

論文の内容の要旨

論文題目 G0 phase analysis of Hematopoietic Stem Cell in mVenus-p27K⁻ mice
(mVenus-p27K⁻マウスを用いた造血幹細胞のG0期の解析)

氏名 福島 剛

造血幹細胞は自己複製能とすべての血球の再構築能を併せ持つ細胞で、実験的には致死量放射線照射された動物への移植にて長期に全血球の再構築が可能な細胞と定義される。

成体マウスでは造血幹細胞の多くは骨髄に存在し、その多くがG0期であり、定常状態での血球の維持や、出血、炎症などのストレス時に必要な血球の産生を行うと考えられている。

定常状態の造血幹細胞の分裂頻度についてはBrdUによるラベルリテイニングアッセイ、H2B-GFPによるラベルリテイニングアッセイ、Tie2-Creによるトラッキングを用いて110日から170日に1度程度と非常に低いと推測された。またH2B-GFPのラベルリテイニングアッセイでは定常状態の造血幹細胞では2-3ヶ月齢からの9-10ヶ月の間で分裂回数の増加に応じて、徐々に分裂頻度が低下し、4回分裂以後は分裂を生じなくなるという報告もあり、分裂頻度は一定ではなく若年では比較的高く、老年では非常に低くなっている可能性が示された。

トランスポゾンを利用したゲノムバーコード、Poly-loxPを用いたバーコード、Tie2-Creによるリネージトラッキングでは6-8週齢マウスにて26-44週間にて造血幹細胞の分化血球細胞への寄与は低く、より分化した前駆細胞以下の分画が定常状態の血球の維持を行っていると考えられた。一方でPdzk lip1-Creでのトラッキングでは16週間、骨髄球系の細胞、36週間までにリンパ系の細胞への寄与を強く認め、造血幹細胞が定常状態の造血を維持している可能性も示された。

造血幹細胞の休止期から細胞周期への進行がどのように調節されているかについては未だに解明されていない。そのため本研究では以前に当研究室にて作成した新規G0マーカーであるmVenus-p27K⁻を用いて造血幹細胞の休止期から細胞周期への進行の早期に生じる調節機構の解析を行った。

新規G0マーカーであるmVenus-p27K⁻はCIP/KIPファミリーのCDK inhibitorであるp27のCDK binding domainのmutantのp27K⁻に蛍光タンパクのmVenusを融合したものである。p27はCDK inhibitorの一つで、G0期からG1期への進行時に細胞質へ移行したのち、E3 ligase KPCによりユビキチン化され、プロテアソームにより分解される。当研究室では以前にp27を用いた新規G0マーカー開発を行った。p27のCDK binding domainのmutant (p27K⁻)はCDK活性を抑制しないことが知られており、p27K⁻とmVenusの融合蛋白mVenus-p27K⁻を作成し、mVenus-p27K⁻がNIH-3T3にて細胞分裂を抑制することなく、G0期のみをマークすることが示されている。今回我々は、新規G0マーカーをRosa26遺伝子座にノックインしたマウス *Rosa26^{mVenus-p27K-KI/WT}* マウスを作成し、Vav1-Creマウスと交配することで、in vivoの造血幹細胞のG0期の解析を可能にした。

新規G0マーカーがG0をマークしているかを評価するため、mVenus-p27K⁻と既存の細胞周期マーカーの比較を行った。G0マーカー陽性細胞の大部分がKi67⁻であり、血球系細胞においてもG0のみをマークすることが確認された。またG0マーカーはKi67⁻でマークされるG0期

を G0 マーカーの蛍光強度により更に分離することが可能であった。

まず我々は、造血細胞各分画にて G0 マーカーの陽性率を測定した。G0 マーカーの陽性率は造血幹細胞/前駆細胞分画では LT-HSCs にて最も高く、成体マウス骨髄では未分化な分画がより細胞周期が停止しているという報告と一致する所見であった。前駆細胞分画では分化に伴い G0 マーカーの陽性率が増加した。各血球系統においては最終分化が進むにつれて G0 マーカー陽性率が増加し、末梢血ではほぼ 100%が G0 マーカー陽性であった。骨髄球系細胞では後骨髄球にて分裂能を失うという所見とも一致する。また胎児肝臓の LT-HSCs では G0 マーカー陽性率が低く、胎児肝臓では造血幹細胞が急速に増殖していることと一致した。これまでに知られていた造血細胞の細胞分裂頻度と G0 マーカーの陽性率の間には相関がみられた。

まず私は、造血細胞各分画の G0 マーカー陽性率を測定した。G0 マーカーの陽性率は造血幹細胞/前駆細胞分画では LT-HSCs で最も高く、成体マウス骨髄では未分化な分画がより休止期の細胞の割合が多いという報告と一致する所見であった。また造血幹細胞が MPP、CMP、GMP と分化するにつれて、休止期の細胞の割合が減少することが知られており、G0 マーカー陽性率も MPP、CMP、GMP と分化するにつれて減少した。特に MEP では最も低く $11.2 \pm 4.8\%$ であった。赤血球は血液細胞内でも特に産生が多く、その前駆細胞である MEP では急速な分裂が行われていると考えられた。骨髄球系細胞、B 細胞では骨髄での G0 マーカー陽性率が脾臓に比べて低く、T 細胞では胸腺での G0 マーカー陽性率は骨髄、脾臓に比べて低かった。また末梢血の G0 マーカー陽性率はほぼ 100%であった。脾臓の骨髄球系細胞、B 細胞、骨髄、脾臓の T 細胞、末梢血血液細胞は成熟分画であり、各血球とも成熟に伴い G0 マーカー陽性率が増加した。骨髄球系細胞では後骨髄球、B 細胞では Pre-B、T 細胞では double positive 細胞以降で分裂能を失うという所見とも一致する。また胎児肝臓の LT-HSCs では G0 マーカー陽性率が低く、胎児肝臓では造血幹細胞が急速に増殖していることと一致した。これまでに知られていた造血細胞の細胞分裂頻度と G0 マーカーの陽性率との間には相関がみられた。G0 マーカーと R ポイントの関係について、G0 マーカー陽性細胞はすべてが R ポイントに達していない細胞であったが、G0 マーカー陰性細胞には R ポイントに達している細胞と達していない細胞が存在したため、R ポイントは G0 マーカー陰性分画内に存在すると考えられた。

