



β -galactosidase of ROSA26 mice is a useful marker for detecting the definitive erythropoiesis after stem cell transplantation

Asari, Sadaki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-09-30

(Date of Publication)

2013-04-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3179

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003179>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 6 3 】

氏 名・（本 籍） 浅利 貞毅 （ 大阪府 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1616号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年9月30日

【 学位論文題目 】

β -GALACTOSIDASE OF ROSA26 MICE IS A USEFUL
MARKER FOR DETECTING THE DEFINITIVE ERYTHROPOIESIS
AFTER STEM CELL TRANSPLANTATION
(ROSA26 マウスの β -ガラクトシダーゼは血液幹細胞
移植後の成体型赤芽球造血を同定する有用なマーカー
である)

審 査 委 員

主 査 教 授 熊谷 俊一
教 授 千原 和夫
教 授 前田 盛

マウスやヒトにおいて、胎児期の造血は卵黄嚢に始まり肝造血を経て、最終的に骨髓造血へと移り変わる。しかし、それぞれの造血期(胚型あるいは成体型造血)の赤芽球系細胞の分化経路や起源に関しては、未だ議論の余地のあるところである。

マウスを用いた実験系において現在まで、血液幹細胞移植後の造血器(骨髓や脾臓など)内での血球系細胞の再構築を解析するためには、Ly5 コンジェニックマウス由来の血液幹細胞を用いて移植を行い、レシピエント側とドナー側の細胞を Ly5 アロタイプマーカーで区別するのが一般的であった。しかし、このシステムは、マクロファージや顆粒球系、リンパ球系細胞の分化や再構築を解析するのに適していたが、ほとんどの赤芽球系細胞には Ly5 抗原が発現していないため、生体内での赤芽球系細胞の分化の解析は極めて困難であった。そして赤芽球系細胞分化の解析は、専ら *in vitro* で組織学的染色により形態学的に行われ、細胞の大きさ、クロマチン凝集やヘモグロビン合成の程度によって判断するのが一般的であった。そのため、骨髓抑制などの病的状態において、生体内の造血器(骨髓や脾臓など)でどのような時期にどれくらいの量の赤芽球系細胞造血がなされているのかを定量的に解析した報告例はなかった。

一方、2001 年に赤芽球の表面抗原である、TER119 と CD71 に対する抗体を用いたフローサイトメトリーによる赤芽球終末分化の定量的解析方法が発表された。赤芽球系細胞はその分化が進むにつれ $TER119^{low}CD71^{high}$ から $TER119^{high}CD71^{high}$ を経て $TER119^{high}CD71^{med}$ となりさらに $TER119^{high}CD71^{low}$ の分画に移動する。これらの細胞分画はそれぞれ形態学的分類である前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球に一致する。そこで、この特異抗体と

フローサイトメトリーを用いた手法と、生体内の全細胞に LacZ (β -galactosidase) タンパクを強発現させた ROSA26 マウス(LacZ トランスジェニックマウス)由来の血液幹細胞を用いて、血液幹細胞移植実験によって成体型赤芽球造血が骨髓や脾臓で経時的にどのように変化するかを、マクロファージや顆粒球造血、リンパ球造血と比較しながら解析を行った。同時に、コントロールとして、Ly5 コンジェニックマウスと全身の細胞にグリーン蛍光色素を発現する GFP トランスジェニックマウスを用いて比較を行った。

その結果、Ly5 コンジェニックマウスと GFP マウス由来のほとんどの赤芽球においては Ly5 や GFP の発現を認めなかったが、ROSA26 マウスの赤芽球のほとんどが β -gal 染色に陽性であった。そこで次に、野生型マウスの骨髓細胞(Ly5.2)と ROSA26 マウスの骨髓細胞(Ly5.2)を同等数、致死量の放射線照射をした野生型マウス(Ly5.1)に移植し、各マウス由来の細胞がレシピエントの野生型マウス内で生着し、赤芽球系細胞、マクロファージや顆粒球系細胞、リンパ球系細胞に分化し再構築されることを確認した。これらの結果から、ROSA26 マウス由来の血液幹細胞を用いることにより、赤芽球系の分化を生体内で追跡できることが示唆された。

以上の予備実験を踏まえて、ROSA26 マウスの骨髓から血液幹細胞(Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺細胞)を採取し、致死量の放射線照射をした野生型マウスに移植を行った。その後、経時的に骨髓や脾臓における赤芽球系細胞の各分画や他の血球系細胞を、それぞれに特異的な抗体とフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、(1) β -gal 染色により成体内でマクロファージや顆粒球系、リンパ球系細胞の分化や再構築が解析できるのと同じように赤芽球系細胞分化につい

