

論文の内容の要旨

論文題目 マウス造血幹細胞の冬眠状態維持に関わる機能分子の探索および解析

指導教官 中内啓光 教授

東京大学大学院医学研究科

平成 17 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 八代 嘉美

幹細胞とはある特定の組織や臓器を構成する成熟細胞へと分化する「多分化能」と、自己と同じ能力を持った細胞を複製する「自己複製能」を兼ね備えた細胞であり、生体のさまざまな組織に存在し、個体の一生にわたって各々の幹細胞が属する組織を構成する細胞を供給し続けている。個体の一生という長期間にわたり、幹細胞を維持するために、幹細胞には他の分化した細胞にはない特殊な制御機構が備わっていることが考えられており、そのひとつとして、幹細胞が通常の細胞周期から離脱した静止期(G0 期)にあることがあげられる。

これまでわれわれの研究室では、FACS (fluorescence activated cell sorter) を用いて得られる CD34 陰性または弱陽性、c-kit 陽性、Sca-1 陽性、分化抗原陰性 (Lin⁻)

(CD34-KSL)分画細胞中に造血幹細胞が高濃度に存在していることを報告しており、このような手法で濃縮した画分にある細胞を Pyronin-Y や Ki-67 抗体を用いて染色し解析すると、ほとんどの細胞が G0 期に存在していること、BrdU 取り込み実験の結果から、造血幹細胞が 3 週間に 1 度程度の頻度で分裂することを報告しており、造血幹細胞が一定のインターバルの後に細胞周期に入って分裂することで、自分自身と血液前駆細胞を供給するというユニークなシステムを持つことを示した。

しかし *in vitro* において造血幹細胞の培養を行った場合、ある程度の造血活性をもった細胞としてその数を増やすことは可能となりつつあるが、培養中に造血前駆細胞へと分化してしまうものも多く、長期間にわたり造血幹細胞本来の能力を維持したまま増幅を行うことはいまだに困難とされている。*in vitro* において生体内での造血幹細胞の能力を再現できない要因のひとつとして、幹細胞と幹細胞の性質を維持する能力を持つ支持細胞から構成された微小環境“ニッチ”の再現の困難さが挙げられる。

たとえば造血幹細胞が骨表面の骨芽細胞上に存在し、その場において G0 期で維持されているという報告がなされており、ニッチには支持細胞のほか、さまざまな細胞から分泌されたサイトカインや細胞外マトリックス等が存在し、その複雑な調和によって幹細胞の細胞周期調節が行われ、自己複製や分化・増殖が制御されていると考えられている。こうしたニッチにおける幹細胞の細胞周期調節機構を明らかにすることができれば、*in vitro* において造血幹細胞の機能を維持しつつ、増殖の制御を行うことが可能となると考えられる。

われわれの研究室では、サイトカインによる外部からのシグナルが PI3K/AKT 経路におけるリン酸化標的である細胞核内の FOXO 転写因子をリン酸化し、核外への移行を促すことを見出した。このような FOXO 遺伝子の働きは冬眠中のリスや、栄養飢餓状態における線虫の耐性幼虫状態への移行などでも重要な位置を占めていることが報告されている。

FOXO 転写因子は糖・脂質代謝、細胞周期の制御、アポトーシス、寿命・老化等に関連して重要な役割を果たす遺伝子であり、通常は核内に局在し標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、標的遺伝子の発現を亢進させる。この標的遺伝子には細胞周期を調節する $p27^{kip1}$ 、 $p57^{kip2}$ があり、造血幹細胞の細胞周期調節に大きな意味を持つと考えられた。

FOXO 転写因子の標的遺伝子にはアポトーシス関連遺伝子である Bim、TRAIL や Fas Ligand、酸化ストレス消去酵素である Mn-SOD や catalase、DNA 損傷修復に関与する遺伝子である Gadd45 などの遺伝子群があり、これらの発現を抑制することにより多彩な機能を発揮している。また、最近の報告では、FOXO 転写因子のノックアウトマウスを作成すると、造血幹細胞の分化は正常であるが、すぐに枯渇してしまうことが示された。この中で、FOXO 欠損造血幹細胞内では活性酸素種(ROS)が上昇して DNA 障害性が高まっていることや細胞周期が亢進していることが報告されている。

こうしたことから、われわれは造血幹細胞の 3 週間にわたるインターバルをリスの冬眠になぞらえ、『冬眠状態』と呼んでいる。つまり、造血幹細胞の G0 期は単なる細胞周期の停止ということにとどまらず、個体の一生という長期間にわたり幹細胞をプールし続けるために不可欠な抗ストレスシステムとして位置づけているが、こうした冬眠状態の制御を行う機構については明らかになっていない点が多い。

そこで本研究では、造血幹細胞における遺伝子の発現状態を把握するためにプロファイリングを行い(①)、その中で発現が認められ、FOXO 転写因子と密接な関係を持つことが報告されている遺伝子 Sirt1 の造血幹細胞における機能解析を行った(②)。

① ハイスループットシーケンシングを用いた造血幹細胞の遺伝子プロファイリング
造血幹細胞の濃縮法には、我々が報告した CD34⁺KSL 分画のほか、骨髓細胞の Hoechst 33342 を取り込まない細胞群(Side population: SP 細胞)の $c\text{-Kit}^+ \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{Lin}^-$,

