

氏 名	篠 田 げん
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3085 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 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	$\alpha 4$ -integrin ⁺ endothelium derived from primate embryonic stem cells generate both primitive and definitive hematopoietic cells. (霊長類胚性幹細胞由来 $\alpha 4$ インテグリン陽性血管内皮細胞の一次および二次造血に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 生 田 宏 一 教 授 前 川 平 教 授 長 澤 丘 司

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類の初期発生においては、卵黄嚢由来の一次造血と動脈 - 性腺 - 中腎 (AGM) 領域からの二次造血の2段階で造血発生が進行する。血液細胞と血管内皮細胞に共通の前駆細胞として「ヘマンジオブラスト」の存在を提唱する報告がある一方で、二次造血の少なくとも一部においては大血管の血管内皮細胞に由来するという報告も認める。しかし一次造血が血管内皮細胞にも由来するかどうかについてはよくわかっていない。さらに、霊長類における初期胚の研究は倫理上の制限から困難であるため、主に ES 細胞を用いて初期発生を模倣した研究が行われている。今回カニクイザル ES 細胞と M-CSF 機能的欠損マウス由来のストローマ細胞株 OP9 との共培養分化誘導系を用いて、初期発生における血管内皮細胞の造血活性について検討した。

未分化 ES 細胞を OP9 細胞と共培養し、10日目にセルソーターで VE-cadherin 陽性 CD45 陰性細胞を血管内皮細胞として純化した。純化した細胞は表面マーカーや機能上、たしかに血管内皮細胞であることが確認された。この細胞をさらに OP9 細胞と共培養すると、赤血球を含む種々の成熟血液細胞が上清中に出現した。純化後培養6日目には一次造血由来の胚型赤血球、純化後培養30日目には二次造血由来の胎児型および成体型赤血球が観察され、これらは胚型、胎児型、成体型グロビン蛋白の免疫染色により証明された。以上から、VE-cadherin 陽性 CD45 陰性血管内皮細胞から一次造血と二次造血が経時的に出現することが示された。次に、血液細胞マーカーの一つである $\alpha 4$ -integrin に着目し、上記の共培養系における経時的発現を調べた。 $\alpha 4$ -integrin 陽性細胞は、未分化 ES 細胞からの培養6日目より出現し、8-10日目にピークを迎え、16日目にはほぼ消失した。そこで培養10日目に $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞 (VE-cadherin 陽性 CD45 陰性) と $\alpha 4$ -integrin 陰性血管内皮細胞を純化し、さらに OP9 細胞と共培養して比較したところ、 $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞にのみ造血活性が認められ、やはり一次造血と二次造血が経時的に起こることが確認された。また、二次造血に必須の転写因子である *Runx1* の mRNA は、 $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞にのみ発現していた。このように造血活性を持つ $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞の出現が一時的であるという点は、これまでに報告されているような生体内で造血活性を有する血管内皮細胞の動態と類似していた。単一細胞からの血管内皮細胞と血液細胞への二分化能を評価したところ、 $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞の4.3%が二分化能を有していた。一方、培養10日目に純化した $\alpha 4$ -integrin 陽性 VE-cadherin 陰性 CD45 陰性細胞は、一次造血の活性が高いものの、二次造血の活性がほとんどないことも明らかになった。

以上から、サル ES 細胞由来の血管内皮細胞から一次造血と二次造血が経時的に起こることが示された。さらに、 $\alpha 4$ -integrin の発現の有無により血管内皮細胞は2群に分類され、 $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞のみが一次および二次造血活性を持つことが示された。本実験系は、霊長類の初期発生における血管内皮細胞および血液細胞分化研究に有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、霊長類の造血発生機構を解析するモデルとして、利用が困難な初期胚に代わり、カニクイザル胚性幹細胞（ES細胞）と OP9 細胞の共培養分化誘導系を用いて血管内皮細胞の造血活性について検討した。

培養10日目に純化した VE-cadherin 陽性血管内皮細胞を再度 OP9 細胞と共培養すると、赤血球を含む種々の成熟血液細胞が上清中に出現した。胚型、胎児型、成体型グロビン蛋白の免疫染色により、一次造血と二次造血が経時的に起こることが示された。さらに、 $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞と $\alpha 4$ -integrin 陰性血管内皮細胞に分けて比較すると、培養中一定期間だけに出現する $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞にのみ造血活性が認められ、やはり一次造血と二次造血が経時的に起こることが示された。また、 $\alpha 4$ -integrin 陽性血管内皮細胞の4.3%が、単一細胞から血管内皮細胞と血液細胞へ分化する二分化能を有していた。

以上の研究は、霊長類の造血発生において血管内皮細胞が二次造血だけでなく一次造血にも関与していることを初めて明らかにしたという点で大きな意味を持つ。マウスとは異なる霊長類の造血発生のより詳細な理解のために霊長類 ES 細胞が果たす役割は大きく、本実験系はヒト胚における正常造血発生のみならず血液疾患の病態解明などに寄与するところが多いと考えられる。

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19年2月8日実施の論文内容とそれに関連した研究分野ならびに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。