

学 位 論 文 題 名

Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells : a role in homing of progenitor cells

(造血前駆細胞が選択的に骨髄へ定着する機序に関する研究)

学位論文内容の要旨

(緒言) 造血幹細胞移植の際に、造血幹細胞は骨髄に特異的に定着して増殖分化することが知られているが、その機序に関しては不明である。造血幹細胞の骨髄への定着機構は、白血球が炎症部位に浸潤する機構と同様に多段階のステップを踏むと考えられている。従って定着機序を明らかにするためには、各段階毎に検討することが必要と考えられる。はじめに造血幹細胞は、血管内でローリングし、次に血管内皮細胞から分泌されるケモカインによって活性化される接着因子を介して血管内皮細胞に強固に接着する。次いで血管外へ遊走し、骨髄組織へ定着すると考えられる。

造血前駆細胞が骨髄血管内皮細胞に接着し、すり抜ける機構を解明することを目的として、まず初めにマウス由来の骨髄と肺の血管内皮細胞株及び骨髄線維芽細胞株を樹立した。次に骨髄由来の線維芽細胞が造血前駆細胞の遊走刺激因子を産生していることを明らかにし、その遊走刺激因子が存在する条件下でのtransendothelial migration assay法を確立した。血管内皮細胞による造血前駆細胞に対する遊走刺激因子の産生と、造血前駆細胞のtransendothelial migrationについて、骨髄と肺の血管内皮細胞の違いを比較検討した。

(材料と方法)

1) マウス骨髄由来血管内皮細胞、線維芽細胞及び肺血管内皮細胞株の樹立

SV40 T 抗原 及びネオマイシン耐性遺伝子を含むベクターをリポフェクション法によりBDF-1マウス骨髄支持細胞に導入した。希釈培養によりクローニングし、14個の細胞株 (STR-n) を樹立した。肺血管内皮細胞株であるLE1にSV40 T 抗原を含むベクターを同様に導入して樹立した (LE1SVO)。

2) 骨髄血管内皮細胞及び線維芽細胞株の特徴

SV40 T 抗原の発現は免疫染色で、ファクターVIII (F.VIII) の発現及びLDLの取り込みは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。接着因子の発現は、FACSを用いて解析した。

3) 造血前駆細胞の純化

BDF-1マウスに150mg/kgの5-FUを静脈内に投与し、2日後に大腿骨から骨髄液を採取した。その単核球のうちT細胞、B細胞、顆粒球とマクロファージの分化抗原を発現している細胞をビーズを用いて除去した細胞を、Lineage negative (Lin-) 細胞分画として用いた。

4) 遊走刺激活性の検討

Transwell chamberの下層に600 μ lのSTR-2細胞株の培養上清あるいは培養液を入れ、上室には100 μ lの細胞浮遊液 (1×10^5) を入れ、4時間培養した後に、下室に移動した細胞を位相差顕微鏡を用いて計測した。

5) transendothelial migration assay

下室にSTR-2細胞株の培養上清が存在する条件で、上室にFDCP-2細胞を入れた。上室のメンブレンフィルター上に血管内皮細胞を単層培養し、4時間培養後下室に移動した細胞数

を位相差顕微鏡を用いて計測した。Lin-細胞を用いたtransendothelial migration assayでは下層に移動した細胞を用いてコロニーアッセイを施行しCFU-GMコロニー数を計測した。

6) RT-PCR

TRIzolを用いて、各細胞株のtotal RNAを抽出し、DNase I Amp Gradeを用いてgenomic DNAを除去したうえで、AMLV reverse transcriptaseを用いてcDNAを作成した。Taq polymeraseを用いて β -actin及びSDF-1のmRNAの発現をRT-PCRを施行して確認した。

(結果)

1) 樹立した細胞株の特徴

STR-2、STR-4、STR-10、STR-12及びLE1SVOの細胞の培養中の形態は、紡錘形で、明らかな差は認められなかった。STR-4、STR-10、STR-12の細胞株は、Mac-1陰性、F.VIII陽性、LDLの取り込みが認められ、骨髓血管内皮細胞株と同定した。STR-2は、Mac-1陰性、F.VIII陰性、LDLの取り込みが認められず、骨髓線維芽細胞株と同定した。恒常的にSTR-4、STR-10、STR-12の細胞株は、VCAM-1のみを発現し、ICAM-1、E-selectin、L-selectinは発現していなかった。IL-1 β によりE-selectin、L-selectinは若干発現されたが、ICAM-1は発現されなかった。LE1SVOの細胞株は、VCAM-1、ICAM-1、E-selectin、L-selectinのいずれも発現していなかった。

