

論文内容の要旨

論文題目 造血幹細胞に及ぼす WAVE2 の影響

指導教員 中内啓光 教授

東京大学医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

・返拓利

幹細胞は 1 個の細胞が分裂の結果 2 種類以上の細胞系統に分化（多分化能）可能であると同時に幹細胞自体も産生可能であり（自己複製能）、結果として自身が絶える事なく生体内の状況に応じて分化、自己複製を調整し必要な細胞を供給する能力をもつ。造血幹細胞も自己複製能力とともに骨髄のニッチと呼ばれる特定の微小環境で骨髄球系、T 細胞、B 細胞など様々な血球へと分化する能力をもっている。この細胞は分離することが比較的容易で倫理的にも問題が少ないことから組織幹細胞の中でも最も精力的に研究され、その高い骨髄長期再構築能は骨髄移植や遺伝子治療など広く臨床の場で用いられている。しかし、未分化性の維持や分化メカニズムが明らかにされていないため *ex vivo* での維持・増幅はほぼ不可能な状況である。これまでの研究から骨髄移植を行った場合、造血幹細胞は骨髄へのホーミング、骨髄ニッチへのロッキング、そして増殖と多方向への lineage 分化 (repopulation) のステップを経て、最終的に長期再構築能力を示すことが知られている。

造血幹細胞の機能は骨髄内で CXCR4、c-Kit、インテグリンを含む統合されたシグナルによりコントロールされているわけだが、これらのシグナルの下流で機能する分子に Rho guanosine triphosphatases (GTPases) がある。Rho family GTPases には Rho、Rac、Cdc42 が属する。Rac と Cdc42 はアクチン重合の初期段階で働き、細胞接着、伸展、移動、そして細胞の形態パターンに必要な分子としてよく知られているほか、胚の発生やがんの転移などにも働く重要な分子である。アクチン重合はインテグリン等に代表される細胞外からの刺激に反応して引き起こされ、1) 細胞の先端端が、糸状

突起（フィロポディア、filopodia）と呼ばれる内部に密なアクチンフィラメントの束を含んだ突起を形成し、2)その後、糸状突起を骨格として、その間を埋めるように葉状仮足（ラメリポディア、lamellipodia）と呼ばれる内部に網目状のアクチンフィラメントを含んだ平滑な辺縁を持った構造へと変化する[12]。Actin related protein 2/3(Arp2/3)複合体はこれらの細胞骨格変化の形成に必須であり、Wiscott-Aldrich syndrome protein(WASP)/ WASP Family Verprolin-homologous protein(WAVE)ファミリータンパク質により活性化される。

WASP/WAVEファミリータンパク質はWASP、N-WASP（Neural WASP）、WAVE1-3（WAVEファミリー分子）の5つのタンパク質からなる。WASPとN-WASPはCdc42によって活性化され、糸状仮足を引き起こすことを、WAVEファミリー分子はRacによって活性化されて、葉状仮足形成を引き起こすことが明らかになっている。

WAVEファミリー分子はRacの下流で葉状仮足形成に必要な不可欠な因子であることが知られている。このことは結果的にArp2/3複合体を活性化し、葉状仮足形成へと変化する。WAVEファミリー分子の上流に位置するRac1とRac2は造血細胞系列に発現しているが、hematopoietic stem and/ or progenitor cells(HSPCs)においてはその機能は区別されている。Rac1欠損 HSPCsは造血系の再構築能や増殖能力が欠けている。一方、Rac2欠損HSPCsは早期生着能力には障害がみられないが、骨髄ニッチでの保持能力が低下していることがあきらかになっている。これらの研究によりHSPCsのホーミング、engraftment、造血幹細胞および前駆細胞の動態を理解するための道を開いたといえるが、造血幹細胞においてRacの下流でどの分子が働いているのかという課題は現在のところ不明である。造血幹細胞にはWAVEファミリー分子のうち、WAVE2のみ発現がみられた。そこでこれまで報告のないアクチン重合と未分化な造血幹細胞においてRacの下流に位置するWAVE2に焦点をあて、どのような分子機能があるかどうかを解析した。

本研究では骨髄、脾臓、胸腺由来の血球細胞における WAVE ファミリー分子の発現解析を行った。また、WAVE2 ホモノックアウトマウスは胎生致死で骨髄から CD34⁺KSL 細胞を分離することが不可能なため、WT マウスにおいて RNAi の手法を用いて CD34⁺KSL 細胞に強く発現している WAVE2 をノックダウンさせた。その後コロ

