

氏名・(本籍)	松原英俊(滋賀県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第72号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	平成2年3月24日
学位論文題目	GENERATION OF MARROW STROMAL CELLS PROVIDING HEMATOPOIETIC MICROENVIRONMENT IN ECTOPIC BONE TISSUE PROVOKED BY OSTEOGENIC FACTOR (骨形成因子誘導による異所性骨組織中より造血微細環境を構築する) 骨髄間質細胞株の樹立

審査委員	主査 教授	服部隆則
	副査 教授	細田四郎
	副査 教授	福田真輔

### 論文内容要旨

#### 〔目的〕

1977年 Dexter らにより in vitro で造血幹細胞を長期培養できる系が確立されて以来、骨髄間質細胞が造血機能に対し重要な役割を果たしていることが示されてきた。そして、造血幹細胞やその前駆細胞の維持分化を支持する骨髄間質細胞は、それら造血細胞に対し、コロニー刺激因子(CSF)などを介した間接作用だけでなく細胞接触による直接作用をも有することが明らかとなってきている。しかし一方、間質細胞の起源や分化については未だほとんど解っていない。そこで今回、造血細胞が何故骨組織の内側の骨髄で分化増殖するのか、骨と骨髄間質細胞の関係について着目した。骨形成因子の働きで未分化間葉組織より骨が誘導され、この際に軟骨形成に遅れて造血組織の誘導を認める。この異所性骨中にも骨形成により誘導された間質系細胞が存在し、造血微細環境を構築していると考えられる。この造血組織の成熟以前に、すでに造血を支持する様な環境を造る間質系細胞が存在すると考え、骨形成因子誘導による骨形成過程の未分化な組織から造血支持能を持つ間質細胞の検出を試み、その造血幹細胞の維持能を検討した。

#### 〔方法〕

骨形成因子誘導骨形成: BFO osteosarcoma 細胞より精製した 1mg 骨形成因子を ddy マウス背部の筋膜下にペレットとして植え骨組織を誘導した。骨髄間質細胞株: 誘導骨より骨髄細胞

を取り出し 10% 牛胎仔血清添加 RPMI 1640 培養液に懸濁した後、3カ月間の長期培養により樹立した。培養上清：BMe 細胞を 7 日間培養した上清を用いた。脾コロニー形成法： $1 \times 10^7$  個の骨髓細胞を BMe 細胞と 7 日間共培養し、その後 850 R X 線照射マウスに静注した。静注後 8 日目の脾臓を取り出し固定後脾コロニー数を数えた。リンフォカイン活性：IL-3、IL-6 活性はそれぞれ依存性増殖細胞株 FDC-P2、PIL6 の増殖反応により測定した。CSF 活性及び CFU-C 活性：常法により測定した。

#### 〔結果〕

骨形成因子により誘導された異所性骨組織内における造血：骨形成因子移植後 3 週間目の異所性骨組織を組織学的に調べると、骨梁間に造血を行っている骨髓組織を認めた。異所性骨内に存在する造血幹細胞やその前駆細胞が、分化増殖し骨髓様組織を構築していた。骨髓間質細胞株の樹立：骨形成因子を筋組織内に移植すると、1 週目よりペレット内に侵入してきた未分化間葉細胞が分化し軟骨形成を始め、2 週目にはいると血管の侵入と共に内軟骨性骨化、骨髓形成を認める。そこで骨髓形成を始める直前の 10 日目誘導骨より細胞を分離した。3カ月間の培養ののち付着細胞のみとなり、この細胞より親株 BMe を樹立した。さらに限界希釈法により 5 つの細胞株 (BMe/C10 等) を得た。これらの細胞株は、多角形の付着性細胞で confluent になると敷石状の形態を呈した。また長期培養やハイドロコーチゾンにより oil red O 染色で赤く染まる脂肪滴を持つ様になり、preadipocyte 特有の adipogenesis を誘発することができた。細胞表面抗原の Thy-1、surface-Ig、Mac-1、LFA-1 などは陰性であった。CFU-S 維持能：新鮮骨髓細胞を BMe、BMe/C10 細胞株やその培養上清と共培養した。培養 7 日後の細胞中に残存している CFU-S を検出し、造血幹細胞の維持能の評価とした。細胞株と共培養することにより培養液のみに比べ 8~14 倍と有意に CFU-S が維持されていた。この維持能は培養上清により一部代替でき、細胞による維持能の一部は液性因子によるものであった。CSF 産生能：CSF 活性を骨髓細胞増殖反応で調べたところ、いずれの細胞株でも産生を認めたが、multi-CSF と呼ばれる IL-3 活性は、培養上清中には検出されなかった。BMe/C10 細胞株培養上清について軟寒天培地法によりさらに検討を加えたところ macrophage-colony が全コロニー数の 80% 以上を占め強い M-CSF 活性を認めた。しかし、より未分化なコロニーである mixed-colony も認めた。IL-6 産生能：いずれの細胞株においても無刺激の条件下で培養上清に強い IL-6 活性を検出した。

