



Title	A novel direct competitive repopulation assay for human hematopoietic stem cells using NOD/SCID mice
Author(s)	立川, 豊吏
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49047">https://hdl.handle.net/11094/49047</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	たて かわ とよ し 立 川 豊 吏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 2 1 4 6 5 号
学位授与年月日	平成 19 年 4 月 23 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	A novel direct competitive repopulation assay for human hematopoietic stem cells using NOD/SCID mice (2 群のヒト造血幹細胞の造血能を NOD/SCID マウスを用いて直接比較する新たな方法の確立)
論文審査委員	(主査) 教 授 川瀬 一郎  (副査) 教 授 金倉 譲 教 授 青笹 克之

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### [ 目 的 ]

造血器悪性疾患などに対する根治治療として骨髄移植が広く行われているが、提供者が見つからず骨髄移植を受けられない場合があった。近年、臍帯血は長期の造血維持能力を持つことが判明し、臍帯血移植が小児を中心に広く行われるようになり良好な成績を収めている。しかし、成人に対する臍帯血移植は、一つの臍帯血から、成人に行うのに十分な細胞数が得られないことが多く、体格の小さい人など限られた症例にしか行われなかった。その問題点を克服するために、種々のサイトカインを組み合わせた体外増幅法が研究され、一部は臨床応用されており、これからも、遺伝子導入技術を用いた新たな増幅法など多数発見されると考えられる。また、いくつかの臍帯血を混合し移植する方法も行われており、各方法での臍帯血中の造血幹細胞の造血維持能力の優劣を定量的に測定することが必要になる。従来から種々の測定法が研究されてきたが、どの方法も十分ではなかったため、致死線量の放射線を照射した nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/Scid) マウスを用いた簡便で正確な定量法の確立を試み、更に、サイトカインで刺激する前後の臍帯血の造血能力の優劣の測定を試みた。

##### [ 方 法 ]

あらかじめ同意を得て集め、液体窒素中に保存していた男女各 30 本ずつの臍帯血から、抗 CD2、3、14、16、19、24、56、66b、glycophorin A 抗体結合ビーズを用いて分化抗原陽性細胞を除去し CD34 陽性細胞を回収した。まず、信頼度を確認するために男女の細胞を様々な比率で混合し、更にマウス単核球を加えてヒト由来細胞の比率を 1%、10% に調整して DNA を抽出し、蛍光標識したプライマーを用いた PCR 法で amelogenin 遺伝子の第 1 イントロンを増幅した。増幅産物をアクリルアミドゲルで電気泳動し FMBIO II で蛍光強度を測定し定量することにより検量線を作成した。この遺伝子は X 染色体上にあるが Y 染色体上には偽性遺伝子があるので、X 染色体由来の PCR 産物は 106 bp となり Y 染色体由来のものは 112 bp となる。次に 8 から 10 週齢のオス NOD/LtSz-Scid/Scid (NOD/Scid) マウスの全身に 200 cGy のガンマ線を照射し、男女比 1 : 4、1 : 1、4 : 1 で混合した  $3 \times 10^5$  個の 34 陽性細胞を 15 Gy のガンマ線照射した女性の末梢血単核球  $1.0 \times 10^7$  個とともに尾静脈から移植した。約 7 週間後にマウスの骨髄と脾臓から細胞を回収し、EPICS Elite cell sorter を用いてヒト CD34、19、33 陽性細胞を集め、DNA を抽出し同様に PCR 産物を定量した。最後に、この方法を用いてサイトカイン刺激前後の臍帯血由来造血幹細胞の再構成能を測

定した。使用したサイトカインの刺激は1回目が thrombopoietin (TPO) 20 ng/ml、FLK2 ligand (FL) 100 ng/ml、interleukin-6 (IL-6) 100 ng/ml、soluble IL-6 receptor (sIL-6R) 1  $\mu$  g/ml、で7日間培養、2回目は FL 100 ng/ml、stem cell factor (SCF) 100 ng/ml、complex of IL-6 and sIL-6R (IL-6/sIL-6R) 50 ng/ml、で4日間培養とした。同時に、colony forming unit (CFU)、long term culture initiating cell (LTCIC) も測定した。

