

Bone marrow transplantation and medulla architecture reconstitution in the murine thymus

(骨髄移植によるマウス胸腺髄質構築の再建)

学位論文内容の要旨

【目的】胸腺上皮細胞は、胸腺内リンパ球の分化と選択において重要な役割を果たす。胸腺上皮は皮質と髄質で起源が異なると同時に、その機能、役割にも差がある。皮質上皮は主として、胸腺リンパ球の正の選択、髄質上皮は負の選択にかかわるとされているが、詳細については不明な点が多い。近年、造血系の幹細胞が、肝臓や心臓に分化 (transdifferentiation) するとの報告がなされ、胸腺上皮細胞についても、骨髄再建によって、ドナー側造血細胞から分化することを示唆する報告が提出された。胸腺上皮細胞は、T 細胞を選択する重要な役割を果たすことから、これらの起源を明確にすることは重要である。

本研究では、EGFP-トランスジェニックマウス(EGFP-Tgm)骨髄細胞を、正常 B6、または髄質に構築異常を示す *aly/aly* マウスに移植することにより、GFP をマーカーとして胸腺上皮細胞の起源を解析することを目的とした。

【方法】B6 マウス、または *aly/aly* マウスに致死量放射線を照射し、EGFP-Tgm の骨髄細胞を成熟T細胞を除いた後移植し、経時的に胸腺再建をフローサイトメトリーと、免疫組織化学によって解析した。これらのキメラをそれぞれ [EGFP-Tgm→B6]、[EGFP-Tgm→*aly/aly*] と表わす。

胸腺髄質上皮細胞は MTS-10、皮質上皮細胞は MTS-5 単クローン抗体で染色した。また最近終末分化をとげた上皮系細胞を同定するため、抗 Foxn 1 抗体を用いた。一部の実験では、*aly/aly* マウスに骨髄細胞と同時に、骨組織も移植した。皮質、髄質の境界を明らかにするため H-E 染色も行った。

最後に、胸腺上皮の微細構造を明らかにするため、走査電子顕微鏡により、キメラ胸腺を観察した。胸腺組織の固定は常法に従った。

【結果と考察】まず、キメラのドナー骨髄由来細胞による再建を、フローサイトメトリーで解析した。[EGFP-Tgm→B6]、[EGFP-Tgm→*aly/aly*] とともに、ほとんど全ての胸腺リンパ球が、FITC 様の GFP 蛍光 (黄) を発しており、ドナー由来であることが判明した。免疫組織化学によっても、胸腺リンパ球がドナー側細胞によって完全に置換されていることが確認された。

次に、胸腺組織より凍結切片を作り、連続切片を観察したところ、[EGFP-Tgm→B6] キメラの髄質の上皮細胞は、MTS-10 で染色された。MTS-5 は上皮全般を染めるが、特に皮質上皮細胞を強染した。髄質の上皮細胞は、MTS-10(赤)と GFP(黄)で二重染色され、merge 像(橙)が得られた。従って、これら髄質上皮細胞が、EGFP-Tgm 骨髄由来であることが強

く示唆された。一方、皮質の上皮細胞は GFP 陰性で、これらは放射線抵抗性のホスト上皮と結論された。

次に [EGFP-Tgm→aly/aly] キメラで同様の解析を行った。一部のキメラは stromal 細胞の再建をよくするため、骨組織も同様に移植したが、骨髓細胞移植のみのキメラと同じ結果が得られた。aly/aly マウスの胸腺髄質は構築異常があり、上皮細胞も MTS-10 で弱くしか染まらないことはすでに報告されている。しかし、[EGFP-Tgm→aly/aly] キメラの髄質上皮細胞は、MTS-10 と GFP 強陽性であった。また、これら髄質上皮細胞は Foxn 1 陽性であった。この実験から、[EGFP-Tgm→aly/aly] キメラの髄質上皮細胞は EGFP-Tgm 骨髓由来で、移植後に上皮細胞へと分化したことが判明した。

