

# 造血幹細胞の自己複製を誘導する生態学適所の解明



高倉 伸幸  
金沢大学がん研究所

## 1. 私が知りたかったこと

我々は造血幹細胞の試験管内での増幅法の確立を最終的な目標に据え、造血幹細胞の自己複製能、未分化性維持機構といういわゆる幹細胞性がいかなる分子メカニズムにより制御されているのかを解析することを研究のねらいとした。

## 2. 結果

### (1) 造血幹細胞の DNA 複製に関与する遺伝子マウス PSF1 の機能解析

造血幹細胞の自己複製に関わる新規分子を発見するために、未分化造血幹細胞と成熟した血液細胞のサブトラクションから E11 と名付けた新規核内分子を単離し、本分子が酵母において DNA 複製の開始に重要とされてきた Psf1 のほ乳類相同遺伝子であることが判明した。本 PSF1 ノックアウトマウスは造血の生じる前の胎生 6 日前後において全能性幹細胞群である内部細胞塊の増殖停止により致死となり、PSF1 遺伝子が未分化細胞における細胞増殖に必須の役割を果たすことが判明した。造血幹細胞における本分子の機能を判定するために PSF1<sup>+/-</sup>成体マウスを用い 5-FU による骨髄破壊後の骨髄再建能を解析したところ、野生型マウスでは 5-FU 投与後 6 日目には骨髄機能が回復し生存したが、PSF1<sup>+/-</sup>マウスは骨髄機能の回復が遅れ、5-FU 投与後 7 日目には全て致死となった。これは PSF1<sup>+/-</sup>マウス由来の造血幹細胞は 5-FU 投与後の急速な造血幹細胞増殖期において、S/G2/M 期へのエントリーが遅延するために骨髄再建能の回復が遅延することに起因することが判明した。よって、PSF1 は造血幹細胞の増殖機構に関与することが示唆された。これまでの解析では PSF1 は SLD5 と結合し PSF2、PSF3 とも結合して 4 量体を形成することでこれら分子の安定化が誘導されることが判明した (図 1)。

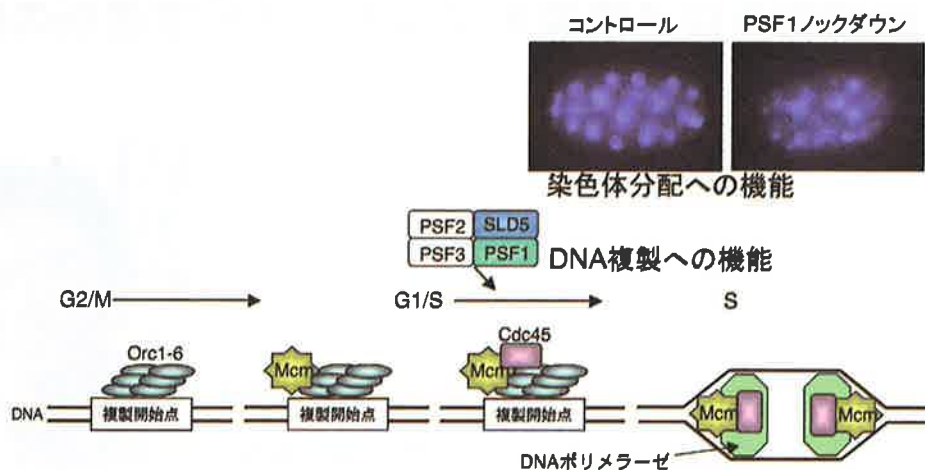


図1 酵母ではPSF1の機能はDNAポリメラーゼのDNA複製フォークへの動員に必須とされるCDC45と会合してDNA複製に関ることが解明されてきているが、ほ乳類ではまだその機能が明らかではない。我々はPSF1がDNA複製に関わるだけでなく、染色体分配にも関与することを突き止めた。写真は*C. elegans*を用いPSF1のノックダウンによって観察される染色体分配異常。

## (2) 造血幹細胞の幹細胞性に関わる基盤分子TIE2の機能解析

造血幹細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、TIE2は、造血幹細胞の分化により発現が消失する。造血幹細胞の骨髄内におけるニッチ（生態学適所）では、造血幹細胞は骨梁の骨芽細胞と接着して未分化な状態が維持されていると考えられてきた。このような状態は骨芽細胞が分泌するアンジオポエチン-1が、造血幹細胞上のTIE2を活性化することにより誘導されているのではないかと示唆されてきた。一方、成体の骨髄では多くの造血幹細胞は静止期にあるのに対し、胎児では造血幹細胞が対数的増殖傾向を示す。そこで、上記TIE2の機能を証明するために、胎児期において造血幹細胞上のTIE2を恒常的に活性化させることで、造血幹細胞の増殖が抑制されるかどうかを解析した。まずTIE2の細胞膜貫通領域直下に点突然変異を挿入し、恒常的活性型TIE2を構築し、本遺伝子をTIE2制御下に発現する条件付きトランスジェニックマウスをCre-LoxPシステムにより作成した。本マウスは胎生12日目に血管新生の抑制と貧血により致死となったが、予想したように、造血幹細胞の発生は認められたがその分化および増殖が抑制されていた（図2）。このことから、成体骨髄における骨芽細胞ニッチにおいてはTIE2の活性化により造血幹細胞の分裂を抑制することで、造血幹細胞の休眠状態を誘導していることが証明された。