でも解析できること。(2) 移植後 2 日目には、脾臓や骨髄内にドナー由来の TER119⁺ 陽性細胞が TER119^{low}CD71^{med} の分画に出現すること。(3) その TER119^{low}CD71^{med} 分画細胞が、成熟するにつれて TER119^{low}CD71^{high}、TER119⁺CD71^{high}、TER119⁺CD71^{med}、TER119⁺CD71^{low} の分画に移動していくことを時間経過とともに追試することができた。従って、TER119^{low}CD71^{med} の分画に赤芽球の前駆細胞が含まれている可能性が示唆されること。(4) TER119⁺CD71^{high} 赤芽球が他の分画の赤芽球細胞よりも絶対数において劇的に増加していること。(5) 骨髄にて B リンパ球造血が同定できるのは移植後 10 日目であり、明らかに赤芽球造血、マクロファージや顆粒球造血より遅れて始まること。(6) この定量的解析により、致死量の放射線照射をした骨髄抑制の状態では、血液幹細胞移植後の急性期（移植後 2 週間から 4 週間）の赤芽球系、マクロファージや顆粒球系細胞の主たる再構築の場は脾臓であり、以後徐々にその機能が骨髄に移っていくことなどを明らかにした。

以上より、ROSA26 マウスに発現している β -ガラクトシダーゼは血液幹細胞移植後の赤芽球造血を同定する有用なマーカーであり、これを用いて致死量の放射線照射をした骨髄抑制状態のマウスに血液幹細胞移植を行い、フローサイトメトリーにより解析を行うことによって、移植後の初期赤芽球造血の主たる場は脾臓であり、その後次第に造血機能が骨髄に移っていくことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1617 号	氏 名	浅利 貞毅
論文題目	β -GALACTOSIDASE OF ROSA26 MICE IS A USEFUL MARKER FOR DETECTING THE DEFINITIVE ERYTHROPOIESIS AFTER STEM CELL TRANSPLANTATION ROSA26 マウスの β -ガラクトシダーゼは血液幹細胞移植後の成体型赤芽球造血を同定する有用なマーカーである		
審査委員	主 査 熊谷 俊一 副 査 千原 和夫 副 査 前田 盛		
審査終了日	平成 16 年 8 月 24 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

生体内の全細胞に LacZ(β-galactosidase)タンパクを強発現させた ROSA26 マウス (LacZ トランスジェニックマウス)を用い、Ly5 コンジェニックマウスと全身の細胞にグリーン蛍光色素を発現する GFP トランスジェニックマウスをコントロールとして、造血幹細胞移植実験とフローサイトメトリーの定量的解析を行うことにより、成体内で赤芽球造血が経時的に追跡できるかを調べた。その結果、 (1)β-gal 染色により成体内でマクロファージ顆粒球系、リンパ球系細胞の分析や再構築が解析できるのと同じように赤芽球系細胞の分化や再構築についても解析できること。 (2)ドナー由来の細胞による赤芽球造血、マクロファージ顆粒球造血が同定できるのは骨髓脾臓とも移植後 7 日目であり、一方、骨髓脾臓にて B リンパ球造血が同定できるのは移植後それぞれ 10、14 日目であり、B リンパ球造血は赤芽球、マクロファージ顆粒球造血より遅れて始まること。 (3)移植後 2 日目には、脾臓や骨髓内にドナー由来の TER119 陽性細胞が TER119^{low}CD71^{med} の分画に出現すること。 (4)その TER119^{low}CD71^{med} 分画細胞が時間経過とともに TER119^{low}CD71^{high}、TER119^{CD71}^{high}、TER119^{CD71}^{med}、TER119^{CD71}^{low} の分画に移動して行くことから、TER119^{low}CD71^{med} の分画に赤芽球前駆細胞が含まれている可能性が示唆されること。 (5)TER119^{CD71}^{high} 赤芽球が他の分画赤芽球よりも絶対数において劇的に増加していること。 (6)この定量的解析により、致死量の放射線照射をした骨髓抑制の状態では、血液幹細胞移植後の急性期(移植後 2 週間)の赤芽球系、マクロファージ顆粒球系細胞の主たる再構築の場は脾臓であり、以後徐々にその機能が骨髓に移っていくこと。などを明らかにした。 本研究は、ROSA26 マウスに発現しているβ-galactosidase を血液幹細胞移植後の成体型赤芽球造血を同定するマーカーとし、致死量の放射線照射をした骨髓抑制状態の	
---	--

野生型マウスに ROSA26 マウスの血液幹細胞移植を行いフローサイトメトリーによる定量的解析を行うことによって、血液幹細胞移植後の急性期(移植後 2 週間)の赤芽球系、マクロファージ構築の場は脾臓であり、以後徐々にその機能が骨髓に移っていくことを明らかにしたものであるが、従来ほとんど行われなかった成体内での赤芽球系細胞の分化経路を解明する上に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。 よって、本研究は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。	
---	--