氏名	坂根直樹（さかねなおき）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 17772 号
学位授与年月日	平成15年3月25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	血球系幹細胞分化の支持基盤としての胎児肝臓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 八木 清仁　教授 前田 正知　教授 田中 慶一

論文内容の要旨

血球系幹細胞は成体においては骨髄に存在する。しかし、骨髄の形成が未発達な胎児期においては血球系幹細胞は一時的に肝臓に存在することが知られている。この胎児肝臓中の血球系幹細胞は成体骨髄由来のそれよりも、分化・増殖能や実験的な血球系幹細胞移植後の生着率等が優れていることが示されている。一方で肝臓自身の発生という面から見ると、肝臓中に血球系幹細胞が存在する胎生後期は、肝前駆細胞から肝臓細胞や胆管細胞へと分化し機能的に成熟していく途中の段階で、肝臓としての機能的成熟を遂げると、血球系幹細胞の支持基盤としての機能は無くなる。以上のような報告は、胎児肝臓の血球系幹細胞の支持基盤としての機能は、肝臓細胞の分化・成熟と密接に関連し、肝臓細胞と血球系幹細胞の細胞間相互作用が血球系細胞の維持・分化誘導において主要であることを示すものである。私はこのことに注目し、胎児肝臓という環境が血球系幹細胞にどのような影響を及ぼすかについて、肝臓細胞自身の分化との関連にも注目しながら研究を進めてきた。

まず最初に、血球系細胞と胎児肝臓ストローマ細胞の細胞間相互作用を検討するための in vitro 実験系の確立を試みた。胎齢 14 日の胎児肝臓ストローマ細胞を培養し、その上で血球系細胞を共培養した。この培養系で未分化な血球系細胞のマーカー分子として知られる c-kit 分子陽性の血球系細胞が胎児肝臓ストローマ細胞数依存的に生存維持されることが確認された。また、この培養系に様々な接着分子に対するモノクローナル抗体を添加することで、維持される c-kit 陽性細胞の数に及ぼす影響を調べたところ、特にインテグリンα4分子に対するモノクローナル抗体を添加したときに、胎児肝臓ストローマ細胞が存在しない状態で培養したときと同程度まで減少することを確認した。このことから、胎児肝臓ストローマ細胞のもつ血球系幹細胞の維持能には、インテグリンα4 分子を介した細胞間相互作用が重要であることが確認できた。

さらに、より生体に近い形で胎児肝臓の微小環境を再現することを目的として、胎児肝臓器官培養法（FLOC 法）の確立を試みた。この培養法は、胎齢 12 日の肝臓を組織のまま摘出し、メディウム上に浮かべたメンブランフィルターの上で培養する方法で、まず最初にこの培養系での血球系細胞の動態が生体の肝臓中での動態と同様のものであることを確認した。さらに、様々な肝特異的分化マーカーの RNA レベルでの発現を確認することでこの系で正常な肝臓細胞の分化過程も再現できることを確認した。以上の結果は FLOC 法が、胎児肝臓中での血球系細胞と肝臓細胞の分化過程を再現しうる優れた実験系であることを示す結果といえる。そこで、FLOC の系にインテグリンα4 分子に対するモノクローナル抗体を添加したところ、前述の共培養系と同様に c-kit 陽性細胞減少が見られたが、肝臓の

分化には抗体未添加の場合と大きな変化が見られなかった。以上の結果から、インテグリンα4 分子を介した細胞間相互作用は肝臓細胞による血球系細胞の維持には重要であるが、肝臓自身の分化には大きな影響を及ぼさないことが示された。

