The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells
Author(s)	藤田, 二郎
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58158
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【72】

氏　　名	藤　田　二　郎（ふじ　た　じ　ろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４３９４　号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Myeloid neoplasm-related gene abnormalities differentially affect dendritic cell differentiation from murine hematopoietic stem/progenitor cells （マウス造血幹・前駆細胞からの樹状細胞への分化は、骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常により影響を受ける）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金倉　　譲 （副査） 教　授　下村伊一郎　　教　授　野口眞三郎

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

骨髄系造血器腫瘍は、造血幹・前駆細胞レベルでの遺伝子異常が原因で発症する疾患である。骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常は、主に細胞内シグナルを恒常的に活性化させ増殖・生存に関与する異常と主に骨髄系細胞分化を抑制する異常に分けられる。前者はclass I mutation、後者はclass II mutationと呼ばれ、これらは予後因子としても重要である。骨髄系造血器腫瘍患者末梢血中には、腫瘍細胞由来の樹状細胞(dendritic cell; DC)が認められ、またin vitroで腫瘍細胞を樹状細胞に分化させることが可能である。これらの腫瘍由来の樹状細胞は腫瘍抗原特異的な免疫反応に関与しうるものであり、同細胞集団の解析は造血器腫瘍の発症、再発における免疫学的機序の解明に重要と考えられる。しかし、これまで骨髄系造血器腫瘍由来樹状細胞はGM-CSFを用いた炎症状態での誘導のみが検討され、疾患の発症や再発時に相当すると考えられる定常状態での分化は検討されてこなかった。また、樹状細胞分化における骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常の役割も明らかではない。そこで本研究ではまず、FLT3リガンドを用い定常状態に相当する状況下でマウス造血幹・前駆細胞から樹状細胞を誘導する培養系を確立し、この培養系において骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常が、樹状細胞分化に及ぼす影響について解析することを目的とした。

〔　方法ならびに結果　〕

１．樹状細胞誘導培養系の確立

［方法］マウス骨髄細胞から造血幹・前駆細胞分画であるLSK細胞をソーティングしTPO+SCFで２日間培養後、96well丸底プレートを用いFLT3リガンド存在下で７日間培養した。［結果］培養９日目には全培養細胞の80%以上がCD11c陽性を示した。CD11c陽性細胞は、plasmacytoid DC (pDC)とconventional DC (cDC)に分けられ、その比率(pDC/cDC ratio)は、再現性をもって定常状態における脾臓DCの比率とほぼ同等な値を示した。この培養系で誘導されたDCは、allo MLR活性或いはCpG刺激によるIFN-α産生能を有し、機能的であることを確認した。

２．骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常の樹状細胞分化に及ぼす影響の解析

［方法］LSK細胞に骨髄系腫瘍関連遺伝子異常を導入し、その後FLT3リガンド存在下で７日間培養した。誘導された全DC数、pDC/cDC ratio、成熟度、allo MLR活性について検討した。Class I mutationとしてFLT3-ITD、FLT3-TKD、CA(constitutive active)-N-Ras、c-Kit-TKD、FIP1L1/PDGFRα、TEL/PDGFRβ、class II mutationとしてAML1/ETO、PML/RARα、CBFβ/MYH11、AML1dCについて検討した。［結果］コントロールに比べFLT3-ITD、CA-N-Rasは全DC数の増加を認めたが、それ以外ではすべて減少を認めた。pDC/cDC ratioは、FLT3-ITD、FLT3-TKDおよびすべてのclass II mutationはコントロールと同等の値を示したが、CA-N-Ras、c-Kit-TKD、FIP1L1/PDGFRα、TEL/PDGFRβでは著明な低下を認めた。また恒常活性化型のシグナル伝達分子について検討したところ、CA-STAT3およびCA-PI3 kinaseではpDC/cDC ratioは軽度上昇したが、CA-MEK1およびCA-STAT5Aでは著明な減少を認め、FLT3-ITD FLT3-TKD 以外のclass I mutationに認められたpDC/cDC ratioの低下はMEK、STAT5の異常活性化の関与が示唆された。DC細胞表面のMHCII、共刺激分子(CD80、CD86)の発現強度を指標に成熟度を解析したところ、class I mutation間で成熟度が異なり、成熟度の低いFLT3-ITD誘導DCはコントロールと同等のMLR活性を示したが、成熟度の高いCA-N-Ras誘導DCおよびTEL/PDGFRβ誘導DCは高いMLR活性を示した。

〔　総　　括　〕

１．マウス造血・前駆細胞からFLT3リガンド存在下で十分かつ安定してDCを誘導する培養系を確立した。

２．骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常、特にclass I mutationが多様な腫瘍由来DC分化を生じることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

骨髄系造血器腫瘍は、造血幹・前駆細胞レベルでの遺伝子異常が原因で発症する疾患である。骨髄系造血器腫瘍患者の末梢血中に、腫瘍由来の樹状細胞が存在していることが証明されているが、樹状細胞分化における骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常の役割は不明である。本研究ではマウス造血幹・前駆細胞から樹状細胞を誘導する培養系を確立し、骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常が樹状細胞分化に及ぼす影響について解析されている。誘導された樹状細胞数、その亜分画の比率、或は成熟度が、遺伝子異常の種類が異なることで変化し、その傾向は特に骨髄系細胞の増殖・生存に関与するclass I mutationに分類される遺伝子異常群において強いことが示された。以上より、骨髄系造血器腫瘍関連遺伝子異常の種類が異なることで、マウス造血幹・前駆細胞からの樹状細胞分化や形質が異なることが初めて示された。本研究は、造血器腫瘍患者における腫瘍由来樹状細胞が遺伝子異常によって調節されている可能性を初めて示した重要な研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。