Osaka University Knowledge Archive

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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	青山圭介（あおやまけいすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15272　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CD9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　　譲

論文内容の要旨

【目的】

血液細胞の産生は、骨髄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。

CD9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、CD9は骨髄球前駆細胞・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CD9抗体KMC8.8をDexter長期骨髄培養に添加すると、骨髄球系細胞産生が抑制されることを明らかにした。CD9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CD9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－C1と骨髄ストローマ細胞株MS－5の共培養系を用いて、CD9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－C1／MS－5共培養系の確立

EML－C1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・骨髄球系への分化能も維持されていた。

2．EML－C1／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cobblestoneappearance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（骨髄球系マーカー）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CD9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、β1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β1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NIH3T3（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。