

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 ・ 返拓利

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 family guanosine triphosphatases (GTPases) がある。Rho family GTPases には Rho、Rac、Cdc42 などが属しており、特に RhoA、Rac1、Cdc42 に関しては精力的に研究が行われてきた。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力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明らかになっている。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。2007 年に著者らの報告によって巨核球からの血小板放出には Rac の下流に存在する WAVE1、WAVE2 がそれぞれ異なった役割を果たすことにより血小板放出を制御しているということが明らかになった。また、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、下記のような結果をえている。

1. マウス骨髄、脾臓、胸腺の各血球 lineage における半定量 RT-PCR を用いた WAVE1、WAVE2、WAVE3 の発現解析を行った結果、造血幹細胞を含む CD34⁺KSL 分画において WAVE2 のみ発現がみられた。また、免疫染色による CD34⁺KSL 細胞の WAVE1、WAVE2、WAVE3 発現解析の結果、RT-PCR 解析の結果と同様 WAVE2 のみ発現がみられたことから、WAVE2 が造血幹細胞において何らかの重要な働きを担っていることが示唆された。

2. WAVE2 ホモノックアウトマウスは血管新生の不良により胎生 10.5 日までに死亡するため、FG12 レンチウイルスベクターに WAVE2shRNA の配列を組み込み、ノックダウンの手法を用いた。ノックダウン効果は 87%という高い効率が得られた。コントロール、WAVE2ノックダウン細胞を用いて *in vitro* メチルセルロースコロニーアッセイを行った結果、コロニーの形成能力、*in vitro* での血球分化能力に関して WAVE2 ノックダウンの影響はほとんどないということが明らかとなった。

3. competitive repopulation assay を行い、WAVE2 ノックダウンによる骨髄再構築能および *in vivo* での血球分化能力について検証した。その結果、WAVE2 ノックダウンすることで骨髄再構築能は著しく低下した。しかし、*in vivo* の血球分化能力に関して WAVE2 ノックダウンの影響はほとんどないということが明らかとなった。

4. 造血幹細胞の移植後早期の骨髄内環境における挙動を解析するため、独自に Early repopulation assay を構築した。コントロールおよび WAVE2 ノックダウンした造血幹細胞を移植し、3 日目、5 日目、7 日目において骨髄細胞を採取し、メチルセルロースで培養を行った。その結果、移植後早期のホーミングには WAVE2 は関与していないが、骨髄生着後の増殖に WAVE2 が関与していることが示唆された。

5. メチルセルロースを用いた培養系では WAVE2 をノックダウンしても血球細胞の増殖能力に影響がないことが明らかとなった。次に液体培地での培養系で WAVE2 ノックダウンによる血球細胞の増殖能力を検証した。その結果、メチルセルロースと同様に液体培地での培養系でも血球細胞の増殖能力に WAVE2 は関与していないことが明らかとなった。

6. cell cycle 関連分子の発現解析を行った。半定量 RT-PCR 解析の結果、WAVE2 ノックダウン造血幹細胞では cyclin D1、p21cip1 の発現量はコントロールと比較して減少していたが、p27Kip1 に関しては 3.1 倍の発現上昇が観察された。Rac1 を欠損細胞では p21Cip1 の発現減少、p27Kip1 の発現上昇が起こるということがすでに報告されているため、この点では WAVE2 ノックダウンと表現型は一致する。また、WAVE2 ノックダウン細胞では cell cycle arrest はおきていないこと

が明らかとなった。

7. 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。その結果、WAVE2 をノックダウンしても cobblestone area は形成されていたが、その数に関してはコントロールと比較して WAVE2 ノックダウンをすることで有意に減少していることが明らかとなった。これにより、ストローマ細胞の存在下では WAVE2 ノックダウンによる造血幹細胞の機能不全を引き起こすことが明らかとなった。

8. 最後に細胞膜表面に集積する F-actin の phalloidin による染色を行った。Rac1 の下流で WAVE2 がエフェクター分子として機能しているのであれば WAVE2 をノックダウンすることでアクチン重合が阻害されるという仮説を立て、実験を行った。その結果、fibronectin のような細胞外基質が存在する条件ではコントロールと比較して WAVE2 ノックダウン細胞ではアクチン重合が阻害されることが明らかとなった。Rac1 欠損においてもアクチン重合が阻害されることも報告されている。

9. まとめると、WAVE2 ノックダウンにより造血幹細胞移植後の骨髄再構築能が著しく低下することが明らかとなった。この現象はストローマ細胞やインテグリンなどに依存する増殖、つまり intra marrow での増殖が阻害されたためと考えられ、この考えを支持する結果が Early repopulation assay である。WAVE2 の上流に位置する Rac1 では Rac1 を欠損することで骨内膜への局在に障害が起こり、そのことが WAVE2 ノックダウンと同様に最終的に骨髄再構築能の低下につながっていると考えられる。

結果的に骨髄再構築能の低下、cell cycle 関連分子の発現様式、アクチン重合の阻害など Rac1 欠損と WAVE2 ノックダウンでは表現型が類似しているため、造血幹細胞においても Rac1 の下流で WAVE2 がエフェクター分子として中心的な役割を担っていることが示唆される。

以上、本論文はこれまで報告のなかった造血幹細胞における Rac1 の下流分子に関して詳細な解析を行った。この論文は造血幹細胞の機能制御につながる知見を見出すことに多大な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。