

学 位 論 文 題 名

ヒト末梢血 CD34陽性細胞の赤芽球系への
特異的分化誘導とその脱核機序に関する検討

学位論文内容の要旨

緒 言

ヒトを含むほとんどの哺乳類では成熟循環赤血球に核が存在しない。これは骨髓で赤芽球系細胞の成熟の終末分化で正色素性赤芽球が脱核するためである。これまで脱核機序についての報告はヒト以外の動物種の cdl line を用いたものが主流であった。これは、分化の進んだ正常赤芽球を分化段階を均一にして大量に集めることが極めて困難なためで、なかなか研究が進まない分野であった。今回本研究で正常ヒト赤芽球における脱核機序の検討を行うにあたり、分化段階の均一なヒト赤芽球を高純度で大量に回収するシステムを確立した。このシステムを用い、分化誘導される赤芽球系細胞の生物学的性状、細胞骨格阻害因子の脱核におよぼす影響を検討した。

材 料 と 方 法

健康成人に rG-CSF $5 \mu\text{g/kg}$ を 5 日間連日投与した後、血球分離装置を用い末梢血中より単核球を分離・採取し、比重遠心法、ナイロンウールによる付着細胞除去法、CD34 モノクローナル抗体・免疫磁ビーズ法を用いて純化 CD34 陽性細胞を得た。この細胞を 100U/ml rIL-3 ・ 100ng/ml rSCF ・ 4U/ml EP を含む液相血清含有培地を用い赤芽球への系特異的分化・増殖誘導を行った。純化 CD34 陽性細胞と液相培養後の細胞は、形態的観察の他に、FACSscan を用いたフローサイトメトリー法による解析を施行、造血前駆細胞の定量的解析には 2U/ml EP・ 50ng/ml rSCF ・ 50U/ml rIL-3 ・ 50U/ml rGM-CSF ・ 50U/ml rG-CSF を含むフィブリンクロット法を用いたコロニー形成法を行い検討した。

一方、脱核の始まる 12 日目の細胞を用い、サイトカイン (EP, rIL-3 , rSCF) 含有および無含有の液相無血清培地を作成し、脱核において血清に含まれるフィブロネクチンやサイトカインなどの影響を網状赤血球・裸核の経時的推移をみることで検討した。また、細胞骨格阻害因子として、サイトカラシン D・コルヒチン・ビンブラスチン (いずれも終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ で添加) を用い、脱核におけるアクチンフィラメントおよび微小管の役割について液相血清含有培地で同様に検討した。一方、赤芽球系前駆細胞に対する各細胞骨格阻害因子の影響の検討を CFUE を最も多く含む 8 日目の細胞を用い、液相血清含有培地およびフィブリンクロットによる半固形培地の培養で検討した。

結 果

1. ヒト CD34 陽性細胞の赤芽球系特異的分化増殖誘導

純化細胞は未熟な芽球系細胞からなり CD34 陽性率は 97.9%, 36% がコロニーを形成した。純化 CD34 陽性細胞を 12 日間液相血清含有培地で培養した時の総細胞増加倍率は 537 ± 175 倍であったが、この細胞は多染色赤芽球からなる系列・分化段階ともに均一な細胞集団で、 $91 \pm 4\%$ が赤芽球系に特異的な表面抗原である Gly A を発現、2.1% がコロニーを形成した。

2. in vitro での脱核の推移

液相培養後 12 日目の細胞を使用して血清含有培地で脱核の経時的推移について検討した。総細胞数は、培養を開始してから経時的に増加する一方、網状赤血球の比率も経時的に増加し $7.0 \pm 2.0\%$ から 4 日間で $28.5 \pm 4.6\%$ に増加。絶対数でみると 4 日間で 8.0 ± 1.2 倍に増加した。裸核についても同様の傾向を示した。

3. 脱核におけるサイトカインの関与

サイトカインの有無に関わらず 48 時間目までは網状赤血球・裸核とも増加を認めたが、48 時間目以降は減少に転じた。この際、総細胞数も減少に転じ、同時に生細胞率の急激な低下を認めたことから、これらの減少は混在する分裂可能な細胞が増殖不可能となり死滅したためと推測された。一方、無血清培地での網状赤血球および裸核の形態は血清含有培地と同じでありサイトカインの有無によっても差を認めなかった。

