

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 小 黒 秀 行

本研究は、造血幹細胞の自己複製において重要な機構と考えられる、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関して、クロマチンの高次構造を制御することで遺伝子発現の抑制維持を行うポリコーム群遺伝子に着目し、造血幹細胞における機能を遺伝子欠損マウスを用いて解析するとともに、レトロウイルスによる造血幹細胞への遺伝子導入によって造血幹細胞の体外増幅の可能性を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ポリコーム群遺伝子 *Bmi1*、*Mel18*、*M33*について、遺伝子欠損マウスの胎仔肝における長期骨髄再構築能を検討した結果、*Bmi1* 欠損マウスは骨髄再構築能を完全に喪失していた。*Mel18* 欠損マウスでは骨髄再構築能のわずかな低下が認められ、*M33* 欠損マウスには異常は認められなかった。
2. *Bmi1* 遺伝子欠損マウスは生後に骨髄細胞や造血幹細胞分画の細胞の進行性の減少が認められ、純化した造血幹細胞のコロニーアッセイにおいて未分化なコロニー形成細胞は著減するとともに、成体骨髄の移植においても骨髄再構築能は認められなかった。これらの現象は、*Bmi1* 欠損造血幹細胞への *Bmi1* 遺伝子の導入により回復することから、*Bmi1* 欠損造血幹細胞の自己複製障害は少なくとも内在的な現象であることが明らかとなった。
3. *Bmi1* 欠損造血細胞において、*Bmi1* の標的遺伝子である *Ink4a* と *Arf* の脱抑制が確認されたことから、*Bmi1*^{-/-}*Ink4a*^{-/-}マウス、*Bmi1*^{-/-}*Arf*^{-/-}マウス、*Bmi1*^{-/-}*Ink4a*·*Arf*^{-/-}マウスを作成し、自己複製障害に回復がみられるか検討した。その結果、*Bmi1*^{-/-}*Ink4a*^{-/-}マウスでは骨髄再構築能の回復が全く認められず、*Bmi1*^{-/-}*Arf*^{-/-}マウスではわずかな回復が認められるのみであった。それに対し、*Bmi1*^{-/-}*Ink4a*·*Arf*^{-/-}マウスでは長期骨髄再構築能は野生型と同程度まで回復していたことから、*Ink4a* と *Arf* を同時に抑制することが自己複製能の維持に必須であることが示された。
4. *Bmi1*^{-/-}*Ink4a*·*Arf*^{-/-}マウス個体において、骨髄細胞数と造血幹細胞数が進行性に減少していたことから、造血幹細胞ニッチの異常を予想し、遺伝子欠損マウスをレシピエントとして野生型の骨髄細胞を移植した。その結果、*Bmi1* 欠損マウスと *Bmi1*^{-/-}*Ink4a*·*Arf*^{-/-}マウスにおいて骨髄再構築が障害されていた。その原因の一つとして、

5. ポリコム群遺伝子を過剰発現することで造血幹細胞の増幅効果が得られるか検討するために、純化した造血幹細胞にレトロウイルスを用いて *Bmi1*、*Mel18*、*M33*、*Mph1*、*Ring1b* をそれぞれ遺伝子導入し、合計 10 日間または 14 日間の体外培養後にコロニーアッセイを行った。その結果、*Bmi1* のみにおいて未分化なコロニー形成細胞数が著明に増幅された。*Mel18* の導入ではわずかな増幅傾向が観察されたが、*Mph1* と *Ring1b* では効果は観察されなかった。*M33* の導入では増殖の低下や分化の亢進が観察され、コロニーはほとんど形成されなかった。体外培養後での骨髄移植の結果、*Bmi1* 導入細胞は野生型と比較して有意に高い骨髄再構築能を示したことから、*Bmi1* の発現・機能操作が造血幹細胞の体外増幅につながる可能性が示された。また、*Ink4a/Arf* 欠損造血幹細胞に *Bmi1* を過剰発現して 10 日間の体外培養を行うと、野生型造血幹細胞と同様に未分化なコロニー形成細胞数が増幅されていたことから、*Bmi1* の過剰発現による造血幹細胞の増幅効果は *Ink4a/Arf* 以外の制御によるものと考えられる。

以上、本論文はポリコム群遺伝子のなかで、*Bmi1* が造血幹細胞においてその自己複製制御分子として機能することを明らかにし、内因性には *Ink4a/Arf* を抑制すること、外因性には *Ink4a/Arf* 以外の制御によって造血幹細胞ニッチの量を維持することで造血幹細胞の維持に機能していることを示した。さらに、*Bmi1* の過剰発現により造血幹細胞の体外増幅効果が得られることを示した。本研究は造血幹細胞の自己複製制御の分子機構の解明に重要な貢献をなすと共に、造血幹細胞の体外増幅法を検討する上で重要な分子基盤を提供するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。