34+では骨髓血CD34+に比して、有意に減少していた。次に、化学療法やG-CSFの投与の影響を評価するため、平常時正常人についても同様の検討を行った。CD49d陽性細胞率は、正常対照群においても末梢血CD34+では骨髓血CD34+に比し有意に低い傾向を示したが、その差は患者群に比し小さかった。これらの結果は、CD49dは平常時においても、CD34+の骨髓での定着あるいは末梢への移動に関与している可能性を示唆し、化学療法および／またはG-CSFの投与によるCD49dの発現の減弱が、より多くのCD34+を末梢へ動員している可能性を示唆した。他方、CD117陽性細胞率は、正常対照末梢血CD34+で骨髓血CD34+に比し少ない傾向は示されず、化学療法および／またはG-CSFの投与がCD117の発現の減弱を引き起こし、さらに、この発現の減弱がCD34+の末梢への移動に関与している可能性を示唆した。今後、末梢血に動員されたCD34+上のこれらの接着分子の発現を詳細に評価することにより、より効率的な末梢血幹細胞採取や採取タイミングの決定に利用しうると、考えられた。

V. 結語

1. CD49dを介した接着機構は、平常時におけるCD34+の骨髄での定着や末梢への移動に
関与し、化学療法および／またはG-CSFの投与は、CD49d発現をさらに減弱させ、
より多くのCD34+を末梢へ動員している可能性を示唆した。
2. 化学療法および／またはG-CSFの投与が、CD117の発現の減弱を引き起こし、さら
に、この発現の減弱がCD34+の末梢への移動に関与している可能性を示唆した。
3. 今後、末梢血に動員されたCD34+上のこれらの接着分子の発現を詳細に評価するこ
とにより、より効率的な末梢血幹細胞採取や採取タイミングの決定に利用しうると、
考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 細 川 眞澄男
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Expression of differentiation antigens and adhesion molecules on CD34⁺ cells in peripheral blood and bone marrow after chemotherapy followed by administration of granulocyte colony stimulating factor

(化学療法後顆粒球コロニー刺激因子を投与された末梢血および骨髓血中のCD34陽性細胞上の分化抗原および接着分子の発現)

化学療法後の回復期や完全寛解期の患者、平常時正常人に対して顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を投与するとCD34陽性細胞(CD34⁺)が末梢血中で増加することが知られている。これら末梢血に動員された造血前駆・幹細胞は、すでに臨床では自家あるいは同種造血幹細胞移植に利用され、骨髓由来造血幹細胞移植と同様の良好な成績を示しつつある。しかし、これらのCD34⁺の末梢血中での増加の機序については、未だ明らかではない。本研究では、CD34⁺の末梢血への移動におけるCD34⁺の分化とCD34⁺上の接着分子の関与を検討するため、化学療法後にG-CSFを投与した患者およびG-CSFを投与していない平常時正常人において末梢血に移動したCD34⁺と骨髓に残るCD34⁺の分化抗原と接着分子の発現を検討した。

患者群として、悪性腫瘍患者7人に対し化学療法後の白血球最低値時よりG-CSFを投与し、白血球数10000/ μ l以上まで回復した時点で、血液成分分離装置により、のべ8回の末梢血幹細胞採取を行った。また平常時正常人群は正常volunteerおよび正常同胞骨髓ドナー計10人であった。各検体は、各分化抗原および接着分子に対する抗体および抗CD34抗体を加え二重免疫染色を行い、flow cytometerにてdual color解析を行った。

末梢血1 μ l中のCD34⁺絶対数は、患者群では平常時正常人群と比較して約9倍の増加を示し、化学療法後にG-CSFを投与する事により、末梢血中にCD34⁺が増加していることが確認された。分化関連抗原の検討では、CD33陽性分画は患者群では骨髓、末梢血ともに平常時正常人群と比して多く、顆粒球系に分化したやや成熟した前駆細胞を多く含む事を示唆した。CD117陽性分画は患者群末梢血CD34⁺で骨髓CD34⁺に比して少なかった。しかし、平常時正常人群では末梢血CD34⁺と骨髓CD34⁺間では明らかな差は示され

ず、化学療法およびG-CSF投与後に末梢に動員されるCD34⁺において、CD117は接着分子として関与している可能性が示唆された。接着分子の検討では、CD49d陽性分画は、患者群、平常時正常人群ともに末梢血CD34⁺で少なかった。CD49dを介した接着機構は、CD34⁺の骨髓での定着や末梢への移動に関与している可能性が示唆された。今後、末梢血に動員されたCD34⁺上のこれらの接着分子の発現を詳細に評価することにより、より効率的な末梢血幹細胞採取に利用しうると考えられた。

口頭発表にあたり、第3内科今村助教授より今回検討した患者のControl群と考えられる化学療法非投与G-CSF単独投与患者についての検討と、*in vitro*でのG-CSFを添加した検討の有無についての質問があった。申請者は自らの他の検討結果よりG-CSF単独投与患者でも末梢血CD34⁺ではCD49d陽性分画が骨髓に比較して少ないこと、*in vitro*でのG-CSF添加培養後もCD34⁺中のCD49d発現陰性分画は増加しなかったという結果を示した。また、免疫研究所免疫病態部門の上出教授よりは、患者群末梢血CD34⁺でのL-selectin発現陽性分画の増加がCD34⁺の末梢へ移動に促進的に作用している可能性の有無と、末梢血造血前駆細胞を用いた時の臨床上の特徴に関する質問等があった。申請者は造血前駆細胞上のL-selectinと骨髓内の血管内皮細胞上に発現しているCD34分子について大阪大の宮坂教授らの否定的な検討結果を紹介したが、今回の結果はその議論を結論づけるには不十分である事、末梢血造血前駆細胞移植は骨髓移植に比べ造血回復が速やかであること等を回答した。さらに、癌研病理部門の細川教授からは末梢血CD34⁺でCD49dやCD117陽性分画が少ない機序と、その変化における化学療法やG-CSF投与の意義、実際の末梢血造血前駆細胞の臨床とそれらの接着分子発現の変化との関連等について質問があった。申請者はいずれの質問にも概ね妥当な回答をなし得たものと考えられた。最後に、主査の浅香教授より末梢血造血幹細胞を利用した治療は現在急速に発展しているが臨床応用が先行しており、基礎的機序の解明に関わる検討をさらに進めることにより、効率的な末梢血幹細胞採取方法や、より安全で確実な造血幹細胞移植法の開発がなされることを期待したいとのコメントがあった。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また大学院課程における研鑽や取得単位等も併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。