[EGFP-Tgm→B6] キメラ胸腺の微細構築を走査電顕で観察したが、正常 B6 のものと変わらず、キメラの胸腺上皮細胞、特に髄質上皮細胞が、形態学的にも骨髓細胞から正常な分化をとげて上皮細胞となったことが判明した。

今回、骨髓中の細胞が、胸腺髄質上皮細胞へと分化することが判明した。しかし、皮質上皮細胞はホスト由来のままであった。恐らく、この違いは報告されているように、両上皮細胞の放射線に対する感受性の差によるものと考えられた。いずれにしても、髄質上皮細胞へと分化するこれら骨髓細胞が造血系の幹細胞か、あるいは骨髓中に少数存在する stromal 細胞の前駆細胞由来かについては、結論を得られなかった。造血系細胞の transdifferentiation によって、胸腺髄質上皮細胞が形成されるか否かの結論を最終的に得るためには、精製した造血幹細胞を移植する実験が必要と思われた。また、肝細胞で報告されているように、ドナー造血細胞とホスト上皮細胞との融合の可能性に関しても、今後より詳細な検証が必要である。

いずれにしても、骨髓移植によって髄質の上皮細胞のみが、ドナー側に置換されるという今回の結果は、これまで骨髓キメラで得られた T 細胞分化と、選択メカニズムを考えると矛盾しない。胸腺内で正の選択を受ける T 細胞は、放射線抵抗性の皮質上皮細胞上の主要組織適合複合 (MHC) 分子に拘束される。一方、胸腺内における自己抗原反応性 T 細胞の負の選択には、骨髓由来の樹状細胞、マクロファージが重要と考えられてきたが、今回の結果は、負の選択に対する髄質上皮細胞の関与を示唆するものである。

さらに、今回の結果は、免疫不全や自己免疫患者の治療として骨髓移植を考慮する際、貴重なデータと考えられた。また、重症筋無力症の患者では、胸腺内の筋様細胞 (myoid cell) の関与が示唆されている。従って、胸腺内筋様細胞が、同様に骨髓幹細胞から分化してくるかは、今後の興味深い問題である。

【結論】 GFP 蛍光を発する骨髓細胞を移植するキメラを用いて、胸腺髄質上皮細胞のみが、骨髓細胞由来のフェノタイプを示すことが判明した。今後、GFP 陽性上皮細胞の産生メカニズムの解析が重要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 大 野 重 昭

学 位 論 文 題 名

Bone marrow transplantation and medulla architecture reconstitution in the murine thymus

(骨髄移植によるマウス胸腺髄質構築の再建)

胸腺上皮は皮質と髄質で起源が異なると同時に、その機能、役割にも差がある。近年、造血系の幹細胞が、肝臓や心筋細胞に分化する(transdifferentiation)との報告がなされ、胸腺上皮細胞についても、骨髄再建によって、ドナー側造血細胞から分化することを示唆する報告が提出された。胸腺上皮細胞は、T細胞を選択する重要な役割を果たすことから、これらの起源を明確にすることは重要である。

本研究では、EGFP-トランスジェニックマウス(EGFP-Tgm)骨髄細胞を、正常 B6、または髄質に構築異常を示す aly/aly マウスに移植することにより、GFP をマーカーとして胸腺上皮細胞の起源を解析することを目的とした。

B6 マウス、または aly/aly マウスに致死量放射線を照射し、EGFP-Tgm の骨髄細胞を成熟T細胞を除去した後移植し、経時的に胸腺再建をフローサイトメトリーと、免疫組織化学によって解析した。これらのキメラをそれぞれ [EGFP-Tgm→B6]、[EGFP-Tgm→aly/aly] と表わす。胸腺髄質上皮細胞は MTS-10、皮質上皮細胞は MTS-5 単クローン抗体で染色した。また終末分化をとげた直後の上皮系細胞を同定するため、抗 Foxn 1 抗体を用いた。胸腺上皮の微細構造を明らかにするため、走査電子顕微鏡により、キメラ胸腺を観察した。