#### 〔考察〕

骨形成因子誘導異所性骨で認められる骨髓組織の形成は骨組織の誘導に伴うもので、このことは骨と造血系との密接な関係を示唆する。実験結果より造血系の成熟以前より骨髓間質細胞が存在しており、骨髓間質細胞が造血系の支持だけでなく、造血組織の誘導にも大きな役割を果たしていると推測される。造血系に対する骨組織の役割を解析するうえで、異所性骨を誘導する系は

有用なモデルとなると考えられた。また造血系の分化増殖に各種 CSF が働いており骨髄間質細胞がこれらを産生することがわかっている。近年弱い CSF 活性を持つことが判明した IL-6 についても、この骨髄間質細胞株で高率に産生されており、これらサイトカインが造血微細環境において重要な働きをしていると考えられた。

#### 〔結 論〕

造血像の認められない未熟骨組織より造血支持能を持つ細胞株を得た。この細胞株は形態学的にも機能的にも骨髄間質細胞の特徴を有し、造血幹細胞の維持能と CSF、IL-6 産生能を持ち合わせていた。

#### 学位論文審査の結果の要旨

骨髄における造血幹細胞の維持と血液細胞の増殖分化の制御には骨髄間質細胞が重要な役割を担っていると考えられる。しかし、骨髄間質細胞の誘導及びその造血微細環境の形成機構についてはほとんど解明されていない。本研究は、骨髄で造血が起きていることから、骨組織の間質に造血微細環境を保持する能力があるであろうとする仮説のもとに、骨形成因子を筋組織内に投与し、異所性に、人工的に骨を形成せしめ、その骨に誘導される間質組織に造血微環境を保持する能力があるか否か、また、その物質的側面を明らかにしようとした独創的なものである。

著者は、骨肉腫細胞より精製された骨形成因子を ddy マウスの筋膜下に移入し、10日後に形成された骨組織から間質細胞を取り出し、培養し、細胞株 (BMe) 5 クローン を樹立した。この細胞株の特性として、1) 形態的には、線維芽細胞様で、長期培養やステロイド投与により脂肪産生が起り得ること、2) 骨髄中の CFU-S を短期間維持する能力を有し、この機能は培養上清により代替できること、3) 培養上清中に CSF 活性を認め、高い IL6 産生能を有すること、4) IL3 産生はなく、macrophage や lymphocyte の表面マーカーは発見していないことなどが示された。

この実験で、異所性に形成された骨の間質細胞が造血の微細環境の保持能を有することが明らかにされた。この間質細胞は、本来造血に関係のない部位の結合組織に、骨形成に伴って未分化間葉細胞から誘導されたものであると考えられ、その発生には骨組織の存在が必要で、造血微細環境の発生と維持には骨組織からの情報伝達が必要であると考えられた。

本論文は、造血微細環境の保持に関与する間質細胞の分化誘導に初めて成功したもので、細胞の増殖分化とその制御の研究領域や臨床血液学に新しい知見を与えるもので、医学博士の学位論文に値すると認められる。