Thy1.1^{lo}c-Kit⁺Sca-1^{hi}Lin⁻, c-Kit⁺Sca-1^{hi}Lin⁻Rho^{lo}、そして胎児肝に存在する胎児型造血幹細胞とされる c-Kit⁺Sca-1^{hi}Lin⁻AA4.1⁺など、さまざまな方法が報告されている。このように造血幹細胞の純化技術は向上しているが、造血幹細胞の絶対的な数そのものが少ないために、これらの方法によっても得られる造血幹細胞の個数は少なく、造血幹細胞を用いて生化学的な解析を行うことが極めて困難であった。

こうした造血幹細胞集団ではマイクロアレイによって遺伝子情報が収集されており、Stem Cell Database (SCDb; <http://stemcell.princeton.edu/>)として集約され、ネットワーク上で比較することができるが、現在最も高頻度に造血幹細胞が濃縮されているとされる CD34⁻KSL 分画の細胞はこうしたデータベースに含まれておらず、比較を行うことは出来ない。また、マイクロアレイによる解析はその性質上、新規の遺伝子の発現や発現の低い遺伝子などを確認することは不向きであるといえる。

そこで我々は CD34⁻KSL 画分および SP Lin⁻細胞から cDNA ライブラリーを作成してハイスループットシーケンシングを行うことで、2 種類の純化法による造血幹細胞の発現情報の比較を行うとともに、マイクロアレイ解析で網羅することのできなかった新規の遺伝子や、non-coding RNA 候補配列を得ることを試みた。

それぞれのライブラリーについて、約 9500 の 5' 末端配列をシーケンスし、既存の臓器別遺伝子ライブラリデータベースを用いた *in silico* サブトラクションを行ってハウスキーピング遺伝子を排除後、CD34⁻KSL からは 215 種、SP Lin⁻からは 308 種の造血幹細胞に比較的特異的な遺伝子群を同定した。さらに造血幹細胞において発現する 29 種の mRNA 様 non-coding RNA 候補配列を得た。このような我々のアプローチは、造血幹細胞などの少数細胞における遺伝子プロファイリングを可能とし、また幹細胞生物学にとって有用なデータベースを提供するものと考えられる。

② 造血幹細胞における Sirt1 遺伝子の機能解析

Sirt1 は NAD 存在下で活性化される脱アセチル化酵素であり、さまざまな生物種で高度に保存された遺伝子である。線虫やショウジョウバエ、あるいはマウスでの寿命延長に関与しており、線虫やショウジョウバエにおける Sirt1 ホモログ遺伝子である Sir2 の量や活性を増大させると寿命が延長し、欠失・変異させると短縮することが報告されている。近年の研究により、Sirt1 は細胞に対するさまざまなストレス抵抗性や生存を制御していることが明らかになってきた。たとえば p53 の脱アセチル化を行ってアポトーシスを抑制したり、FOXO 転写因子と結合し、これらを脱アセチル化することで細胞のストレス抵抗性と生存を高めることが示されている。

これまでわれわれの研究室では造血幹細胞の FOXO 転写因子が核内に存在し、造血幹細胞の G0 期維持に寄与していることを報告しており、FOXO 転写因子が造血幹細胞の冬眠機構にとって重要であることを示してきた。①の実験において、CD34⁺KSL 細胞由来、SP Lin⁻細胞由来それぞれのプロファイルで Sirt1 遺伝子が発現していることを見出した。前記の通り Sirt1 は FOXO 転写因子と結合し、細胞のストレス抵抗性に対して重要な役割を果たすとされ、造血幹細胞の冬眠機構にも大きな関わりを持つと考えられた。そこで、本研究では造血幹細胞における Sirt1 遺伝子の生理的な機能についての解析を行った。

Sirt1 を活性化する薬剤であるレスベラトロールを添加して造血幹細胞の培養を行ったところ、p27 などの細胞周期制御因子の転写が亢進し、造血幹細胞の細胞周期の停止が維持されることが明らかとなった。また、遺伝子導入による Sirt1 遺伝子の gain of function によっても p27、p57 などの細胞周期制御に関わる遺伝子の発現の上昇が確認されたほか、MnSOD、catalase といった酸化ストレスのスキャベンジャー遺伝子の発現上昇が確認された。実際に APF 染色によって培養下での Sirt1 導入造血幹細胞内の活性酸素種(ROS)の測定を行ったところ、細胞内の ROS は有意に低下していることが確認された。また、アポトーシス誘導条件下で培養を行った Sirt1 導入造血幹細胞

胞で Annexin V 染色を行ったところ、アポトーシスを引き起こす細胞が有意に減少しており、Sirt1 遺伝子の導入がアポトーシスを抑制していることが確認された。

本研究では、Sirt1 遺伝子が造血幹細胞に存在していることを確認し、造血幹細胞の G0 期維持とストレス抵抗性の亢進に関与していることを示した。この結果は、幹細胞の冬眠は細胞分裂の頻度を低下させてストレスに遭遇する頻度を低下させるというだけでなく、アポトーシス抵抗性遺伝子や酸化ストレスのスキャベンジャーを発現させ、積極的に細胞内の環境を整備するための期間であり、長期間にわたり細胞を供給し続けるために不可欠な期間であることを示唆するものと考えられる。