#### [ 成 績 ]

検量線はヒト由来細胞の割合が1%、10%の各々について  $r=0.857$ 、 $0.943$  で作成され信頼度を確認した。次に、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を男女比 1 : 4、1 : 1、4 : 1 で混合し NOD/scid マウスに移植した実験結果を示す。7週間後に骨髄、脾臓から細胞を回収しそのまま amelogenin 遺伝子 PCR を行った場合は骨髄  $r=0.981$ 、脾臓  $r=0.983$  であり、骨髄から回収した細胞をヒトサイトカインを用いてコロニーアッセイし、colony forming cell (CFC) を回収し PCR した場合は  $r=0.992$  で、更に、骨髄から回収した細胞からヒト CD34 陽性細胞を抽出して PCR を行った場合は  $r=0.955$  であり、移植後も移植時の比率を維持していた。そこで、本方法を用いてサイトカイン刺激前後の CD34 陽性細胞集団の NOD/Scid マウスでの再構成能を骨髄、脾臓から回収した細胞全体、更に、骨髄中のヒト CD34、19、33 陽性細胞、ヒト CFU について解析したところ1回目、2回目共、サイトカイン刺激前の細胞が優位に生着し造血を行っていた。また、サイトカイン刺激前後の細胞集団の CD34 陽性細胞数は各々1.1-1.3 倍、0.8-1.3 倍、CFU は 1.2-1.9 倍、1.2-1.6 倍、LTCIC は 1.2-1.4 倍、0.9-1.2 倍であった。

#### [ 総 括 ]

マウスでは同種のマウスを使用することで比較的容易に2つの細胞集団の造血能を直接比較することが出来るため、多くの知見が集積されているが、ヒトにおいては今まで、有効な方法がなかったため研究が遅れていた。その原因としていくつか考えられるが主なものは、異種移植系を用いる場合のヒト細胞の生着率の低さと手技の煩雑さである。今まで使われていた Scid マウスや羊の胎児ではヒト細胞の生着率は数%であったが、NOD/Scid マウスを用いることで数十%まで生着率を高めることが出来た。Rosler らは Scid マウスにヒト胎児骨を移植して可能な限りヒトの造血環境に近づけ、比較する両群の検出は各 HLA の違いを利用するという方法を発表している。この方法はヒト造血細胞を直接比較したという点で画期的であったが、胎児の骨を使用し、使用するヒト細胞ごとに HLA を調べなければいけないという煩雑さがある。一方、本方法は、手技の煩雑さはなく、性差を利用しているので両群の同定も容易に出来るという利点がある。今回、サイトカイン刺激した方が NOD/Scid マウスでの再構成能が低下したとの結果になった。CFU、LTCIC でみると維持されているが著大な増幅はされていなかったため、サイトカインの組み合わせなどについて再検討する必要があると考えられるが、本方法により正確に比較できた。

### 論文審査の結果の要旨

造血器悪性疾患に対する根治治療として近年、成人に対する臍帯血移植が急増している。しかし、移植細胞数が不十分な場合があり、その結果高い拒絶率が発生している。その克服のためにサイトカイン刺激による臍帯血造血幹細胞の増幅法が研究されている。しかし、臨床応用するためには、各増幅法による生着能の変化を正確に検定する方法が必要である。本論文では、NOD/SCID マウスに同時に男女2群のヒト臍帯血造血幹細胞を移植し、7週間後に骨髄および脾臓から細胞を回収して、X染色体上にありY染色体上に偽遺伝子が存在するヒトアメロゲン遺伝子をPCR法で検出する事により、両群の生着能を直接定量的に比較出来る新たな方法を確立し、更にその方法を用いて、サイトカインによる体外増幅は、ヒト臍帯血造血幹細胞の生着能を低下させることを明らかにした。以上のような新たな知見を明らかにした本論文は、学位に値すると考える。