G0 マーカーの発現と再構築能との関係の評価では G0 マーカーの発現の高い細胞で骨髄再構築能が高く、G0 マーカーの発現の低い細胞、陰性の細胞では骨髄再構築能が低かった。以前にも骨髄の PyroninY+2N、PyroninY+4N の細胞周期に進行している造血幹細胞は PyroninY-休止期の造血幹細胞よりも骨髄再構築能が低いという報告があり、このことに加えて、今回、新規 G0 マーカーを用いることで、G0 期の造血幹細胞の中でも既に、G0 マーカーの蛍光強度の低い細胞では骨髄再構築能が低下するということを発見した。次に G0 マーカーの intensity が低い細胞での細胞周期へのプライミングの分子メカニズム解析を試みた。

p27 の分解には ERK、AKT、Src、CDK などによるリン酸化が関与することが知られている。CDK4/6 inhibitor は培養による G0 マーカー発現減少を完全に抑制した。MEK inhibitor、PI3K inhibitor、Src inhibitor、CDK1/2 inhibitor では培養による G0 マーカー発現減少は CDK4/6 inhibitor に比して軽度であった。また G0 マーカーの発現が低い造血幹細胞への CDK4/6

inhibitor treat は G0 マーカーの発現を増加させた。CDK4/6 または CyclinD 群のノックアウトは造血組織の増殖を消失するが、CDK2、CyclinE 群のノックアウトでは定常状態の造血に影響を与えないことが知られており、造血幹細胞では G0 マーカー-High から G0 マーカー-Low/Negative への移行には CDK4/6 活性が必須であり、G0 マーカー-Low では低い G0 マーカーの蛍光強度の維持には CDK4/6 の活性が必須であると考えられた。

しかし in vivo の造血幹細胞では G0 マーカーの蛍光強度が高い造血幹細胞でも既に前駆細胞とほぼ同等の CDK4/6 の活性化を認め、定常状態の造血幹細胞では CDK4/6 活性の抑制以外の因子にて休止期が維持されている可能性が示唆された。

更に定常状態の造血幹細胞の休止期の維持の機構を網羅的に調べるためインヒビターを用いたスクリーニングを行った。1280 種類の化合物のうち in vitro culture による造血幹細胞の G0 マーカーの減少を CDK4/6 inhibitor と同程度に抑制することが可能な化合物が 14 種類ピックアップできた。その内の 2 つに小胞体カルシウム ATPase 阻害薬の Thapsigargin、カルシウムイオノフォアの Calcimysin が含まれた。

Thapsigargin、Calcimysin は共に細胞質内カルシウムを上昇させる作用を有する化合物である。in vivo での造血幹細胞の休止期の維持における細胞質内カルシウムの重要性を評価するため、造血幹細胞のカルシウムの測定を行った。私の測定では LT-HSCs は造血幹細胞/前駆細胞分画内で細胞質内カルシウムが最も高かった。さらに LT-HSCs 内では G0 マーカーの蛍光強度が高い細胞では細胞質内カルシウムが高かく、in vivo においても細胞質内カルシウムの休止期への関与が示唆された。

G0 マーカーの蛍光強度が高い造血幹細胞を細胞質内カルシウム濃度で分離すると、細胞質内カルシウムの高い分画では in vitro での分裂までの時間が長く、移植では骨髄再構築能が高い傾向があった。これより造血幹細胞では細胞質内カルシウム濃度が休止期の制御、幹細胞機能に関与する可能性が示唆された。

細胞質内カルシウムを高く保つ機構が環境因子または細胞自身の内在性機構であるかを検討するため、mVenus-High LT-HSCs 分画の CaSiR-High または CaSiR-Low の HSCs を移植し、16 週後の骨髄での細胞質内カルシウムの測定を行った。CaSiR-High を移植した群では CaSiR-High がみられたが、CaSiR-Low を移植した群ではほとんど見られず、細胞質内カルシウムを高く保つ機構は環境因子ではなく、細胞自身の内在性機構によると考えられた。

本研究で G0 マーカーは Ki67 の G0 期を G0 マーカーの蛍光強度により分離する事が可能であった。造血幹細胞を G0 マーカーの蛍光強度により分離すると G0 期の造血幹細胞の中でも既に、G0 マーカーの蛍光強度の低下に応じて骨髄再構築能が低下するという事を発見した。また G0 マーカーの蛍光強度の高い造血幹細胞では細胞質内カルシウムが高く、細胞質内カルシウムが造血幹細胞にて休止期の維持に関与する可能性が示唆された。