2) STR-2細胞株の培養上清の遊走刺激活性の検討

STR-2細胞株の培養上清のFDCP-2細胞に対する遊走刺激活性をcheckerboard analysisにて解析した。

FDCP-2細胞は、下室のSTR-2細胞株の培養上清の濃度依存的に遊走が認められた。さらに、上室のSTR-2細胞株の培養上清の濃度が下室の濃度と同じ場合にも遊走が認められたことから、STR-2細胞株の培養上清には、chemotactic factorの他にrandom motility stimulating factorの存在が示唆された。STR-2細胞株の培養上清のchemotactic factorは、抗SDF-1抗体によって濃度依存的に抑制された。STR-2細胞株及び骨髓血管内皮細胞には、SDF-1の発現が認められたが、LE1SVOの細胞株では認められなかった。これらの結果から、STR-2細胞株の培養上清のchemotactic factorは、主にSDF-1によるものと考えられた。

3) FDCP-2細胞のtransendothelial migration

上室に投与したFDCP-2細胞が下室に移動した細胞数を計測すると、単層培養した細胞がSTR-4、STR-10、及びSTR-12の場合にはtransendothelial migrationが認められたが、STR-2及びLE1SVOの場合には認められなかった。FDCP-2細胞のtransendothelial migrationは、抗VCAM-1抗体あるいは抗VLA-4抗体で抑制されたが、抗ICAM-1抗体、抗E-selectin抗体あるいはコントロールラット抗体では抑制されなかった。抗SDF-1抗体では濃度依存的に抑制効果が認められた。これらの所見から、造血前駆細胞のtransendothelial migrationには、SDF-1とVCAM-1/VLA-4が必要であることが示唆された。

4) 正常造血前駆細胞のtransendothelial migration

Lin-細胞を用いてCFU-GMのtransendothelial migration assayを施行すると、CFU-GMはSTR-4、STR-10、及びSTR-12の場合にはtransendothelial migrationが認められたが、LE1SVOの場合には認められなかった。このtransendothelial migrationは、抗VCAM-1抗体あるいは抗VLA-4抗体で抑制された。抗ICAM-1抗体、抗E-selectin抗体あるいはコントロールラット抗体では抑制されなかった。抗SDF-1抗体では濃度依存的に抑制効果が認められた。

(考案) VCAM-1が肺血管内皮細胞には発現されてなく骨髓血管内皮細胞にのみ発現されていたとする著者の成績は、免疫組織学的検討を行った、1996年のSchweitzer等の報告に支持されており、骨髓の血管内皮細胞のみがVCAM-1を恒常的に発現していることが骨髓への定着に重要な役割を果たしていると考えられた。しかもVCAM-1は、造血前駆細胞のVLA-4と協同して、transendothelial migrationに必要と考えられた。さらに、骨髓線維芽細胞株は、SDF-1を含む遊走刺激因子を分泌して、造血前駆細胞のtransendothelial migrationを誘導していると考えられる。実際に抗SDF-1抗体によってFDCP-2細胞のtransendothelial migrationが抑制されたことは、SDF-1が造血前駆細胞のtransendothelial migrationに必要であ

ることを示唆する。

この骨髓血管内皮細胞株及びtransendothelial migration assay法を用いることにより造血微小環境の役割をさらに解明できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells : a role in homing of progenitor cells

(造血前駆細胞が選択的に骨髄へ定着する機序に関する研究)

