

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	吹上 謙一
論文題目	Expression of vascular cell adhesion molecule-1 indicates the differentiation potential of human bone marrow stromal cells (Vascular cell adhesion molecule-1 遺伝子の発現は、ヒト骨髓間質細胞の分化能を示す)		
(論文内容の要旨)			
ヒト骨髓間質細胞(Bone marrow stromal cell、BMSC)は、骨髓液から単離された単核球の中で、付着性に増殖する細胞集団を指す。その中には骨、軟骨、脂肪の三方向に分化できる間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell、MSC)をはじめとして、様々な分化能をもつ細胞が混在していると考えられている。しかし個々のヒト BMSC のもつ分化能を予見できる細胞表面マーカーは同定されていない。そこで不死化したヒト BMSC のクローナルな解析から、分化能とリンクする細胞表面抗原の探索を行った。 ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を導入、更にポリコム遺伝子ファミリーの 1 つであり、細胞周期調節因子である p16 遺伝子に対する阻害作用を持つ Bmi1 遺伝子を導入することで不死化されたヒト BMSC から、限界希釈法により、単一細胞由来不死化ヒト BMSC を 100 クローン樹立した。個々のクローンに対し、骨、軟骨及び脂肪への分化誘導を行い、それぞれの分化能をアルカリファスファターゼ(ALP)活性、グルコースアミノグルカン含有量及びトリグリセライド(TG)含有量で定量的に評価した。同時にこれまで MSC に関連した細胞表面抗原として報告されている 13 遺伝子の発現を、各クローンについて RT-PCR 法により評価した。結果として、三方向の分化能を示したクローンは 5 クローンのみであり、17 クローンは全く分化誘導に反応せず、他のクローンは 1 ないし 2 方向の分化能を示した。個々のクローンの分化能と細胞表明抗原の発現を対比させたところ、多くの抗原は分化能と無関係に全てのクローンで発現が認められたが、Vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1、CD106)の発現は特定の分化能とリンクしていた。すなわち各クローンの CD106 の発現強度は骨分化能と負の相関を示し、逆に脂肪分化能とは正の相関を示した。この CD106 の発現と分化能との関連性が不死化あるいはクローニングの影響で無いことを確認するために、初代培養ヒト BMSC を用いた実験を追加した。異なる 6 人の骨髓より樹立した初代培養ヒト BMSC の培養初期及び後期における CD106 陽性率をフローサイトメトリーで測定した。培養初期の CD106 陽性率は、29.6%から 95.4%と多様な値を示し、全ての株において、CD106 陽性細胞の占める割合は、継代を重ねるにつれ減少していた。それぞれの株について、抗ヒト CD106 抗体と磁気			

ビーズを用いて、ソーティング及び細胞回収を行い、CD106 陽性集団と陰性集団に二分し、それぞれの分化能を評価した。その結果、不死化ヒト BMSC と同様に CD106 陽性細胞は陰性細胞に比較して、高い脂肪分化能を有しており、一方、骨分化能は低値であった。次に CD106 測定により分化能が予見できるかどうかを検証した。骨分化能の指標である分化誘導後の ALP 活性と分化誘導前の CD106 陽性率との間には明確な負の相関が観察された。一方、脂肪分化能の指標である分化誘導後の TG 産生量と分化誘導前の CD106 陽性率は有意な正の相関関係を有していた。この際、分化誘導前の ALP 活性や TG 含有量は、分化誘導後のそれぞれの測定値と相関が無く、分化の予測因子とはなり得なかった。以上の結果より、培養初期の CD106 陽性細胞率は、ヒト BMSC の骨及び脂肪分化能を予見するマーカーとして有用であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cell、BMSC)は、間葉系幹細胞をはじめとした様々な分化能をもつ細胞が混在している細胞集団である。個々の細胞の分化能と特定の細胞表面抗原の発現の間にどのような相関関係があるかは明らかにされていない。そこで本研究では不死化ヒト BMSC を用いた解析から、分化能と細胞表面抗原発現との関連性を解析した。

不死化ヒト BMSC から 100 クローンを樹立し、各クローンの骨、軟骨及び脂肪への分化能を評価し、間葉系幹細胞に関連すると報告されている 13 遺伝子の発現を解析した。両者のデータを対比させたところ、Vascular cell

adhesion molecule-1(VCAM-1/CD106)の発現が分化能と関連していることが判明した。すなわち VCAM-1 の発現強度は骨分化能と負の相関を示し、逆に脂肪分化能とは正の相関を示した。初代培養 BMSC を VCAM-1 陽性と陰性に選別して解析した実験でも、VCAM-1 陽性細胞は陰性細胞に比較して、高い脂肪分化能を有しており、骨分化能は低かった。更に分化誘導前の VCAM-1 発現の定量解析の結果から誘導後の骨及び脂肪分化能を予見することが可能であることが判明した。

以上の研究は、VCAM-1 遺伝子がヒト BMSC の分化能に関連する細胞表面抗原であることを解明し、ヒト BMSC の分化能の理解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、本学位授与申請者は、平成 22 年 3 月 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。