

## 審査の結果の要旨

氏名 八代 嘉美

本研究は、長期にわたり G0 状態にとどまる造血幹細胞の特徴的な細胞周期に着目し、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生理的な抗ストレスシステムとして捉え、冬眠状態の制御を行う機構を明らかにすることを目的として行われた。その結果、以下のような結果を得ている。

1. 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、CD34<sup>+</sup>KSL 画分および SP Lin<sup>-</sup>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つた新規の遺伝子や、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プ遺伝子を排除後、CD34<sup>+</sup>KSL からは 215 種、SP Lin<sup>-</sup>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。

2. 上記 1. の実験において、CD34<sup>+</sup>KSL 細胞由来、SP Lin<sup>-</sup>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。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カ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。

以上、本論文は造血幹細胞の遺伝子について詳細な解析を行うと同時に、Sirt1 遺伝子が造血幹細胞にストレス抵抗性を与えていることを確認した。本研究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はなく、アポトーシス抵抗性遺伝子や酸化ストレスのスカベンジャーを発現させ、積極的に細胞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すことができた。この結果は、これまで詳細にならなかった造血幹細胞の冬眠機構の機能を明らかにし幹細胞研究の発展に重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。