4. 脱核時の細胞骨格阻害因子の効果

サイトカラシン D を用いた検討では、網状赤血球・裸核とも有意に増加が抑制された。一方、コルヒチン・ビンブラスチンを用いた同様の検討を加えたところ添加後 2 日目まで網状赤血球と裸核の経時的な増加を認めたが、以後は減少に転じた。

5. 赤芽球系幹細胞における細胞骨格阻害因子の効果

8 日目の細胞を用い細胞骨格阻害因子につき検討した。フィブリンクロット法では対照群で 50% 以上のコロニーを形成したのに対し添加群ではいずれも 8 個以上の赤芽球から成る赤芽球系コロニーは形成されなかった。同様に液相血清含有培地での検討では、対照群で総細胞数の増加を認めたが、添加群ではいずれも総細胞数の増加は完全に抑制された。形態的観察ではサイトカラシン D 添加群は多核細胞を認め、コルヒチンやビンブラスチン添加群では、核が凝縮した細胞や中興核細胞、アポトーシス様の変性細胞を多数認めた。

考 察

本検討では、ヒトの正常赤芽球を in vitro 増殖により回収する方法を考案、健康人から採取した高純度の末梢血 CD34 陽性細胞を EP・SCF・IL-3 を用いて赤血球系特異的に分化・増殖させることで、分化段階が均一なヒトの正常赤芽球系細胞を大量に入手することが可能となった。この細胞は培養日数の経過とともに分化が進行し、正常ヒト骨髓で認められる赤芽球系細胞や網状赤血球と形態上同一の分化過程を示した。この in vitro での赤芽球系特異的分化増殖システムを用い、正常ヒト赤芽球の脱核過程の in vitro での細胞生物学的検討を行った。

高純度の赤芽球系細胞で脱核を認め、無血清培地においてサイトカインの有無に関わらず脱核が進行したことから、ヒト正常性赤芽球が脱核する際にサイトカインやフィブロネクチン、マクロファージなどの食細胞をはじめとした非赤芽球系細胞の存在が不要であることを明らかにした。

さらに、アクチンフィラメント阻害因子であるサイトカラシン D が脱核を阻害することからアクチンフィラメントが脱核に必要であると考えた。一方、微小管阻害因子であるコルヒチンおよびビンブラスチンの添加によって脱核の進行を認めたが、2 日目以降は網状赤血球数や裸核数の減少を認めた。この理由は、赤芽球系幹細胞を用いた検討で細胞分裂が完全に抑制されていることから、正常性赤芽球が減少するためと考えられた。このことは微小管の存在は脱核の必要条件とならないことを示唆している。

結 語

1. 健康人から採取および純化した末梢血 CD34 陽性細胞から EP・SCF・IL-3 を用いて in vitro で赤血球系特異的に分化・増殖誘導し、分化段階が均一なヒトの赤芽球系細胞を高純度で大量に入手するシステムを開発した。

2. この細胞培養日数の経過とともに分化が進行し 14 日目には多数の網状赤血球の出現を認めた。培養の過程で認められる細胞は、正常ヒト骨髄で認められる赤芽球系細胞や網状赤血球と形態上同一の分化過程を示した。
3. 高純度の赤芽球系細胞を用いた無血清培養での結果から、ヒト赤芽球における脱核にはサイトカインやフィブロネクチンおよびマクロファージなどの非赤芽球系細胞の存在が不要であることが判明した。
4. 細胞骨格阻害因子の検討から、アクチンフィラメントの存在が脱核に必要なものであるが微小管の存在は必要条件とならないことが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

