



Title	Growth-Supporting Activities of Fibronectin Hematopoietic Stem/Progenitor Cells In Vitro and In Vivo : Structural Requirement for Fibronectin Activities of CS1 and Cell-Binding Domains
Author(s)	横田, 貴史
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42820">https://hdl.handle.net/11094/42820</a>
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	横田 貴史
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15658号
学位授与年月日	平成12年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Growth-Supporting Activities of Fibronectin Hematopoietic Stem/Progenitor Cells In Vitro and In Vivo: Structural Requirement for Fibronectin Activities of CS1 and Cell-Binding Domains (フィブロネクチンの生体外および生体内における造血幹細胞増殖促進作用: CS1 domain および Cell-Binding domain の重要性)
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]

生体内において造血幹細胞の自己複製・増殖・分化は、各種造血因子を始めとする多数の分子によって精巧に調節されており、生涯を通じて様々な役割を持つ血球細胞が枯渇することなく供給される。この調節機構の解明は、血液・リンパ系疾患の病因解明のみならず、造血幹細胞を用いた移植治療や遺伝子治療の発展に大きく寄与すると考えられる。

近年、造血幹細胞を生体外で増殖させることによって、移植治療や遺伝子治療に応用する試みがなされているが、既知の造血因子だけではその長期的な造血再構築能力を維持できず、未だその方法は確立されていない。このことは、造血因子に加え、造血幹細胞を取り巻く造血微小環境の重要性を示唆していると考えられる。

フィブロネクチン(FN)は分子量220kDaのポリペプチドの2量体からなる糖蛋白で、線維芽細胞などによって産生され、造血微小環境を形成する細胞外マトリックスの主要構成分子である。本研究では、造血微小環境を形成する細胞外マトリックスの機能に着目し、純化したヒト正常造血幹細胞およびマウス多能性幹細胞株を用いて、造血幹細胞の増殖・分化に対するFNの作用を解析した。

#### [方法ならびに結果]

##### 1. ヒト正常造血幹細胞の増殖に対する各種細胞外マトリックス蛋白の作用

ヒト臍帯血からCD34の発現を指標に造血幹細胞を純化し、各種細胞外マトリックス蛋白(FN, collagen type I, laminin)を含む無血清培地内でインキュベートした後、その増殖能をmethylcellulose colony assayにて評価した。FNでの前処理により、造血幹細胞のコロニー形成能(顆粒球・マクロファージコロニーおよび赤芽球前駆細胞コロニー)はインキュベート前と比較して約1.4倍に増加した。Collagen type Iやlamininでは変化を認めなかった。

##### 2. ヒト正常造血幹細胞上に発現するFN receptorの解析

FNに対する細胞表面のreceptorとして、今までインテグリン $\alpha 4\beta 1$ (VLA4)、 $\alpha 5\beta 1$ (VLA5)、 $\alpha v\beta 1$ が知られている。Flow cytometryにて検討した結果、ヒトCD34陽性細胞は、VLA4<sup>bright</sup>/VLA5<sup>dull</sup>/ $\alpha v\beta 1^-$ であった。FN-VLA4およびFN-VLA5の接着に対する阻害ペプチドの存在下でFNの作用を検討したところ、造血幹細胞コロニー形成促進作用はFN-VLA4に対する阻害ペプチドで著明に抑制されたが、FN-VLA5に対する阻害ペプチドでは抑制されなかった。以上の結果から、FNによるコロニー形成促進作用は造血幹細胞表面のVLA4を介し

ていると考えられた。

### 3. FN の構造上、造血幹細胞増殖促進作用に必要な部位の検討

造血幹細胞増殖促進作用における FN の構造上の重要部位及び最小機能単位を、各種 FN fragment を用いて検討した。その結果、この作用には FN の構造上 CS1 domain と Cell-Binding domain の両方が必要であること、また Cell-Binding domain+Heparin-binding domain+CS1 domain の構造を持つ fragment で native の FN とほぼ同等の効果が得られることが分かった。

### 4. マウス多能性幹細胞株 EML-C1 の自己複製的増殖に対する FN の作用

EML-C1 細胞は、赤芽球・顆粒球・リンパ球全てに分化しうるマウス多能性幹細胞株であり、stem cell factor 単独存在下では自己複製的に増殖する。FN 存在下あるいは非存在下で EML-C1 細胞の増殖を methylcellulose colony assay および MTT assay にて検討した結果、FN は分化決定した段階の前駆細胞だけでなく自己複製能を持つ多能性幹細胞に対してもその増殖を支持した。

### 5. FN fragment 投与によるマウス骨髓・脾臓中の造血前駆細胞の変化

FN fragment を生後 8 週齢のマウスに経静脈的に投与し骨髓・脾臓中の造血前駆細胞数の変化を methylcellulose colony assay にて評価した。CS1 domain と Cell-Binding domain を構造に持つ FN fragment の投与により、両方の組織において顆粒球・マクロファージ系前駆細胞及び赤芽球系前駆細胞の増加を認めた。

#### [総括]

本研究では、造血微小環境を形成する細胞外マトリックスの主要構成分子 FN が、VLA 4 を介して造血幹細胞の増殖を促進することを明らかにした。さらにこの作用には、CS1 domain と Cell-Binding domain が必須であり、その構造を持つ FN fragment が実際に生体内でも機能することを明らかとした。これらの知見は、造血幹細胞の生体外増幅法への応用や造血機能低下をきたす疾病的治療を通じて臨床医療の発展に寄与すると期待される。

### 論文審査の結果の要旨

Fibronectin は、造血微小環境を形成する細胞外マトリックスの主要構成分子である。本研究は、造血調節機構における fibronectin の役割について、ヒト臍帯血から分離した正常造血前駆細胞およびマウス多能性造血幹細胞株を用いて検討したものである。その結果 fibronectin が、分化決定した前駆細胞のみならず自己複製能を持つ未分化な造血幹細胞に対しても造血因子存在下で増殖促進作用を持つことを明らかとした。またヒト正常造血前駆細胞は、fibronectin receptor としてインテグリン VLA 4, VLA 5 を発現しているが、fibronectin による増殖促進作用は VLA 4 を介していることを示した。

さらには、この作用における fibronectin の構造上の機能部位が Cell-Binding domain+Heparin-Binding domain+CS1 domain であり、Cell-Binding domain と CS1 domain 両方の存在が機能上必要であることを明らかにした。また Cell-Binding domain+CS1 domain の構造を持つ FN fragment の投与により生体内的造血前駆細胞が増加することを示した。

近年、造血幹細胞を生体外で増殖させて移植治療や遺伝子治療に応用する試みがなされているが、既知の造血因子だけではその長期的な造血再構築能力を維持できず、未だその方法は確立されていない。本研究は、細胞外マトリックスの構成分子 fibronectin が造血幹細胞の自己複製的増殖をも支持する重要な知見を示したものであり、臨床医療の発展に寄与すると期待され、学位の授与に値すると考える。