

氏名・(本籍) 坂部 秀明 (滋賀県)  
学位の種類 博士 (医学)  
学位記番号 博士 第244号  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位授与年月日 平成9年3月24日  
学位論文題目 Functional Differences Between Subpopulations of Mobilized Peripheral Blood-derived CD34<sup>+</sup> Cells Expressing Different Levels of HLA-DR, CD33, CD38, and c-kit Antigens  
(HLA-DR, CD33, CD38, c-kit抗原の発現程度から見た末梢血CD34陽性細胞の幹細胞特性)

審査委員 主査 教授 服部 隆 則  
副査 教授 瀬戸 昭  
副査 教授 馬場 忠 雄

## 論文内容の要旨

### 【目的】

近年、自己あるいは同種造血幹細胞移植における幹細胞源として末梢血が注目されている。末梢血幹細胞移植後の造血回復は同種骨髄移植に比べて早期に得られるが、これは輸注される幹細胞特性の違いによるものと考えられる。よって末梢血由来CD34陽性細胞の幹細胞特性について検討した。

### 【方法】

固形腫瘍患者の化学療法後の骨髄回復期にG-CSFを投与し、CS-3000によりアフレーシスした。得られた末梢血単核細胞を、CD34、HLA-DR、CD38、CD33、c-kit抗原に対するモノクローナル抗体で染色し、FACSソーティングによりCD34<sup>+</sup>細胞を亜分画した。培養はメチルセルロース法により各分画のコロニー形成能を検討した。未分化造血前駆細胞 (LTC-IC) は、MS-5細胞との共培養系を用いて限界希釈法により各分画における頻度を測定した。さらに、無血清下のsingle cell-clone sorting実験より、各分画細胞の2次コロニー形成率や増殖能力を検討した。

### 【結果】

- (1) 末梢血CD34<sup>+</sup>細胞の大半がDRおよびCD38抗原を、また、約60%がCD33抗原を発現していた。一方、c-kit抗原の発現率は約20%であった。
- (2) 各亜分画のコロニー形成能を比較すると、DR<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、CD33<sup>-</sup>、c-kit<sup>low</sup>分画においてすべての前駆細胞を認めた。DR<sup>-</sup>およびCD38<sup>-</sup>分画のコロニー形成率 (PE) は陽性分画に比べて低値であった。CD33<sup>+</sup>分画にはCFU-GMが濃縮されていたが、一方、c-kit<sup>high</sup>分画にBFU-Eが高度に濃縮されていた。c-kit<sup>-</sup>分画のPEは1/3~1/5でCFU-GMが濃縮されていた。
- (3) 限界希釈法よりLTC-ICの頻度は、DR<sup>-</sup>およびDR<sup>+</sup>分画がそれぞれ12および58個に1個で、明らかに陰性分画に濃縮されていた。また、CD38<sup>+</sup>およびCD38<sup>-</sup>分画では差がなかった。CD33<sup>-</sup>およびCD33<sup>+</sup>分画にはそれぞれ32および66個に1個で陰性分画に濃縮されていた。一方、c-kit<sup>low</sup>およびc-kit<sup>-</sup>分画には約100個に1個の頻度であったが、c-kit<sup>high</sup>分画にはほとんど認めなかった。
- (4) single cell-clone sorting実験より、CD38<sup>+</sup>、c-kit<sup>high/low</sup>分画細胞の約80%が、一方、CD38<sup>-</sup>、c-kit<sup>-</sup>分画細胞の40から50%がコロニー形成した。CD38<sup>+</sup>細胞はCD38<sup>-</sup>細胞に比べて、また、c-kit<sup>low</sup>細胞はc-kit<sup>high</sup>細胞に比べて、明らかに大きなクローンを形成した。CD38<sup>-</sup>細胞由来のクローンの50から60%が2次コロニーを形成したが、CD38<sup>+</sup>細胞由来のクローンはCD38<sup>-</sup>細胞由来のものに比べてより多くの2次コロニーを形成した。また、c-kit<sup>low</sup>由来のクローンの約40%が2次コロニーを形成したが、c-kit<sup>high</sup>由来クローンのそれは7%であった。

### 【考 察】

末梢血CD34<sup>+</sup>細胞のc-kit抗原の発現率は約20%と低値であった。臍帯血、骨髄ではCD34<sup>+</sup>細胞の約60%がc-kit抗原を発現しており、化学療法やG-CSFによる幹細胞の末梢血への動員機序を考える上で興味深かった。LTC-ICはDR<sup>+</sup>分画に比べて、DR<sup>-</sup>分画に高度に濃縮されていた。一方、CD38<sup>+</sup>およびCD38<sup>-</sup>分画中には同程度に存在し、2次コロニー形成率や増殖能力においてはむしろCD38<sup>+</sup>細胞がCD38<sup>-</sup>細胞に比べて明らかに優れていた。これは現在報告のある骨髄、臍帯血と明らかに異なるものである(Traycoff et al., Exp Hematol, 1994, Hao et al., Blood, 1995)。また、c-kitの発現でみるとc-kit<sup>low/-</sup>分画にLTC-ICは存在した。骨髄CD34<sup>+</sup>細胞において、LTC-ICは主にc-kit<sup>low</sup>分画に濃縮されc-kit<sup>-</sup>分画にはほとんど認めない(Gunji et al., Blood, 1993)、臍帯血由来blast cell colony形成細胞はc-kit<sup>low</sup>分画に存在する(Laver et al., Exp Hematol, 1995)との報告がある。今回の結果より末梢血CD34<sup>+</sup>細胞においてはc-kit<sup>low</sup>あるいはc-kit<sup>-</sup>分画に未分化造血前駆細胞が濃縮していると考えられた。

### 【結 論】

G-CSFと化学療法で動員された末梢血由来CD34<sup>+</sup>細胞の幹細胞特性は、骨髄、臍帯血とは明らかに異なったものであることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

近年、造血幹細胞移植における幹細胞源として末梢血が注目されているが、本研究は、化学療法を受けた癌患者の骨髄回復期にG-CSFを投与し、得られた末梢血単核細胞をCD34(+)と(-)に分け、続いてHLA-DR、CD38、CD33とc-kitの発現からFACSで亜分画し、それぞれの分画のコロニー形成能、LTC-IC(long-term culture-initiating cell)出現の頻度、各分画からの単一細胞当たりの2次コロニー形成能と増殖能などから、幹細胞特性について検討したものである。

その結果、CD34(+)細胞の殆どがDR(+)とCD38(+)であったが、CD33(+)は60%、c-kit陽性(c-kitについて(++)と(+)に区別)は20%であった。全ての分化段階のcommitted stem cellは、CD34(+)で、DR(+), DR(-), CD33(-), CD38(+)とc-kit(+)の分画にみられ、CFU-GMはCD33(+), BFU-Eはc-kit(++)の分画に多く存在していた。LTC-ICは、CD34(+)で、DR(-)、CD33(-)とc-kit(+)(-)分画に多かったが、c-kit(++)分画にはみられず、一方、CD38はLTC-IC出現のマーカーとはなり得なかった。これらの末梢血幹細胞特性は骨髄や臍帯血とは異なっていた。

本研究は、末梢血幹細胞をCD34、DR、CD38、CD33とc-kitの発現より、LTC-ICから各分化段階のcommitted stem cellに亜分画することが可能であることを示し、効率的な幹細胞のin vitro増幅や早期の造血回復などの実際の移植治療に道を拓くもので、博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認められる。