

氏 名	ふじ 藤 本 哲 広
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2452 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Step-wise divergence of primitive and definitive haematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation (胚性幹細胞の試験管内分化系における造血・血管内皮細胞の分化過程の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 笹 井 芳 樹      教 授 中 畑 龍 俊      教 授 西 川 伸 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

目的：中胚葉から造血細胞ならびに血管内皮細胞への分化過程については、近年の研究から、中胚葉由来の造血・血管内皮細胞系譜の共通の前駆細胞から造血細胞系譜と血管内皮細胞系譜の前駆細胞がそれぞれ分化し、さらに造血細胞系譜の前駆細胞から一次造血・二次造血細胞が分化すると推定されてきた。しかし、このモデルとは対照的に、血管内皮細胞から造血細胞が直接分化する可能性がマウス初期胚の組織学的解析によって強く示唆されており、造血細胞への分化過程の詳細は未解決である。そこで、本研究では中胚葉から造血細胞系譜にいたる初期分化過程の検討を目的とした。

方法：真胎生であるという哺乳類の発生様式のために、造血・血管内細胞系譜の詳細な解析は著しく困難であった。この点を補うために、本研究ではマウス胚性幹細胞（ES 細胞）の *in vitro* 分化誘導システムを用いた。このシステムでは、Flk-1 の発現により同定される側部中胚葉細胞、および VE-cadherin の発現により同定される血管内皮細胞を FACS で単離し、その分化能を解析しうることが既に報告されている。本研究では、これらの表面マーカーに加え、一次・二次造血に必須の分子であり、最初の造血が観察される胎生7.5日の胚胎外中胚葉で既に発現を認める転写因子 GATA-1 の造血細胞特異的な発現調節領域に GFP を融合したレポーター遺伝子を ES 細胞に導入し、*in vitro* 分化誘導システムで解析した。

結果：レポーター遺伝子を導入した ES 細胞を分化誘導すると Flk-1 陽性中胚葉から GFP を発現するサブセット（Flk-1 陽性 GFP 陽性細胞、Flk-1 陰性 GFP 陽性細胞）の分化が観察された。Flk-1 陰性 GFP 陽性細胞は一次造血細胞である胚型赤血球に分化できるが、二次造血細胞・血管内皮細胞への分化能は認めなかった。Flk-1 陽性 GFP 陽性細胞は胚型赤血球と成体型赤血球に分化でき、また、血管内皮細胞への分化能も認めた。GFP を発現しないサブセット（Flk-1 陽性 GFP 陰性細胞）は、この段階では造血細胞へは分化できないが、VE-cadherin 陽性血管内皮細胞への分化能を最も強く示した。さらに、Flk-1 陽性 GFP 陰性細胞と Flk-1 陽性 GFP 陽性細胞から分化した VE-cadherin 陽性血管内皮細胞に、成体型赤血球・顆粒球・B リンパ球への分化能が検出された。また、VE-cadherin 陽性血管内皮細胞から一次造血細胞への分化は観察されなかった。

考察：以上の結果は二つのことを示唆していると考えられる。第一に、一次造血と多分化能を持つ二次造血細胞への運命選択は中胚葉の段階でなされている。第二に多分化能を持つ二次造血細胞は Flk-1 陽性側部中胚葉に由来する血管内皮細胞から発生する。したがって、中胚葉から造血・血管内皮細胞系譜への初期分化過程では、まず一次造血細胞と血管内皮細胞が発生し、続いて血管内皮細胞から二次造血を構成する多能性造血前駆細胞が分化すると考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

造血細胞の初期発生に関して、細胞レベルでどのような中間段階を経て造血細胞が発生してくるのかについては不明な点が多い。本論文は一次造血・二次造血細胞の分化過程を解析するため、赤血球系細胞の分化に必須の転写因子である GATA-1 遺伝子のプロモーターの制御下に GFP をレポーターとして発現する ES 細胞を試験管内で分化誘導し、FLK1

陽性中胚葉細胞から GATA-1 を発現するサブセットが分化することを観察した。この GATA-1 陽性中胚葉細胞を純化・再培養することにより一次造血細胞へと分化する細胞集団であることが明らかとなった。一方、FLK1 陽性中胚葉細胞の中で、GATA-1 を発現しないサブセットからは一次造血細胞への分化能が検出されず、高い頻度で血管内皮細胞への分化能が認められた。さらに、この血管内皮細胞を純化して再培養すると多系統の二次造血細胞へ分化することが明らかとなった。本研究は、一次造血細胞と血管内皮細胞が分岐・発生し、続いて血管内皮細胞から二次造血細胞が分化する可能性を示しており、これまで細胞レベルでは不明な点が多かった造血発生過程について新しい概念を提出するものである。

以上の研究は、造血発生過程の解明に貢献し、血液学に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与者は平成、14年1月24日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。