ヒト末梢血 CD34陽性細胞の赤芽球系への 特異的分化誘導とその脱核機序に関する検討

ヒトを含むほとんどの哺乳類では成熟循環赤血球に核が存在しない。これは骨髄で赤芽球系細胞の成熟の終末分化で正染性赤芽球が脱核するためである。これまで脱核機序についての報告はヒト以外の動物種の細胞株を用いたものが主であった。これは、分化の進んだ正常赤芽球を分化段階を均一にして大量に集めることが極めて困難なためであった。そこで申請者は、分化段階の均一な正常ヒト赤芽球を高純度で大量に回収するシステムを、正常ヒト末梢血 CD34 陽性細胞の赤芽球系への特異的分化誘導により開発した。このシステムで得られる細胞を解析するとともに、回収された細胞を用いて正常ヒト赤芽球における脱核機序を検討することとした。健常成人に G-CSF を投与した後、血球分離装置を用い末梢血中より単核球を分離・採取し、比重遠心法、ナイロンウールによる付着細胞除去法、CD34 モノクローナル抗体・免疫磁性ビーズ法、ペプチド法を用いて純化 CD34 陽性細胞を得た。この細胞を IL-3・SCF・EPO を含む液相血清含有培地を用い赤芽球への系特異的分化・増殖誘導を行った。一方、脱核の始まる 12 日目の細胞を用い、サイトカイン (IL-3・SCF・EPO) 含有および無含有の液相無血清培地を作成し、血清のフィブロネクチンやサイトカインなどが脱核におよぼす影響を検討した。また、細胞骨格阻害因子として、微小管阻害因子であるコルヒチンおよびビンブラスチン、またアクチンフィラメント阻害因子であるサイトカラシンDを用い、脱核における微小管およびアクチンフィラメントの役割を検討した。さらに、赤芽球系前駆細胞の増殖に対する各細胞骨格阻害因子の影響を CFU-E を最も多く含む 8 日目の細胞を用い、液相血清含有培地およびフィブリンクロットによる半固形培地で検討した。その結果、純化 CD34 陽性細胞を 12 日間液相血清含有培地で培養した時の総細胞増加率は 537 倍で、主に多染性赤芽球からなる系列・分化段階ともに均一な細胞集団であり、91%が赤芽球系に特異的な表面抗原である GlyA を発現していた。14 日目には形態的に正染性赤芽球・網状赤血球・裸核を主体とする細胞群に分化した。一方、脱核機序の検討では、まず無血清培地を用いた検討でサイトカインの有無に関わらず網状赤血球・裸核とも経時的に増加を認めたことから、血清中のフィブロネクチンやサイトカインは脱核において必須の因子ではないことが示された。また、サイトカラシンDを用いた検討では、網状赤血球・裸核とも増加が抑制されこの抑制はサイトカラシンDの除去により解除されたことから、アクチンフィラメントが脱核に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、コル

ヒチンおよびビンブラスチンを用い同様の検討を加えたところ添加後 2 日目まで網状赤血球と裸核の経時的な増加を認めた。以後はプラトーに達したが、同時に正染性赤芽球の増加が抑制されていたことから、正染性赤芽球の供給が阻害されているために脱核の進行が抑えられたと考えられ、微小管の存在は脱核に必須ではないと考えられた。また、8 日目の細胞を用いた検討で、いずれの阻害因子の添加においても、フィブリンクロット法では CFU-E コロニーは形成されず、液相血清含有培地では総細胞数の増加は完全に抑制された。これらの阻害因子はいずれも細胞分裂を完全に抑制していると考えられた。以上の結果より、健常人から採取した高純度の末梢血 CD34 陽性細胞を IL-3・SCF・EPO を用いて赤血球系特異的に分化・増殖させることで、分化段階が均一なヒトの正常赤芽球系細胞を大量に入手することが可能となったことが示された。また、ヒト正染性赤芽球の脱核の際、サイトカインやフィブロネクチンなどの存在が不要であること、高純度の赤芽球系細胞であるにもかかわらず脱核を認めマクロファージなどの非赤芽球系細胞の存在は不要であることが明らかとなった。一方、細胞分裂においてはアクチンフィラメント、微小管はともに必須であるが、脱核においてはアクチンフィラメントの重合が主要な役割を果たしており、微小管形成は脱核に必須ではないと考えられた。

試問に際し、吉木教授から回収細胞中の GlyA 陰性細胞の種類、微小管阻害因子添加時に増加が次第にプラトーになる理由、脱核時のアクチンフィラメントの分布、既報の脱核機序との相違点について質問があった。ついで浅香教授から脱核に関するシグナルの発現時期、種による脱核機序の相違、脱核の意義について質問があった。さらに小池教授から種による脱核の有無の理由、IL-3・SCF・EPO を選択した理由について質問があった。最後に第 3 内科の武蔵講師から細胞分裂と脱核におけるアクチンフィラメントの動態の相違について質問があった。いずれの質問に対しても申請者は実験結果や文献を引用し概ね適切な回答をした。

この論文は、正常ヒト赤芽球を高純度で大量に入手可能となるシステムを確立したこと、およびこれまで定説のなかったヒト赤芽球の脱核について検討を加えたことで高く評価され、今後の脱核機序のさらなる解析と脱核の意義の解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位など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。