ニーアッセイで *in vitro* での血球分化障害の有無の検証、cell proliferation assay、cobblestone area-forming assay、*in vivo* では骨髄移植を行い、長期再構築能および早期ホーミング能力解析をおこなった。さらに cell cycle 関連分子の発現解析、phalloidin staining を行った。

本研究によって造血幹細胞において RNAi 法を用い、87%という非常に高いノックダウン効率を得られた。WAVE2 をノックダウンしても造血幹細胞の *in vitro*、*in vivo* における増殖(メチルセルロース、液体培地での培養系)や各血球 lineage への分化障害はみられなかった。しかし、WAVE2 をノックダウンすることにより造血幹細胞の骨髄移植後の生着能力が著しく阻害されていた。これは WAVE2 の上流にある Rac1 欠損 HSPCs の表現型と類似している。さらに WAVE2 をノックダウン造血幹細胞におけるホーミング後の骨髄内での増殖がコントロールと比較して著しく阻害されていることがあきらかになった。Rac1 欠損 HSPCs の解析では骨髄内での増殖阻害があるかどうかは不明だが、骨表面への localization が野生型と比較して軽度に阻害されていることから結果的に骨髄移植後の生着能力障害につながっていると考えられる。また、cell cycle 関連分子の発現を real-time PCR を行って解析したところ、WAVE2 をノックダウンすることによりコントロールと比較して Cyclin D1 の発現がやや減少し、p27^{Kip1} の発現は3倍以上の上昇がみられた。このことにより、骨髄内での cell cycle arrest が起こり、長期再構築能に影響を与えたと考えられたが、PI 染色による cell cycle assay では WAVE2 ノックダウンによる cell cycle arrest は観察されなかった。

WAVE2 ノックダウンをすることで cell cycle 関連分子の発現変化が観察され、なおかつ移植後早期の骨髄内での増殖障害がみられたことから細胞外環境、例えばストローマ細胞などが存在する条件によっては WAVE2 ノックダウンによる造血幹細胞の機能低下が起こるのではないかと考え、cobblestone area-forming assay をおこなった。あらかじめ 6-well plate に 10T1/2 細胞を播種し、50Gy の放射線照射を行った後に 1 well あたり 100 個ずつの GFP 陽性-CD34⁺KSL 細胞をソーティングした。形成された cobblestone area を計数した結果、興味深いことに WAVE2 ノックダウンをすることで形成される cobblestone area の数はコントロールと比較して有意に減少していることが明らかとなった。このことから WAVE2 ノックダウンによって造血幹細胞の機能低下、つ

まりストローマ細胞の下にもぐりこむ能力やもぐりこんだ後の増殖能力に障害が引き起こされることが示唆された。メチルセルロースや液体培地での培養条件では血球細胞の増殖能力は正常であったことから、ここにみられる造血幹細胞の機能低下はストローマ細胞依存性であることが考えられる。

巨核球、血小板においては Rac1 の下流で WAVE2 がエフェクター分子として機能していることが示唆されたため、造血幹細胞においても同様の現象が起きている可能性が考えられる。この仮説が正しいとすれば造血幹細胞において WAVE2 をノックダウンすることで細胞表面のアクチン重合が阻害される可能性がある。そこで phalloidin staining で細胞膜表面に集積する F-アクチンを染色した。スライドガラスに poly-L-lysine と BSA をコーティングした条件では WAVE2 をノックダウンしてもアクチン重合の阻害は観察されなかった。しかし、BSA ではなく fibronectin をコーティングし、細胞外刺激が存在する条件では WAVE2 ノックダウンによりアクチン重合の阻害が観察された。このことは Rac 欠損 HSPCs で観察されたようなアクチン重合障害と表現型が一致する。

本研究では非常に 3 個に 1 個が造血幹細胞である CD34⁺KSL 細胞を使用しており、Rac1 コンディショナルノックアウトマウス解析では造血前駆細胞を使用している。1 匹のマウスから得られる細胞数が CD34⁺KSL 細胞ではマウス 1 匹あたり 1000 個程度ということもあり、解析方法の改良が必要になるが、造血幹細胞において WAVE2 ノックダウンでは Rac1 欠損状態の場合と類似した表現型がいくつか観察されたことから Rac1 の本質的なエフェクターは WAVE2 であることが示唆された。