

博士論文(要約)

論文題目 **Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha v \beta 3$**
(Nov/CCN3 は integrin $\alpha v \beta 3$ を介してマウス造血幹細胞の長期骨髄再建能を制御する)

氏 名 石原 純

博士論文の全部または一部が、雑誌掲載等の形で刊行される出版契約が既にされているために全文公表ができない。

主論文に含まれる学術論文について、インターネットでの公開に対する学術雑誌または出版済みの書籍の出版社から使用承認が得られないために全文公表ができない。

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つ血球系の幹細胞である。これらの機能によって、造血幹細胞は一生涯に渡って血球細胞を供給するだけでなく、移植後にレシピエントの体内で長期造血を行うことができる(長期骨髄再建能)。通常、造血幹細胞は骨髄内の”ニッチ”と呼ばれる微小環境に存在し、これらの造血幹細胞の機能が制御されていると考えられている。現在、造血幹細胞ニッチには、integrin 等の接着分子や、Thrombopoietin (TPO), Interferon (IFN) 等のサイトカインの関与が報告されているが、詳細は未だ不明点が多い。

そんな中、我々のグループは造血幹細胞上の integrin $\alpha\beta3$ が生体内における造血幹細胞の維持に寄与することを報告した。そのメカニズムとしては、integrin $\alpha\beta3$ は TPO によって活性化 (リガンドとの親和性の上昇)が誘導されること、TPO 存在下で integrin $\beta3$ のoutside-in signal を誘導すると、骨髄再建能が上昇することを報告した (Umemoto, Ishihara et al., Blood, 2012)。一方、Nephroblastoma overexpressed (Nov) は液性因子であり、ヒト造血幹細胞の培養における Nov タンパク質添加が、長期未分化性維持に寄与することが報告されている (Gupta et al., Science, 2007)。しかしながら、Nov が幹細胞機能を制御するメカニズムは未だ不明である。Nov は integrin $\alpha\beta3$ に結合することが知られていることから、私は、Nov による幹細胞機能の制御に integrin $\alpha\beta3$ が関与する可能性を推測した。本研究では、Nov が造血幹細胞の骨髄再建能を制御するメカニズムを明らかにする。

最初に、Nov と造血幹細胞上の integrin $\alpha\beta3$ との結合を確認するために、造血幹細胞を recombinant mouse Nov (rmNov) と、 α もしくは $\beta3$ integrin それぞれの接着阻害抗体で処理した。造血幹細胞に結合した rmNov の量は蛍光染色後に、フローサイトメトリーで概算した。その結果、TPO 等の存在下において integrin $\alpha\beta3$ の活性化が誘

導されたときのみ、rmNov は造血幹細胞上の integrin $\alpha\beta 3$ と結合することを見出した。この結果は、TPO 存在下において、Nov は integrin $\alpha\beta 3$ との結合を介して造血幹細胞の維持に寄与する可能性を強く支持している。従って、この可能性を確認するために、TPO 存在下で、造血幹細胞の骨髄再建能に対する rmNov の影響を移植実験で検討した。その結果、rmNov 添加下で培養した造血幹細胞は非添加と比べ有意に高い骨髄再建能を示していた。また、rmNov の効果は integrin $\beta 3$ outside-in signaling の阻害によってキャンセルされた。従って、これらの結果から、Nov は TPO 存在下で integrin $\alpha\beta 3$ との結合を介して integrin $\beta 3$ outside-in signaling を誘導し、骨髄再建能を上昇させることが示された。

これまでに、TPO と Nov が造血幹細胞の骨髄再建能制御において関与することを示した。一方、造血幹細胞における Nov の発現は、ノックダウンによって骨髄再建能の低下を誘導することが報告されており、造血幹細胞機能への関与が示唆されている (Gupta et al., Science, 2007)。Nov の mRNA の発現は STAT5 の活性化によって誘導されることが報告されており (Kimura et al., J Bio Chem, 2010)、STAT5 の活性化は、TPO によって強く誘導されることが知られている。このことから、私は TPO が造血幹細胞における Nov の発現にも関与する可能性が考えた。この可能性を Real-time RT PCR で検討したところ、TPO は造血幹細胞における Nov の発現レベルを維持することが確認された。活性化した STAT5 は、Nov のプロモーター領域に存在する interferon-gamma-activated site (GAS site) に結合することが示されており、GAS site が Nov の発現を制御すると考えられている。このことから、私は GAS site をターゲットとする STAT1 もまた Nov の発現に影響する可能性を推測した。従って、STAT1 の活性化を誘導するサイトカインである IFN γ と TPO 共存在下で造血幹細胞を培養し、

Nov の発現を定量したところ、 $\text{IFN}\gamma$ は *Nov* の発現を著しく低下させた。また、STAT1 の活性化を阻害する epigallocatechin gallate (EGCG)によって、 $\text{IFN}\gamma$ の効果がキャンセルされた。これらの結果から、STAT1 の活性化は *Nov* の発現を負に制御することが示唆された。

Nov の発現の抑制に働く $\text{IFN}\gamma$ -STAT1 経路は一般的に、骨髄再建能を抑制すると考えられており、実際に、私も TPO 存在下で $\text{IFN}\gamma$ が骨髄再建能を負に制御することを確認している。従って、Gupta らの先行研究と同様に、私のこれまでの結果は少なくとも TPO 存在下においては、造血幹細胞における *Nov* の発現レベルと骨髄再建能が相関することを示唆している。そこで、私は $\text{IFN}\gamma$ によって抑制される *Nov* の発現を rmNov の添加で補完することによって、骨髄再建能に対する $\text{IFN}\gamma$ の負の制御が軽減される可能性を推測した。従って、次に造血幹細胞を TPO と $\text{IFN}\gamma$ の共存在下において rmNov で処理した後、移植実験に用いて骨髄再建能を検討した。その結果、驚くべきことに、 $\text{IFN}\gamma$ 存在下における rmNov 処理は、骨髄再建能をさらに抑制した。また、この rmNov の抑制効果は integrin $\beta 3$ のノックアウトマウスから得た造血幹細胞ではキャンセルされた。これらの結果は TPO と $\text{IFN}\gamma$ の共存在下では、*Nov* と integrin $\alpha\beta 3$ の結合が、逆に骨髄再建能の抑制に働くことを示している。

以上より、本研究では *Nov* が TPO 存在下で、integrin $\alpha\beta 3$ に結合することで骨髄再建能を制御するというメカニズムを示した。また、TPO のみ存在下では、この結合は骨髄再建能の上昇を誘導した。TPO は、造血幹細胞における *Nov* の発現維持にも寄与していた。これらの結果は、造血幹細胞における *Nov*, TPO, integrin $\alpha\beta 3$ の分子的な繋がりが、骨髄再建能維持に寄与する可能性を示している。一方で、 $\text{IFN}\gamma$ は、TPO 依存的に誘導された *Nov* の発現を低下させただけでなく、*Nov* と integrin $\alpha\beta 3$ の結

合が骨髄再建能に与える影響を負に転換させていた。本研究で示した Nov の integrin $\alpha v\beta 3$ を介した幹細胞制御機構は、骨髄内の TPO 依存的なニッチにおいて、造血幹細胞の機能を調節している可能性が考えられる。