まず、キメラのドナー骨髄由来細胞による再建を、フローサイトメトリーで解析した。

[EGFP-Tgm→B6]、[EGFP-Tgm→aly/aly] とともに、ほとんど全ての胸腺リンパ球が、FITC 様の GFP 蛍光 (黄) を発しており、ドナー由来であることが判明した。

次に、胸腺組織より凍結切片を作り、連続切片を観察したところ、[EGFP-Tgm→B6] キメラの髄質上皮細胞は MTS-10 で染色され、MTS-5 は特に皮質上皮細胞を強染した。髄質の上皮細胞は、MTS-10(赤)と GFP(黄)で二重染色され、merge 像(橙)が得られたが、皮質上皮細胞は二重染色されなかった。従って、髄質上皮細胞は EGFP-Tgm 骨髄由来であるが、皮質上皮細胞は宿主由来と結論された。

次に [EGFP-Tgm→aly/aly] キメラで同様の解析を行った。aly/aly マウスの胸腺髄質は構築異常があり、上皮細胞も MTS-10 で弱くしか染まらないことはすでに報告されている。

〔EGFP-Tgm→aly/aly〕キメラの髄質上皮細胞は、MTS-10 と GFP 強陽性であった。またこれら髄質上皮細胞は Foxn 1 陽性であった。従って、これら MTS-10 陽性、GFP 陽性髄質上皮細胞は、ホスト上皮細胞と EGFP-Tgm 骨髄由来細胞の融合によって形成されたものではないことが判明した。しかし、無処置 aly/aly 胸腺と比べ、髄質上皮細胞数の有意な増加は認められなかった。この実験から、〔EGFP-Tgm→aly/aly〕キメラの髄質上皮も、EGFP-Tgm 骨髄由来で、移植後に上皮細胞へと分化したことが判明した。

〔EGFP-Tgm→B6〕キメラ胸腺の微細構築は、正常 B6 のものと変わらず、キメラの髄質上皮細胞が、形態学的にも骨髄細胞から正常な分化をとげて上皮細胞となったことが判明した。

今回、髄質上皮細胞へと分化するこれら骨髄細胞が造血系の幹細胞か、あるいは骨髄中に少数存在する stromal 細胞の前駆細胞由来かについては、結論を得られなかった。造血系細胞の transdifferentiation によって、胸腺髄質上皮細胞が形成されるか否かの結論を最終的に得るためには、精製した造血幹細胞を移植する実験が必要と思われた。

いずれにしても、骨髄移植によって胸腺髄質の上皮細胞のみが、ドナー側に置換されるという今回の結果は、これまで骨髄キメラで得られた T 細胞分化と、選択メカニズムを考えると矛盾しない。ただ、胸腺内における自己抗原反応性 T 細胞の負の選択には、骨髄由来の樹状細胞、マクロファージが重要と考えられてきたが、今回の結果は、負の選択に対する髄質上皮細胞の関与を示唆するものである。さらに、免疫不全や自己免疫患者の治療として骨髄移植を考慮する際、貴重なデータとなると考えられた。

口頭発表後、副査の大野教授より、なぜ mTEC のみが骨髄細胞で置換されたのか、移植後のキメラの免疫機能、aly/aly マウスに認められる免疫不全症の特徴、ヒトの治療に応用できるか、上出教授より mTEC 欠陥のヒト疾患があるか、骨髄移植後 aly/aly 胸腺の髄質領域の変化、mTEC の食食機能、主査の小野江教授より骨髄細胞から、どのような臓器への細胞分化が報告されているかについて質問があったが、申請者は大概妥当に回答した。

この論文は、胸腺髄質上皮細胞の起源を明らかにした点で高く評価され、今後の臨床応用も期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。