

審査の結果の要旨

本研究は造血幹細胞を生体内で標識するために、造血幹細胞に高発現する *Tmtsp* 遺伝子に着目し、蛍光タンパク遺伝子のノックインモデルを作出した。本モデルを用いて造血幹・前駆細胞の運命決定の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. *Tmtsp* 遺伝子のタンパクおよびゲノム構造

Tmtsp は新規の膜貫通分子で、サイトカイン受容体ファミリーである IL-11 受容体遺伝子の膜貫通領域近傍の配列を基に EST database に対する相同性検索により同定された。*Tmtsp* タンパクの機能ドメインは、細胞外にシグナルシーケンス、3 つの Ig-like ドメイン、Thrombospondin-1(TSP1)ドメインを有し、膜貫通部位以降の細胞内領域には既知の機能ドメインはない。*Tmtsp* 遺伝子は 37kb にわたって 8qA2 にコードされ、5 つのエキソンから構成される。翻訳開始コドンはエキソン 2 にあり、その後各エキソンに Ig-like ドメイン、TSP1 ドメイン、膜貫通部位が分配されている。

2. 血液細胞における *Tmtsp* の発現

まず、半定量的 RT-PCR による *Tmtsp* mRNA の血液細胞系列における分布を調査したところ、*Tmtsp* は CD34⁺KSL 造血幹細胞から Lin⁻未分化細胞までに高発現していた。分化抗原陽性細胞の中では、骨髄中の B 細胞や胸腺中の DN 細胞などで増幅が検出され、成熟に伴う発現レベルの低下が示唆された。

続いて、作製した抗 *Tmtsp* 抗体を用いて、タンパクレベルでの発現を調査したところ、RT-PCR の結果と同様、CD34⁺KSL 細胞と CD34⁺KSL 多能性前駆細胞において極めて高い発現が観察された。

このように、*Tmtsp* 遺伝子は造血幹・前駆細胞に特異的に発現することから、蛍光標識の対象とした。

3. *Tmtsp* の血管内皮細胞における発現

Tmtsp mRNA の主要臓器における発現分布を Northern blotting により検討したところ、全ての臓器で mRNA が検出され、肺において最も高い発現を示した。

また、特異的抗体を用いた IHC により、VE-Cadherin 陽性血管内皮細胞に局在していた。さらにマウス脳血管種株の bEND.3 細胞や、ES 細胞由来 VE-Cadherin 陽性内皮細胞にも発現していたことから、*Tmtsp* は造血幹・前駆細胞に加えて内皮細胞特異的に発現していることが示された。

4. 遺伝子ターゲティングによる *Tmtsp*^{Venus/+} ES 細胞およびマウスの作製

Tmtsp 遺伝子の発現を EYFP の活性型変異体である Venus で標識するにあたり、開始コドン近傍の配列を除去し、Venus 及び薬剤選択マーカー遺伝子で置換した。ES 細胞の相同性組み換えは高頻度で起こり、*Tmtsp*^{Venus/+} マウスも樹立できた。この *Tmtsp*^{Venus/+} ES 細胞およびマウスを用い、Venus のシグナルと *Tmtsp* の発現との相関の確認を試みた。

まず、*Tmtsp*^{Venus/+} ES 細胞を Embryoid Body(EB)形成により分化誘導させ、VEGF 存在下で

OP-9 細胞上に播種し、内皮細胞に分化誘導したところ、全ての Venus 陽性細胞が Tmtsp タンパクを発現していた。同時に、抗 Tmtsp 抗体の免疫染色同様、内皮細胞マーカーである VE-Cadherin や CD31 も発現していた。また、EB 形成 7 日目の細胞の FACS によっても Tmtsp タンパクと Venus の発現の相関が確かめられた。さらに、胎齢 15.5 日の胎仔表皮下の CD31 陽性内皮細胞においても Venus が観察されたことから、*in vivo* においても Venus の蛍光が Tmtsp 遺伝子の発現制御下にあることが示された。

5. 発生段階における Tmtsp/Venus の発現

胎齢 8 日前後に相当する、EB 形成 4 日目から顕微鏡下で Venus の蛍光が検出できたことから、血液発生の初期段階から Tmtsp/Venus が発現していると考えられる。

Tmtsp^{Venus/+} ES 細胞由来の EB における Venus の発現を FACS で経時的に観察した。Venus⁺ 細胞は早期 (EB3~4 日) の中胚葉系分化マーカーである Flk-1⁺ 細胞分画中で EB3 日目に初めて検出された。また、胎児期の造血のマーカーである CD41 の発現を検討したところ、EB4~6 日目にかけて Venus⁺ CD41⁺ 細胞が存在した。

このことから、Venus は胎仔中の造血前駆細胞を標識しているとの仮説を立て、Tmtsp^{Venus/+} 胎仔を用いてコロニーアッセイを行った。胎齢 8.5 日および 9.5 日の yolk sac と胎齢 10.5 日の AGM 領域を採取し、OP-9 細胞上で培養したところ、血球コロニー形成細胞は CD41⁺ Venus⁺ 細胞分画に極めて高く濃縮されていた。このことから、Venus は発生段階の造血前駆細胞の有用なマーカーであることが示された。

6. Tmtsp/Venus の成体マウス血液細胞における発現と造血能の相関

FACS による Venus の発現プロファイリングを行った結果、Venus は CD34⁺ KSL 造血幹細胞と CD34⁺ KSL 多能性造血前駆細胞に高発現していた。これらより一段分化した、運命決定した前駆細胞群においては、骨髓球系前駆細胞 (CMP)、顆粒球・マクロファージ系前駆細胞 (GMP)、巨核球・赤血球系前駆細胞 (MEP) の 3 分画において Venus の発現が確認され、その発現レベルは CMP から GMP および MEP への分化に伴い減少した。リンパ球系前駆細胞 (CLP) においても CMP と同程度の発現が観察された。また、B 細胞と T 細胞系列の成熟に伴う蛍光強度の低下も観察された。TER119 や NK1.1 などの分化抗原陽性細胞における発現は検出されなかった。

続いて、Lin⁻ 細胞を Venus で分画し、各分画のコロニー形成能や骨髓移植を試みたところ、コロニーアッセイによる未分化な前駆細胞の指標である HPP-CFC は Lin⁻ Venus^{high} 細胞分画に高度に濃縮され、骨髓移植により実験的に定義される造血幹細胞も同分画にのみ存在した。これらの結果は、Tmtsp/Venus の発現が造血幹細胞および前駆細胞を標識していることを機能的に示すものである。

以上、本論文では、造血幹・前駆細胞を *in vivo* で蛍光標識された、新たな実験モデルを構築し、造血幹細胞生物学の発展に大きく貢献できると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。