Osaka University Knowledge Archive

Title	Preferential expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor VPAC1 in human cord blood-derived CD34+CD38- cells possible role of VIP as a growth-promoting factor for hematopoietic stem/progenitor cells
Author(s)	川上, 学
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46008
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　川上　学（かわかみ　まなぶ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　19090　号

学位授与年月日　平成17年1月31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　Preferential expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor VPAC1 in human cord blood-derived $CD34^+CD38^-$ cells : possible role of VIP as a growth-promoting factor for hematopoietic stem/progenitor cells
（血管作動性腸管ペプチド（VIP）受容体VPAC1のヒト臍帯血由来$CD34^+CD38^-$細胞における高発現：VIPの造血幹・前駆細胞の増殖促進因子としての可能性）

論文審査委員　（主査）
教　授　川瀬　一郎

（副査）
教　授　青笹　克之　　教　授　金倉　　譲

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕ヒト造血前駆細胞は、種々の造血幹細胞源の $CD34^+$ 細胞分画に含まれる。その中でも、SCID-repopulating cell（SRC）や long-term culture-initiating cell（LTCIC）等のより未熟な初期造血前駆細胞は、$CD34^+CD38^-$ 細胞に、一方、より分化した colony-forming cell（CFC）は $CD34^+CD38^+$ 細胞に濃縮される。今回の研究では、初期造血前駆細胞の特徴を分子レベルで解明する目的で、ヒト臍帯血の $CD34^+CD38^-$ 細胞においてより高発現する遺伝子を subtractive hybridization（SH）を用いて単離することとした。

〔　方法ならびに成績　〕

臍帯血 $CD34^+CD38^-$ 細胞を FACS ソートし、poly (A)-PCR 法を用いて cDNA library を作成した。そこから Housekeeping gene 産物を除くために、$CD34^+$ 細胞の中で、骨髄系前駆細胞に分化し、初期造血前駆細胞を含まないとされる成人骨髄 $CD34^+CD33^+$ 細胞の cDNA library を、同様の方法で作成し、両者の間で SH を行った。その結果、血管作動性腸管ペプチド（VIP）の受容体の1つである VPAC1 受容体の遺伝子が単離された。更に、Real-time RT-PCR を用いて、この遺伝子が臍帯血の未熟 $CD34^+CD38^-$ 細胞とより分化した $CD34^+CD38^+$ 細胞の両方において発現するが、$CD34^+CD38^-$ 細胞においてより発現レベルが高いことがわかった。

次に、VIP が臍帯血 $CD34^+$ 細胞の増殖に対して及ぼす影響を *in vitro* 培養系を用いて検討した。1；無血清液体培養系を用いて、FLT3 ligand（FL）、stem cell factor（SCF）、thrombopoietin（TPO）存在下で VIP が $CD34^+$ 細胞の増殖に与える影響を、単一細胞（クローン）レベルで検討した。その結果、VIP の添加により細胞増殖するクローンの割合が増加し、個々のクローンにおける細胞増殖も促進した。2；無血清半固形培地を用いたコロニー・アッセイにより、VIP が $CD34^+$ 細胞のコロニー形成に与える影響を検討した。SCF、IL-3、granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)、erythropoietin（EPO）の5 CSF の存在下で、VIP の添加により骨髄系・混合コロニーの数が増加した。以上より、VIP が造血性サイトカインと協調し、造血前駆細胞の増殖を促進し、コロニー形成を増加させることが示された。3；VIP が単独で $CD34^+$ 細胞のコロニー形成に与える影響について検討した。上記の無血清コロニー・アッセイにおいて、5 CSF

無添加だとVIPの有無に係わらずコロニーは形成されない。しかし、5 CSFを培養第3・5日に添加した場合には、VIP存在下において全コロニー数がより多かった。したがって、VIPは単独でCFCの生存を支持するが、コロニーを形成するには造血性サイトカインが必要であることが示唆された。4 ;VIPがより未熟なLTC-ICに与える影響を、Dexter-type long-term cultureを用いて検討した。すなわち、放射線照射した骨髄ストローマ細胞上で、VIP添加または非添加の液体培地中で$CD34^+$を培養した。そして、培養5週後にコロニー形成能を調べたところ、VIP添加の場合、コロニー形成細胞が増加した。したがって、VIPがLTC-ICの増殖または生存を支持することが示唆された。

〔　総　　括　〕

VIPが、臍帯血由来の種々のレベルの造血前駆細胞において増殖促進因子としてはたらく可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、ヒトの未熟造血前駆細胞の性質を分子レベルで説明する目的で、未熟造血前駆細胞を豊富に含む臍帯血由来 $CD34^+CD38^-$ 細胞に高発現する遺伝子を subtractive hybridization 法を用いて検索した。その結果neuro-peptide、vasoactive intestinal peptide（VIP）の受容体の1つであるVPAC1 receptor遺伝子が単離された。さらに、VIPが造血前駆細胞に及ぼす作用を *in vitro* 培養系を用いて調べた。その結果、臍帯血由来のLong-term culture initiating-cellという未熟なレベルを含む種々のレベルの造血前駆細胞に対して、VIPが増殖または生存を支持する作用を有することが明らかになった。この結果から得られた知見は、VIPが造血前駆細胞の体外増幅等に応用できる可能性があることを示唆しており、極めて有意義である。よって、学位論文に値すると考える。