氏名	吉本桃子（よしもとももこ）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	医博第2642号
学位授与の日付	平成15年7月23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	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Direct Visualization of Transplanted Hematopoietic Cell Reconstitution in Intact Mouse Organs Indicates the Presence of a Niche （移植後マウス造血幹細胞の，全身骨における直接可視化動態観察によるNicheの解析に関する研究）
論文調査委員	（主査）教授 内山 卓　教授 湊 長博　教授 中畑龍俊

論文内容の要旨

（目的）移植後造血幹細胞の経時的・空間的動態はいまだ明らかでない。紫外線下で蛍光緑色に光るGFP蛋白を全身に発現するGFPトランスジェニックマウス由来骨髄をもちいて，移植後経時的に全身骨における造血前駆細胞の動態を観察し，造血幹細胞を保持する場所である「niche」を骨髄内で同定することを目的とした。

（方法）GFPトランスジェニックマウス由来の全骨髄（wBM）1×10^7個，分化抗原陰性分画（Lin^-細胞）1×10^5個，造血幹細胞分画$Lineage^-Scal^+c\text{-}kit^+$（KSL細胞）$1\times10^3$個をそれぞれ，致死量照射C57BL/6マウスおよび全処置を必要としないW/Wv新生児マウスに移植した。移植後経時的に蛍光実体顕微鏡で全身骨，脾臓，胸腺のGFP陽性部位を観察した。

（結果）1．蛍光実体顕微鏡下では，一個のGFP陽性細胞は骨の外からは確認できないが，生着部位でクラスターやコロニーを形成すると，容易に骨の外からスポット状に観察可能となった。GFP陽性のクラスターはwBM，Lin^-細胞移植後3日目から観察できたが，KSL細胞群では10日目に初めて長管骨骨端部に確認した。Lin^+細胞を移植した場合，GFP陽性のクラスターは観察されないことから，分化血液細胞は骨髄に生着はするものの，骨髄内でクラスターやコロニーを形成しないことが示された。すなわち，未分化な細胞が生着した部位のみが，このシステムで移植後早期にスポット状に観察できると考えられた。

定量的に生着部位を評価するため，KSL細胞移植後10日目に生着している蛍光部位の面積および蛍光強度を計算し解析した。大腿骨全体の面積に対する骨端・骨幹部位のGFP陽性の面積は，骨端部に大きく，またその蛍光強度も骨幹部に明るいことが判明した（$p<0.05$）これから，造血前駆細胞は骨端部に生着することが示された。

2．次に扁平骨や短骨である肋骨，椎骨での生着を観察した。GFP陽性のスポットはwBM，Lin^-細胞移植後3日目に，KSL細胞移植群では10日目に初めて数本の肋骨，椎骨に確認できた。これらのスポットは次第に大きくなり，他の骨へと播種し，20日目にはほぼすべての肋骨・椎骨がGFP陽性となった。このように，移植造血細胞は不均等に生着し，その後まだ生着していない骨へと播種するか，もしくは不均一に増殖を始めることが示された。

3．脾臓ではLin^-，KSL細胞移植後10，20日目にGFP陽性コロニーの形成を認めた。その数は，10日目はLin^-細胞移植群に多かったが，20日目は同数であった。これは，Late CFU-Sがより造血細胞の数を反映しているというこれまでの報告と一致した。

4．胸腺への生着は，骨髄・脾臓と比し，10日ほど遅れる傾向にあった。KSL細胞移植後10日で片葉にGFP陽性スポットを認めた。20，30日目においてもGFP陽性部位は片葉のみを占めた。このように，造血前駆細胞は，胸腺の片葉に生着した場合，他葉へ移動しないことが示唆された。

5．新生児マウスでKSL細胞を移植した際のキメラ率は数%からほぼ置き換わるものまでさまざまであった。移植後6ヶ月に解析したところ，GFP陽性部位を大腿骨骨端部および一部の肋骨，椎骨にのみ認め，それが移植造血幹細胞による造血を維持している場所と考えることができた。

以上より，移植造血前駆細胞，幹細胞はおもに長管骨骨端部，もしくは肋骨や椎骨の一部に生着し，そこで造血活性を維持することができると言える。そこには幹細胞を保持するNicheが存在する可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者は，幹細胞を保持するnicheの場所を同定するために，GFP transgenic mouse 由来骨髄細胞を用いて，移植後造血幹細胞の動態を全身の造血組織において実体顕微鏡下に可視化し，解析を行った。

GFP陽性造血幹細胞分画Lineage$^-$Scal$^+$c-kit$^+$（KSL細胞）をcell sorterを用いて純化し，致死量照射マウスに移植した。大腿骨を4等分し，両端をepiphysis region，中央をdiaphysis regionと定義し，各部位におけるGFP陽性細胞の生着をGFPの面積と輝度により解析したところ，優位性をもって，epiphysis regionに造血幹細胞の生着を認めた。また，同様に非照射W/W^{v}新生児マウスにKSL細胞を移植したところ，移植後遠隔期においても，大腿骨骨端部に優位にGFP陽性コロニー形成を認めた。以上のことから，移植造血幹細胞は大腿骨骨端部に生着し，その場所で長期造血生活性を保つことが示され，そこにnicheが存在すると考えられた。

以上の研究は，これまでアプローチできなかった骨に囲まれて存在する骨髄において移植造血細胞の局在を三次元的に可視化し得たという点において，大きな意味を持つ。このシステムは，造血幹細胞維持のための分子機構を解明するためのツールとして大いに貢献すると考えられる。また造血幹細胞のみならず，組織幹細胞の解析にも有用である。

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15年6月16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。