

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 Kinetics of versican-expressing macrophages in bone marrow after cord blood stem cell transplantation for treatment of acute myelogenous leukemia  
急性骨髄性白血病、臍帯血幹細胞移植療法後の骨髄におけるバーシカン産生マクロファージの動態

氏名 千田 美歩

## 論文内容の要旨

- ① 目的 バーシカンは、様々な組織の主に細胞外基質（extra cellular matrix: ECM）に存在するプロテオグリカンで、遊走、接着、分化、増殖などの細胞に関する重要な働きを制御している。以前の研究から、バーシカンは骨髄にも存在し、化学療法後の再生髄において増加することが分かっていた。そこで我々は、骨髄移植後の骨髄再生においてバーシカンが重要な役割を果たすのではないかと考え、以下の目的について検討を行った。1) 骨髄におけるバーシカン産生細胞を同定する。2) 骨髄再生におけるバーシカンの役割を明らかにするため、急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia: AML）に対して臍帯血幹細胞移植（cord blood stem cell transplantation: CBSCT）を行った症例の骨髄再生過程に着目して、バーシカン陽性マクロファージ数の経時的変化を解析し、バーシカンの骨髄再生における重要性を明らかにする。
- ② 対象および方法 正形成髄 7 例の骨髄クロット検体を用いて、バーシカン産生細胞を同定した。さらに、CBSCT を施行した AML 患者（生着例 18 例 23 検体、生着不良例 4 例 4 検体）に対し、抗バーシカン抗体と抗 CD68 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、骨髄クロット標本における全骨髄細胞数、バーシカン陽性細胞数および CD68 陽性細胞数の変化を経時的に計測した。単位面積当たりの陽性細胞数を計測し、平均値±標準偏差を算出した。移植後 16 日から 55 日に採取された骨髄クロット検体を 4 つの時期（16-25 日、26-35 日、36-45 日、46-55 日）に分類して検討した。細胞数の経時的な変化を解析するとともに、年齢をマッチングした正形成髄の細胞数とも比較、生着不良検体に対しても、同様の検討を行い、統計学的有意差を検討した。

③ **結果** コントロール検体を用いて、抗バーシカン抗体にて免疫組織化学染色を行ったところ、間質に存在するマクロファージと思われる細胞が陽性に染色されたため、抗 CD68 抗体で二重染色を行い、骨髄におけるバーシカン産生細胞がマクロファージであることを確認した。移植後の骨髄における細胞数を経時的に調べると、全骨髄細胞数は、前処置および移植後に減少するが、移植後 16-25 日には回復し、その後も上昇していた。バーシカン陽性細胞数は、移植後 16-25 日のグループにおいてコントロールと比較して有意に増加したのち、減少していた。CD68 陽性細胞数は、移植後一か月間変化はみられないが、移植後 36-45 日ではコントロールに対して有意に減少していた。また、バーシカン陽性細胞数と全骨髄細胞数の間には逆相関が見られた。生着不良例では、年齢や採取日をマッチングした生着例に比べて、バーシカン陽性マクロファージ数が減少していることが分かった。

④ **考察** 以前の研究では、バーシカンは再生髄の細胞外基質に主として陽性となり、骨髄におけるバーシカン産生細胞の候補として骨髄間質細胞、血管内皮細胞、脂肪前駆細胞などを想定していた。今回用いた抗体では、認識するエピトープの違いからマクロファージの細胞質が陽性となり、マクロファージが産生細胞であることが判明した。マクロファージは生理的あるいは様々な病態においても組織環境のモジュレーターとして重要な役割を果たしていることは知られており、骨髄においても重要な機能を有していることが推測される。化学療法後の骨髄再生においてバーシカンの発現が増加することから、バーシカンが骨髄移植後の骨髄再生においても重要な役割を果たしているのではないかと考え、AML の CBSCT 法の検体を用いて、バーシカン産生マクロファージの経時的動態を解析した。

骨髄移植では、幹細胞移植後 2-3 週間で造血幹細胞が生着し、その後活発な造血が起こる。移植後 3 週目の時期は、骨髄移植において、骨髄再生が起こる重要な時期である。今回の検討で、バーシカン陽性細胞数が移植後 3 週目で急激に増加するにも関わらず、全マクロファージ数に変化が見られなかったことを考えると、骨髄に定常的に存在するマクロファージのうちの一部がバーシカン陽性に変化することが推察された。骨髄移植の前処理としての強力な化学療法によって骨髄が傷害され、その後造血幹細胞の定着と骨髄再生が開始されると、バーシカン陰性マクロファージは陽性に転化するのではないかと考えられる。そして生着後にはバーシカン産生マクロファージが消費され、マクロファージ数も減少し、再び定常状態に回復すると予想された。同様の検討を行った生着不良例では、コントロール症例と比較してマクロファージ数に差はないものの、移植後 3 週目にバーシカン陽性細胞数が少ない傾向が観察され、バーシカンが骨髄移植における骨髄再生の重要な因子のひとつであると考えられた。

バーシカンが骨髄再生にどのように関与するのか、その詳細は明らかでないが、ケモカインやミッドカイン、GM-CSF などの造血因子と結合することで、それらの機能を調節し、ECM におけるさまざまな液性因子の足場として働いている可能性が考えられている。今後、詳細なバーシカンの機能を解明していくことで、臨床に対して有益な情報を提供したいと考える。

- ⑤ **結語** 今回の我々の検討で、骨髄におけるバーシカン産生細胞がマクロファージであることが明らかとなり、さらには CBSCT 後の骨髄におけるバーシカン陽性マクロファージ数の経時的観察によって、バーシカンやバーシカンを発現するマクロファージが骨髄再生において重要な役割を果たしていることが示唆された。