造血前駆細胞が、骨髄血管内皮細胞に接着し、すり抜ける機構を解明することを目的として、まず初めにマウス由来の骨髄と肺の血管内皮細胞株及び骨髄線維芽細胞株を樹立した。次に骨髄由来の線維芽細胞が造血前駆細胞のケモアトラクタントを産生していることを明らかにし、下室にそのケモアトラクタントが存在する条件でのtransendothelial migration assay法を確立した。骨髄血管内皮細胞は、接着因子VCAM-1を発現していたが、肺血管内皮細胞は発現していなかった。この所見は、1996年のSchweitzer等の報告に支持されており、骨髄の血管内皮細胞のみがVCAM-1を恒常的に発現していることが骨髄への定着に重要な役割を果たしていると考えられた。骨髄線維芽細胞は、造血前駆細胞を骨髄へ引き付け、骨髄血管内皮細胞上でローリングした後の造血前駆細胞の接着因子を活性化させ得るSDF-1を含むケモアトラクタントを分泌していた。抗SDF-1抗体は、造血前駆細胞の細胞株であるFDCP-2のtransendothelial migrationを抑制した。VLA-4を発現しているFDCP-2及び正常造血前駆細胞は、骨髄血管内皮細胞をすり抜けたが、肺血管内皮細胞をすり抜けることはできなかった。抗VCAM-1抗体及び抗VLA-4抗体は、FDCP-2及び正常造血前駆細胞のtransendothelial migrationを抑制した。これらの所見から、造血前駆細胞のtransendothelial migrationは骨髄血管内皮細胞に特徴的であり、VCAM-1/VLA-4とSDF-1が造血前駆細胞の骨髄へのホーミングに重要な役割を果たしていると考えられた。

公開発表にあたって、副査の第2内科小池教授から、肝臓の血管内皮細胞の場合の接着因子の発現について質問があった。申請者は、マウスの肝臓の血管内皮細胞を検討すると、VCAM-1が発現されていることが認められており、マウスの肝臓ではヒトと違い造血を支持する臓器として考えてよいと思われると答えた。次に、造血組織でのみVCAM-1が発現される機構についてはどのように考えられるのかという質問があった。申請者は、インテグリンをノックアウトしたマウスを検討すると、胎児期から出生時に脾臓、肝臓から骨髄へ造血の場が変わるのが抑制されるという報告があることより、発生の段階で規定さ

れていることが推定されると答えた。続いて、造血幹細胞が骨髓から末梢血に動員される機構についての質問があった。申請者は、造血幹細胞の運動能を高める因子が重要な役割を果たしている可能性があるかと答えた。次に副査の加齢制御医学今村教授から、SDF-1あるいはその抗体が造血幹細胞の分化と関係についての質問があった。申請者は、SDF-1はB細胞のケモアトラクタントであるという報告や、SDF-1に対する抗体は、CD34陽性細胞に発現されているという報告があり、造血幹細胞及び分化した細胞で発現されていることが確認されているが具体的にどの細胞レベルで発現しているかについては明らかではないと答えた。続いて、Lineage negative 細胞を用いて、CFU-GMコロニーで検討しているが、他のコロニー（CFU-Mix、BFU-E、など）は、検討しているかという質問があった。申請者は、検討したのはCFU-GMコロニーだけであると答えた。最後に、主査の第1病理吉木教授から、接着因子の発現はサイトカインによって発現が増強するかという質問があった。申請者は、E-selectinはIL-1 β によって発現が増強したが、VCAM-1は恒常的に発現されていてIL-1 β によって発現は増強されなかったと答えた。次に、培養による影響でVCAM-1が発現されたのではないかという質問に対して、申請者は、ヒトの系で、免疫組織学的に恒常的に発現されていると報告されていることから、マウスでも同様のことが言えるのではないかと推測されると答えた。続いて、SDF-1が他の臓器で発現されていないのかという質問に対して、申請者は、1993年のScienceによると、脳、肺、肝、腎など多臓器で発現されていること、ただその臓器のどの細胞が発現しているかについては明らかではない、また機能については、SDF-1のノックアウトマウスを検討すると半数以上が出生できずに死亡し、残りも出生後1時間以内に死亡していることと、心室中隔の心内膜が欠損していたという報告があり、骨髓以外の多くの臓器での機能に関わっていると考えられるが、現在のところまだ明らかになっていないことが多いと答えた。さらに、この実験結果がSDF-1が欠損している疾患に応用できるかという質問に対して、申請者は、SDF-1が欠損している疾患があれば、遺伝子治療も考慮できる可能性があるかと答えた。

本研究は、今後 造血微小環境の役割を解明するのに役に立つことが期待されるため、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。