

Title	T前駆細胞の胎児胸腺への侵入と分化における接着分子の役割に関する研究
Author(s)	川上, 直人
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42287
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	川上 置人
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 16158 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	T前駆細胞の胎児胸腺への侵入と分化における接着分子の役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 前田 正知 教授 真弓 忠範 教授 岡部 勝

論文内容の要旨

免疫系で中枢的な役割を果たしているT細胞は血球系幹細胞に由来し、胸腺内で分化・増殖することが知られている。マウスでは大動脈・生殖隆起・中腎領域で発生した血球系幹細胞は、胎児肝臓を経て胎児胸腺に移入すると考えられている。この移入過程ではサイトカインやケモカインなどの可溶性因子と共に、様々な接着分子が関与していると考えられている。

これまでに行われてきた胸腺再構築実験では、フローサイトメトリーによる解析が中心であったために、解析には一定数以上の細胞を必要とした。このため、例えば血球系幹細胞の胸腺への移入過程など、ごく少数の細胞のみが関与しているT細胞分化の初期過程を解析するには困難が伴う。また、細胞の分布や動態を解析する実験には骨髄移植法が広く用いられてきた。この場合にも、ドナー由来の細胞と宿主由来の細胞を区別するために、Ly-5やThy-1などのアロタイプマーカー抗原に対する免疫組織化学染色が必要であった。

オワンクラゲより単離されたGreen Fluorescence Protein (GFP) は緑色の蛍光を発する。岡部らによって作製されたGFPトランスジェニックマウス(GFPマウス)は、EGFP (enhanced GFP) をトランスジーンしたマウスである。このマウスは、リンパ球を始めとする多くの細胞がGFP陽性である。本研究ではGFPマウス胎児肝臓または成マウス骨髄由来の血球系幹細胞を用いて、胸腺再構築実験を行った。この実験系では、血球系幹細胞の胸腺への移入過程を、GFPの蛍光を検出することにより視覚的に捕えることが可能である。

まず最初にGFPマウスとその遺伝的背景であるC57BL/6マウスの免疫能を比較した。胸腺および脾臓細胞のCD4、CD8発現パターン、脾臓細胞のB220発現パターン、BALB/cマウスをstimulatorとした混合リンパ球反応、抗CD3抗体刺激による抗原非特異的な脾臓T細胞増殖応答、卵白アルブミンに対する抗体産生能を検討した結果、GFPマウスとC57BL/6とは同等であった。このことから、GFPマウスの血球系幹細胞をもちいて胸腺再構築実験を行なった場合、正常マウスと同様の分化過程が解析できると考えられた。

GFPマウスの胎児肝臓および成マウス骨髄中の細胞を、フローサイトメーターにより解析したところ、GFP陽性細胞の大部分はc-kit陽性であった。c-kitは未分化な細胞に発現しているため、これらの組織に含まれるGFP陽性細胞は、血球系幹細胞であると考えられる。またc-kit陽性細胞は、インテグリン $\alpha 4$ とCD44を高発現しており、これらの接着分子が血球系幹細胞の胸腺移入に関与している可能性が推測された。

胎児肝臓または成マウス骨髄由来の血球系幹細胞をハンギングドロップ培養で胎児胸腺に移入した。ハンギングド

ロップ終了時には、すでに胸腺内に GFP 陽性細胞が存在していた。これらの GFP 陽性細胞は培養を継続すると、胸腺内で増殖した。さらに、CD44、CD25、CD24、CD 4、CD 8 の発現を指標に GFP 陽性細胞の分化を確認したところ、移入した血球系幹細胞は T 細胞系列へと分化していることが示された。

血球系細胞の血管外遊走やリンパ球のホーミングに接着分子が重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、接着分子に対する抗体を添加しその機能を阻害した場合、血球系幹細胞の胸腺移入に与える影響を検討した。抗 CD44 モノクローナル抗体をハンギングドロップ培養に添加すると、GFP 陽性細胞の胎児胸腺への移入が阻害され、胸腺ローブ表面および被膜直下に付着するように分布した。免疫染色の結果、これらの細胞は CD44 陽性であった。この結果は、血球系幹細胞として胎児肝細胞、成マウス骨髄を用いたいずれの場合にも共通であった。CD44 のリガンドであるヒアルロン酸を競合的阻害物質として加えた場合にも、ヒアルロン酸の濃度依存的に移入の阻害が見られ、高濃度のヒアルロン酸添加では抗 CD44 モノクローナル抗体の場合と同程度の移入の阻害が見られた。また、胸腺ローブに発現しているヒアルロン酸をヒアルロニダーゼ処理で分解した場合にも同様に移入の阻害が見られた。

