

氏名	なかむら ゆき 中村由貴
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第484号
学位授与年月日	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Soluble c-kit receptor mobilizes hematopoietic stem cells to peripheral blood in mice (可溶性 c-kit 受容体は造血幹細胞を末梢血に動員する)
学位論文審査委員	(主査) 清水英治 (副査) 神崎 晋 村協義和

学位論文の内容の要旨

末梢血に造血幹細胞を動員するため様々なサイトカインが使用されているが、その正確な機序は不明である。造血幹細胞は c-kit を発現し、骨髄ストローマ細胞上に発現している stem cell factor (SCF) と結合している。一方、可溶性 c-kit receptor (以後 s-kit) は、SCF と c-kit との結合を競合的に阻害することが報告されている。従って、c-kit-SCF 結合を s-kit 投与により阻害することで骨髄より造血幹細胞が遊離し末梢血へ動員されることが示唆される。今回我々は、s-kit 投与による末梢血への造血幹細胞動員について基礎的検討とともに、マウスモデルで末梢血幹細胞移植を行い検討した。

方法

マウスに s-kit を投与し、得られた末梢血をフィコール比重遠心法で単核球分離後コロニーアッセイを行った。また、マウス骨髄を SCF、interleukin(IL)-3、IL-11、erythropoietin(Epo)、s-kit、anti-c-kit-antibody(ACK45)の各種組み合わせを含んだ培地で培養し、10 日後のコロニーをカウントした。さらに、マウス末梢血幹細胞移植モデルを用いて解析した。具体的には、8 から 12 歳の C57BL/6-Ly5.1 マウスを骨髄、あるいは末梢血幹細胞ドナーとして用い、8 から 12 歳の C57BL/6-Ly5.2 マウスをレシピエント、または competitor cell のドナーとして用いた。末梢血幹細胞採取については、Ly5.1 マウスに 4 日間 s-kit を 24 時間毎に経静脈的に投与、または granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) を 12 時間毎に皮下注射し、それぞれ最終投与 3 時間後にエーテル麻酔下に心臓穿刺により末梢血を採取した。その後フィコール比重遠心法により単核球を分離し、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 TER-119 抗体、抗 B220 抗体、抗 Gr-1

抗体を用いビーズに吸着させ lineage (Lin) を除去した。この細胞を致死量の放射線照射を行った Ly5.2 マウスに、Ly5.2 マウスの骨髄から採取した正常骨髄細胞とともに移植し、移植後末梢血の%Ly5.1 マウス細胞を解析し検討した。また各系 (T 細胞、 B 細胞、 単球/マクロファージ) の抗体を用いて染色し解析した。

結 果

s-kit 投与後のマウスの末梢血に CD34 陽性細胞が認められ、G-CSF を併用することにより CD34 陽性細胞の出現が優位に増加した。s-kit 投与後の末梢血の培養ではコントロールと比較し優位にコロニーが増加した。マウス骨髄の培養においては、培地に s-kit を加えることにより s-kit を加えていない培地と比較し有意にコロニー形成を抑制した。s-kit 投与後に Ly5.1 マウスより採取した Lin⁻細胞を移植した Ly5.2 マウスには移植後すべてのマウスにドナー由来細胞の生着を認め、さらに T 細胞、 B 細胞、 単球/マクロファージのいずれの系にもドナー由来の細胞を確認した。さらに、s-kit 投与後に Ly5.1 マウスより採取した Lin⁻細胞を CD34⁻と CD34⁺に分離しそれぞれ Ly5.2 マウスに移植したところ、移植後ドナー由来細胞の生着率は CD34⁺群で有意に高かった。CD34⁺細胞群ではすべてのマウスで各系にドナー由来の細胞を確認したが、CD34⁻細胞群では 10 匹中 2 匹のみ各系にドナー由来の細胞を確認した。次に、s-kit と G-CSF を併用したところ、G-CSF 単独群と比較し s-kit と G-CSF の併用群では有意に生着率は上昇した。

考 察

s-kit 投与後のマウスの末梢血に CD34 陽性細胞が出現したこと、この細胞を系の異なるマウスに移植後に各系にドナー由来の細胞の生着を認めた事より、s-kit 投与により骨髄より末梢血に造血幹細胞が動員されたことを示した。造血幹細胞は c-kit を発現し、骨髄ストローマ細胞上に発現している SCF と結合することにより骨髄内に留まり、細胞の分化、増殖に働いていることが知られている。一方、s-kit は SCF と c-kit との結合を競合的に阻害することが報告されており、今回 s-kit を含んだ培地においてコロニー形成を抑制したこともこれを示唆しており、c-kit-SCF 結合を s-kit 投与により阻害することで骨髄より造血幹細胞が遊離し末梢血へ動員されると考えられた。また、動員された造血幹細胞が CD34 陽性であったことは G-CSF にて動員されたそれと同様であり、G-CSF と s-kit との併用で生着率が優位に上昇したことは、動員の機序を解明する上で重要であると共に今後臨床における造血幹細胞の動員、再生医療への応用に有用であると考えられた。

結 論

s-kit はマウス骨髄より末梢血に造血幹細胞を動員した。動員された造血幹細胞の大部分は CD34 陽性分画に存在し、G-CSF で動員される造血幹細胞と同様であった。G-CSF との併用では移植後の生着率が有意に上昇し、動員の機序を解明する上で有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、可溶性 c-kit receptor (s-kit) 投与による末梢血への造血幹細胞動員について、基礎的検討とともにマウスモデルで末梢血幹細胞移植を行い検討したものである。その結果、s-kit 投与により末梢血に CD34 陽性細胞が出現したこと、この細胞をマウスに移植したところ、移植後各リネージにドナー由来の細胞の生着を認めたことより、s-kit 投与により骨髄より末梢血へ造血幹細胞が動員されたことが明らかにされた。本研究は、骨髄から末梢血への造血幹細胞の動員機序の解明に貢献したものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認める。