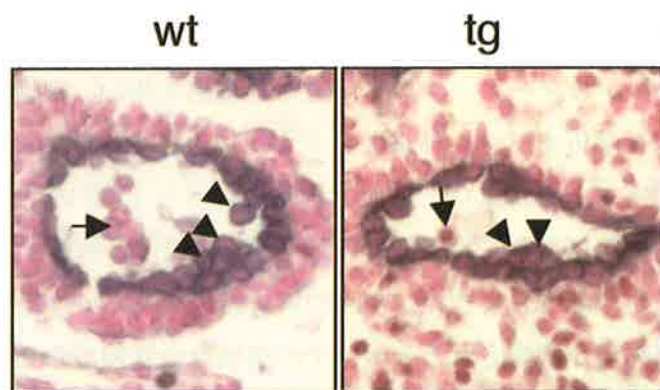


図2 造血幹細胞上のTIE2が恒常的に活性化するコンディショナルトランスジェニックマウスにおける造血幹細胞の増殖・分化。造血幹細胞の発生増殖現場である胎生9.5日目の臍腸間膜動脈。wt(野生型)、tg(トランスジェニックマウス)。Tgでは造血幹細胞の増殖が抑制され(矢頭)、またその分化も抑制されているのが分かる(矢印)。

### (3) 造血幹細胞の接着、細胞死抑制に関与する候補遺伝子、galectin-3の機能解析

上記(2)の結果より、造血幹細胞の幹細胞性(未分化性維持、ニッチ構成細胞への細胞接着)に関わる分子が、造血幹細胞上に発現するTIE2の活性化により制御されていることが証明された。そこでBリンパ球前駆細胞株Ba/F3に恒常的活性型TIE2を発現させ、親株のBa/F3細胞とのサブトラクション法にて発現の上昇する分子に注目して遺伝子の単離を行った。複数遺伝子が単離されたが、その発現量の差が極めて著しいgalectin-3(carbohydrate lectin-3:Gal-3)に関して検討を行った。その結果、Gal-3はTIE2陽性細胞において低酸素時にアンジオポエチン-1の刺激に応じて発現が亢進し、このことにより、またGal-3高発現細胞では低酸素により誘導される細胞死が抑制された。Gal-3を造血幹細胞特異的に過剰発現する、条件付きトランスジェニックマウスを作成し、解析したところ、造血幹細胞の低酸素条件における細胞死の抑制が観察された。

## 3. 考 察

PSF1はある一定の幹細胞群にしか発現していないことは興味深く、特定の幹細胞レベルのみにDNA複製に関するという分子はこれまで知られておらず、幹細胞性における新しい機能解析や概念の創出につながる可能性がある。実際、静止期の造血幹細胞ではPSF1の発現が非常に弱く、増殖期の幹細胞には発現が強いことから、いかなるシグナルがこのPSF1の発現を制御するのかに興味を持たれる。現在PSF1やSLD5の上流領域についての解析を行ない、それぞれ5Kb上流域のプロモーターを単離し、これらのプロ

モーターに EGFP を連結した遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成中である。これらのマウスからソーティングした造血幹細胞を用い、細胞分裂、なかでも自己複製のメカニズムを解析すべく、外来性シグナルによる PSF1 遺伝子の発現制御機構につき詳細にする予定である。また、造血幹細胞における TIE2 の活性化がニッチを制御していることが明らかになり、さらに TIE2 の下流遺伝子の解析から、複数の幹細胞性制御の候補遺伝子が単離されてきた。今回の解析結果である Gal-3 についても、ニッチ領域の幹細胞に高発現が観察される。ニッチの領域は血管領域から離れており、低酸素状態になっていることが予想されることから、このような低酸素抵抗性に造血幹細胞が細胞死から回避するために Gal-3 の機能が利用されていることが予想された。

## 文 献

Ueno M., Itoh M., Kong L., Sugihara K., Asano M., and Takakura N. *PSF1* is essential for Early Embryogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.* In press

Yamada Y., and Takakura N. Physiological Pathway of Differentiation of Hematopoietic Stem Cell Population Into Mural Cells. (in submission)

Okamoto R., Naruse T., Ueno M., Suda T., Takakura N. Silencing of Hematopoiesis and Angiogenesis by the Constitutive Activation of Tie2 (in submission) など