ここまで、胎児肝臓の微小環境を制御する分子として特に接着分子に注目して検討を加えたが、これらの接着分子以外にも胎児肝臓中での造血を支配する分子は存在すると考えて、胎児肝臓ストローマ細胞を特異的に認識する新規のモノクローナル抗体を作成し、それらの抗体を前述の共培養系に添加し、血球系細胞の維持に影響を及ぼす抗体を探索した。その結果作成した抗体の一種である Ndk-10 が胎児肝臓ストローマ細胞による血球系細胞の維持を顕著に阻害することが分かった。そこでこの Ndk-10 の認識分子の同定を行ったところ、マウスの Aminopeptidase N/CD13 分子であることが判明した。CD13 分子は膜結合型の peptidase の一種でホルモンやサイトカインまたは細胞外マトリックス成分等の様々な分子を切断することでその活性を制御していることが知られている。そこで Ndk-10 抗体による血球系細胞の維持の阻害作用が、CD13 分子の peptidase 活性に依存しているかを確認した結果、Ndk-10 は胎児肝臓ストローマ細胞の細胞表面上の CD13 分子の peptidase 活性を阻害すること、さらには CD13 分子の阻害剤を共培養に添加することで、抗体を添加した場合と同様のを示すことが確認された。以上の結果は胎児肝臓細胞上の CD13 分子は自身の peptidase 活性に依存した形で血球系細胞の維持に関与していることを示す結果である。

また免疫組織染色による検討により CD13 分子が胸腺、脾臓等他の造血組織にも発現していることが確認された。特に胸腺では胎児期から発現がみられ、T 細胞分化の進行とともにその発現量が上昇しており、興味深い結果といえる。そこで、胎児胸腺器官培養法（FTOC 法）に Ndk-10 抗体を添加しその影響を検討したところ、胸腺内 T 細胞分化に阻害がみられた。この結果は CD13 分子が胎児肝臓のみならず、様々な造血組織において主要な役割を果たしていることを示す結果と言える。

再生医療や stem cell biology が 21 世紀の医療として注目を集めている、しかし比較的研究の進んでいる血球系細胞の分野においても、例えば血球系幹細胞の in vitro での長期培養など未解決の部分も多く存在し、より安全で安定した臨床応用にむけて様々な研究が進められている。こうした研究を進める上で、今回のような造血組織の微小環境を調べる研究は大きな近道となる可能性を秘めている。近年、血球系細胞の微小環境を制御する因子としてプロテアーゼの存在が注目される中で、今回新たにストローマ細胞上の Aminopeptidase N/CD13 分子の重要性が示唆された。今回の発見が血球系細胞の分野で未解決の諸問題を解決へと導く糸口となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

血液系の幹細胞は、マウスでは胎齢 10 日目頃に大動脈・生殖隆起・中腎領域にみつかり、胎齢 12 日目頃には胎児肝臓に移行する。その後胎生後期から出生直後にかけて、肝臓自身の分化が始まるにつれて、血液系幹細胞は骨髄へと移動する。すなわち血液系幹細胞は、成長につれて場所を移動しながら増幅を続ける。したがって胎児期の肝臓は、必要なだけの細胞を供給するために血液系幹細胞を強く増幅させる機能を有していると考えられる。このような胎児肝臓中の血液系幹細胞のもつ優れた造血能は、造血組織の微小環境に起因する。微小環境とは、血液細胞をとりまく様々な間質（ストローマ）細胞との細胞間相互作用によって支配されていることを意味する。しかし胎児肝臓が優れた増殖能を持つことに関与する分子細胞学的機序についてはほとんど判っていない。

本研究では、胎児肝臓が持つ血液系幹細胞の増殖支持能を調べるために、二種類の培養実験系を確立し、血液系幹細胞の増殖に働く接着分子、機能分子を同定することを目指して研究を進め、以下のことを明らかにした。

1．胎児肝臓細胞を血液系幹細胞と間質細胞群に分け、共培養実験系を確立した。

2．胎児肝臓器官培養法（FLOC）を確立した。

3．接着分子の役割を調べるために、これら培養系に種々抗体を添加し血液系幹細胞の増殖支持の得を調べたところ、インテグリンα4 分子を介した細胞間相互作用は、胎児肝臓間質細胞による血液系細胞の維持に重要であるが、肝臓自身の分化には重要ではないことを明らかにした。

4．血液系幹細胞の増殖を強く阻害する新規モノクロナル抗体を樹立したが、これがAminopeptidase N/CD13分子を特異的に認識し、胎児肝臓ストローマ細胞による血液系細胞の維持において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以上の知見は世界に先駆けた研究成果であり、これら成果を発展させることで、免疫系の細胞群の発生・増殖・分化の機構に関わる基礎研究がさらに進むものと思われ、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。