



Title	Stromal Cell CD9 Regulates Differentiation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells
Author(s)	青山, 圭介
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41742
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	あお やま けい すけ 青 山 圭 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 2 7 2 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Stromal Cell CD 9 Regulates Differentiation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. (ストローマ細胞膜蛋白 CD 9 による造血幹細胞/前駆細胞の分化制御)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 金倉 讓

論文内容の要旨

【目的】

血液細胞の産生は、骨髓微小環境中に存在する多くの分子により制御されており、この造血調節機構の破綻は種々のリンパ・血液疾患の一因となり得ると考えられている。また、造血制御機構の解明は造血幹細胞移植や遺伝子治療の分野において幅広い臨床応用が期待できる。

CD 9 は膜 4 回貫通型蛋白で tetraspanfamily に属する。マウス造血組織において、CD 9 は骨髓球前駆細胞・好中球や血小板の血液細胞のみならずストローマ細胞にも発現している。既に我々は、抗マウス CD 9 抗体 KMC8.8 を Dexter 長期骨髓培養に添加すると、骨髓球系細胞産生が抑制されることを明らかにした。CD 9 は細胞接着や血小板凝集を調節することが知られているが、正常造血調節作用を有することは新しい知見である。この CD 9 を介する造血制御機構を明らかにすることは、リンパ・造血異常の成因や病態の解明や造血幹細胞体外増幅法確立に寄与すると考えられる。本研究では、多能性幹細胞株 EML-C 1 と骨髓ストローマ細胞株 MS-5 の共培養系を用いて、CD 9 の造血幹細胞/前駆細胞の増殖・分化に及ぼす影響とその作用機序を解析した。

【方法ならびに結果】

1. EML-C 1 / MS-5 共培養系の確立

EML-C 1 細胞は、MS-5 ストローマ細胞上 (10ng/mL stem cell factor 存在下) で増殖可能であり、またリンパ球系・赤芽球系・骨髓球系への分化能も維持されていた。

2. EML-C 1 / MS-5 共培養系への抗マウス CD 9 抗体 KMC8.8 添加による影響

KMC8.8 添加により、EML-C 1 細胞は MS-5 細胞層の下に潜り込み cobblestone appearance と呼ばれる未分化な造血幹細胞に特徴的な増殖形態を示した。このとき元々 EML-C 1 細胞表面に認められた TER119 (赤芽球系マーカー) が陰性化し、CD45RA (リンパ球系マーカー) の発現の減弱が認められた。Mac-1 (骨髓球系マーカー) は KMC8.8 添加の有無に関わらず常に陰性だった。さらに、KMC8.8 存在下での MS-5 細胞との共培養後の EML-C 1 細胞は CFU-Blast (芽球コロニー) 形成能を示し、低い BFU-E (赤芽球前駆細胞コロニー) 形成能を示した。よって、EML-C 1 / MS-5 共培養系への KMC8.8 添加により EML-C 1 細胞の自発的分化が抑制されると考えられた。

3. EML-C 1 / MS-5 間の細胞接着に及ぼす抗マウス CD 9 抗体 KMC8.8 の影響

KMC8.8を添加することにより EML-C 1 / MS-5 間の細胞接着が約 2 倍に増強された。この細胞接着増強は MS-5 細胞を KMC8.8 で処理した場合にのみ認められ、MS-5 細胞上の CD9 分子が KMC8.8 添加による細胞接着増強に重要であると考えられた。また、この細胞接着増強は既知の接着分子 (CD44、VLA-4、VLA-5、LFA-1、VCAM-1、 β 1 インテグリン) に対する阻害抗体では抑制されなかった。

4. ストローマ細胞上で CD9 と会合する 100kD 蛋白

CD9 はじめ tetraspanfamily に属する分子は、種々の膜蛋白と会合することによりその機能を調節することが知られている。MS-5 細胞を CHAPS で可溶化し CD9 と会合する蛋白を免疫沈降法にて解析した。MS-5 細胞上で CD9 は β 1 インテグリンと未知の分子 100kD 蛋白と会合していた。さらに、この 100kD 蛋白について以下の結果を得た。(1) MS-5 細胞を KMC8.8 で処理すると 100kD 蛋白と CD9 の会合が 2.7 倍に増加した。(2) 100kD 蛋白と CD9 の会合は 4 種のストローマ細胞株 (EML-C 1 細胞との細胞接着が KMC8.8 により増強される) では共通して認められたが、線維芽細胞株 NIH 3 T3 (EML-C 1 細胞との細胞接着が KMC8.8 により増強されない) では認められなかった。よって、100kD 蛋白が CD9 を介した細胞接着増強に関わっていると考えられた。

【総括】

本研究では、骨髄ストローマ細胞上 CD9 分子が造血幹細胞の分化やストローマ細胞/造血幹細胞接着を調節することを明らかにした。さらに、CD9 と会合するストローマ細胞膜蛋白の 100kD 蛋白がストローマ細胞/造血幹細胞接着に関わっている可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

造血幹細胞の分化・増殖は骨髄微小環境でストローマ細胞の産生するサイトカインや直接的接触により正確に制御されている。とくに、in vitro において造血幹細胞を維持、増幅する方法は造血幹細胞移植や遺伝子治療の分野で、幅広い臨床応用が期待されているが、現在まで確立されていない。造血幹細胞の増殖・分化制御における CD9 の役割についてはほとんど知見がなかったが、本研究では、骨髄ストローマ細胞上の CD9 が直接的接触を介して、造血幹細胞の分化を抑制していることを初めて明らかにした。さらにストローマ細胞上で CD9 が会合する蛋白について解析し、従来知られていなかった 100kD の会合蛋白がその機能に関与していることを示した。今後さらに、本研究により注目される 100kD 蛋白を解析することにより、CD9 を介する造血幹細胞分化制御のメカニズムが明らかにされるだけでなく、造血幹細胞体外増幅時の細胞分化制御という難問解決の糸口となることが期待できる。よって、本研究は学位の授与に値すると考えられる。