次に、抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体を培養系に添加した。その結果、GFP 陽性細胞の胸腺への付着が阻害され、胸腺ローブ内に GFP 陽性細胞はほとんど認められなくなった。また、インテグリン $\alpha 4$ のリガンドである VCAM-1 に対するモノクローナル抗体や、インテグリン $\alpha 4$ とヘテロダイマーを形成するインテグリン $\beta 1$ に対するモノクローナル抗体を添加した場合にも、血球系幹細胞の胸腺への付着が阻害された。これらの結果も、胎児肝細胞と成マウス骨髄で同様であった。

さらに抗インテグリン $\alpha 6$ 抗体を添加した場合、胎児肝細胞の場合には阻害が見られなかったのに対して、成マウス骨髄細胞の場合には移入が阻害された。また抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体では胎児肝臓の場合にのみ移入阻害が見られた。一方、抗インテグリン $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ 抗体、抗 LFA-1 抗体、抗 Mac-1 抗体では阻害は認められなかった。

以上のことから、GFP マウス胎児肝臓または成マウス骨髄由来の血球系幹細胞を用いた胸腺再構築実験により、血球系幹細胞の胸腺移入を視覚化することができた。この実験系で、移入した血球系幹細胞は T 細胞系列に分化することが、細胞表面分子の解析より示された。血球系幹細胞を移入する際に、接着分子に対する抗体を添加して、その機能を阻害した場合の影響を検討した。その結果、胎児肝臓および成マウス骨髄の血球系幹細胞はインテグリン $\alpha 4$ $\beta 1$ と VCAM-1 の相互作用により胸腺ローブに付着し、その後 CD44 とヒアルロン酸の働きにより胸腺内に移入することが明らかとなった。さらに、胎児肝臓ではインテグリン $\alpha 5$ 、成マウス骨髄ではインテグリン $\alpha 6$ に依存した経路が示された。この結果は、胎児肝臓と成マウス骨髄の血球系幹細胞は一部異なったメカニズムで胸腺ローブ内に移入することを示している。

論文審査の結果の要旨

本研究では、緑色蛍光タンパク質遺伝子導入マウス (GFP マウス) 細胞を用いた胸腺再構築実験を利用して、血球系幹細胞の胸腺への侵入過程を可視的に追跡する手法を確立し、T 前駆細胞が胸腺に接着侵入する過程に働く接着分子について検討し、以下の知見を得た。

- 1 : まず GFP マウスの免疫応答能・T 細胞分化能について解析し、その遺伝的背景を同じくする C57BL/6 マウスと同等であることを確認した。
- 2 : 次に、GFP マウスの胎児肝臓および成骨髄中の細胞を調べたところ、GFP 陽性細胞の大部分は c-kit 陽性であり、またインテグリン $\alpha 4$ と CD44 を高発現していることがわかった。
- 3 : 胸腺再構築実験により、胎児肝臓または成骨髄由来幹細胞を胎児胸腺に移入させ、胸腺中で正常な T 細胞分化が起こることを確認した。
- 4 : 胸腺再構築実験に抗 CD44 抗体を添加すると、GFP 陽性細胞の胎児胸腺への侵入が阻害され、胸腺表面および被膜直下に付着するように分布した。
- 5 : 抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体を添加すると、GFP 陽性細胞の胸腺への接着が阻害され、胸腺ローブ内に GFP 陽性細胞

胞はほとんど認められなくなった。また、インテグリン β 1に対する抗体でも幹細胞の胸腺への接着が阻害された。

6：骨髄中の幹細胞を用いた場合、胎児肝細胞ではその関与が認められなかったインテグリン α 6も接着に働いていることがわかった。

以上本研究では、幹細胞の胸腺への侵入過程を新しい手法で解析することにより、これまで全く不明であった幹細胞の侵入機構において、接着と侵入が異なった分子を介した機序に支配されていることをはじめて明らかにした。したがってこの成果は、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。