

審査の結果の要旨

氏名 田矢 祐規

本研究はアミノ酸環境が生体内に存在する造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) の未分化性維持にどのような役割を担っているかを明らかにすることを目的とし、アミノ酸欠損培養液および飼料を用いて造血への影響を解析することで、アミノ酸環境の制御によって従来の前処置に代わる新しい造血幹細胞移植方法として応用できるかについて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 骨髄および血清におけるアミノ酸濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定したところ、骨髄中のアミノ酸濃度は血清よりもはるかに高く、構成している各アミノ酸の割合も異なっていた。また、飛行時間型二次イオン質量分析法によるイメージングにて大腿骨におけるアミノ酸分布を調べたところ、多くのアミノ酸は均一に分布する中、 $C_4H_{10}N^+$ イオン種は特定の部位に局在していることが示された。
2. 1種類のアミノ酸を欠損させた培養液を作成し、マウスの HSC が高濃度に濃縮された分画である $CD34^+KSL$ ($c-kit^+$, $Sca-1^+$, $Lineage^-$) 細胞を培養後、競合的骨髄再構築法を行ったところ、システイン (-Cys)、バリン (-Val) 欠損培養液において HSC の増殖は阻害され、長期再構築能が失われていることが示された。造血前駆細胞 ($CD34^+KSL$) における増殖能を調べたところ、-Cys、-Lys 培養液において著明な増殖の抑制を認めたが、-Val 培養液では HSC ほどの抑制を認めなかった。また、ROS 活性との関連を調べるために n-acetyl cystein を加えて HSC を培養したところ、-Cys において増殖抑制が救援されたが -Val では救援されず、酸化ストレスとは別の機序の関与が考えられた。さらに、これらの培養液で 24 時間培養した HSC の遺伝子発現を RNA シークエンスで解析したところ、コントロール培養液と比較して cell cycle、mitosis、cell division、DNA replication の遺伝子セットで発現が低下していることが示された。
3. *in vivo* における造血へのアミノ酸の影響を調べるために、人工合成された complete、バリン欠損 (-Val) 飼料を作成し、マウス骨髄中の HSC 分画 ($CD150^+CD41^-CD48^-KSL$) について経時的に解析したところ、-Val 飼料で飼育したマウスでは HSC の割合が低下していることが示された。また、-Val 飼料と complete 飼料で飼育したマウスそれぞれの骨髄を用いた競合的骨髄再構築法を行い、HSC の機能について評価したところ、移植後 3 か月目に -Val 群でドナー細胞のキメリズムは劇的に低下し、バリン欠乏の影響は前駆細胞よりもむしろ長期再構築能を持つ

HSC に対して大きいことが示唆された。

4. -Val 飼料で飼育したマウスのすべての臓器について病理組織学的な解析を行ったところ、骨髄は細胞数の低下、脾臓、胸腺の著明な萎縮を認めたが、それ以外の臓器では致死的な異常所見は認めなかった。また、-Val 飼料開始と共に徐々に体重は減少したが、complete 飼料へ戻すと速やかに体重は回復し、萎縮していた胸腺、脾臓も元の大きさに戻ることが確認された。
5. 骨髄ニッチ構成細胞としてこれまでに報告のある、骨芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞、間葉系幹細胞を、アミノ酸を含まない培養液で培養後にその上清濃度を HPLC にて測定したところ、すべての細胞でアミノ酸の分泌を認め、特に血管内皮細胞、間葉系幹細胞で主にバリンを分泌していることが示された。
6. 骨髄移植の前処置として放射線照射せずにバリン欠損飼料のみを与えることで移植が可能であるか、C57BL/6 (B6) から B6 へ移植する自家移植の系と B6 から NOD/scid へ移植する同種移植の系で検討したところ、どちらの系でも移植した細胞の生着、長期的な分化血液細胞の出現を認め、移植が成立することが示された。

以上、本論文はマウス骨髄における HSC の未分化性維持にバリンをはじめとしたアミノ酸のバランスが重要であることを明らかにし、バリンを一定期間欠乏させるだけで放射線照射を行わずに造血幹細胞移植を行うことに成功した。本研究はアミノ酸による造血幹細胞の制御機構の解明および免疫不全患者への治療に重要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。