

論文の内容の要旨

造血幹細胞における Wnt シグナルの役割

岡村敏志

<背景>

造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell : HSC) は、全ての血球細胞の基となる細胞であり、多分化能と自己複製能を持つ。HSC の分化と自己複製のバランスは骨髄内のニッチと呼ばれる微小環境によって制御されていると考えられる。ニッチは概念的に定義された言葉であったが、現在までに様々なニッチ構成細胞が提唱されてきた。しかし、HSC の制御機構の詳細は未だ明らかになっていない。HSC の制御機構が解明され、HSC の体外増幅が可能となれば、ドナーに頼らない造血幹細胞移植や血液細胞の安定的供給が可能となると期待されている。

HSC の自己複製は細胞分裂を介して行われる。HSC は *in vitro* において単独では細胞分裂が起こらないことから、外部からのシグナルによって自己複製が誘導されると考えられる。マウス成体 HSC は無血清培地中で、stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO) 存在下で培養すると、効率よく細胞分裂が誘導され、限定的であるが自己複製も誘導されると考えられている。またニッチ構成細胞が明らかになるにつれ、ニッチ細胞特異的に遺伝子を欠損できるように SCF や stromal cell derived factor 1 (SDF-1) を骨芽細胞や血管内皮細胞特異的に欠損させ、ニッチ因子としての効果が解析されている。このように、ニッチ因子を *in vitro* だけでなく *in vivo* で機能や発現細胞を解析できるようになってきた。

HSC の制御機構の一つとして Wnt シグナルと造血幹細胞に関する報告がいくつかなされた。Wnt シグナルは β -カテニン依存的な canonical pathway と非依存的な non-canonical pathway とに大別される。canonical pathway は β -カテニンの核移行を促進し、標的遺伝子の転写を活性化する。non-canonical pathway は β -カテニンを介さない 2 つの経路が知られており、それぞれ Wnt/planar cell polarity 経路と Wnt/ Ca^{2+} 経路と呼ばれる。canonical pathway を活性化する Wnt3a は、*in vitro* で HSC の自己複製を誘導するとの報告がなされた。また Wnt3a 欠損マウスは胎生致死であるが、胎仔肝臓中の HSC は数が少なく、骨髄再構築能が低いという報告もなされている。それに対し、近年 non-canonical pathway が HSC の維持に重要でないかとの報告がなされた。non-canonical pathway を活性化する Wnt5a は canonical pathway を抑制し HSC の骨髄再構築能を *in vitro* で亢進するという報告がなされた。Wnt5a 遺伝子欠損マウスは周産期致死であり、過去には Wnt5a 欠損マウスの解析から Wnt5a は B 細胞の増殖を抑制しているという報告がなされているが、Wnt5a が HSC の自己複製や分化に及ぼす詳細なメカニズムについては未だ

明らかになっていない。

<目的>

これらの背景から、私は Wnt5a が HSC に対する生体制御因であると仮説を立て、Wnt5a による HSC の制御機構を *in vitro* および *in vivo* アッセイによって多角的に解析しようと考えた。そこで本研究の目的は、HSC における Wnt シグナルの役割を解明することとした。

<方法>

in vitro アッセイでは過去の報告と同様に HSC を Wnt5a 存在下、非存在下で培養した後レシピエントに移植することによって評価した。これまでの報告では、培養群を非培養群と比較してしないため試験管内での培養によって HSC の増幅が起こったか適切に評価できていないという問題点があったが、本実験では非培養群をコントロールとして培養群と比較することで培養による HSC の増幅を解析することにした。

in vivo アッセイでは、Wnt5a 欠損マウスおよび Wnt5a コンディショナル欠損マウスの HSC を解析した。Wnt5a 欠損マウスは周産期性致死であるので胎仔肝臓中の HSC を解析した。そして、成体骨髄中 HSC における Wnt5a の役割を明らかにするために、Wnt5a flox/flox マウスと、血球、骨芽細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞特異的に Wnt5a を欠損させる Cre マウスを交配することで、標的構成細胞特異的に Wnt5a を欠損させ、成体骨髄中の HSC を解析した。

<結果>

in vitro のアッセイでは、HSC の培養系である SCF + TPO 条件に Wnt5a を 10 ng/mL の濃度で加えると、SCF + TPO 条件と比較して Wnt5a を添加すると培養後の細胞数を有意に減少したが、培養後の HSC 集団の頻度は有意に上昇した。HSC 集団である CD150+KSL 細胞の絶対数を比較すると両者に有意差はなかった。

in vitro 培養後に行った競合的骨髄再構築アッセイでは、10 ng/mL の Wnt5a の添加は SCF + TPO 条件と比較して一次移植時には有意差を検出できなかったが、二次移植時には SCF + TPO 条件より有意に骨髄再構築能を上昇させた。

in vivo のアッセイでは、はじめに Wnt5a 欠損胎仔肝臓 HSC を用いて研究を行った。胎仔期における Wnt5a の欠損は HSC の数にも骨髄再構築能にも影響を与えなかった。次に、Cre / LoxP システムを用いて Wnt5a をコンディショナルに欠損させ、競合的骨髄再構築アッセイを行った。その結果、Wnt5a を成体骨髄 HSC で欠損させてもコントロール群と比較して有意差を検出することができなかった。確かに RT-PCR において、HSC 画分でも、前駆細胞画分でも、Wnt5a の発現は検出されなかった。そして、骨髄において Wnt5a は血球系細胞ではなく、非血

球系細胞で Wnt5a の発現が検出された。骨切片の蛍光免疫染色の結果、血管内皮細胞および間葉系細胞で発現が検出された。次に非血球系細胞においてコンディショナルに Wnt5a を欠損させる実験を行った。過去の報告を参考に Osterix-Cre、Leptin-receptor-Cre、および Tie-2-Cre マウスを用いた。その結果、骨芽細胞系統（Osterix-Cre 陽性細胞）、間葉系細胞（Leptin-receptor-Cre 陽性細胞）でコンディショナルに Wnt5a を欠損させても HSC 集団の頻度には影響を与えず、HSC の骨髄再構築能にも影響を与えなかった。それに対し Wnt5a を Tie-2-Cre 陽性細胞で欠損させると HSC 集団の頻度が有意に減少し、骨髄細胞の骨髄再構築能が有意に減少することから、Tie-2-Cre 陽性の血管内皮細胞由来の Wnt5a が HSC の維持に重要であると考えられた。

<考察>

HSC の培養系である SCF + TPO 条件に Wnt5a を 10 ng/mL の濃度で加えると、HSC 集団と考えられる 分化マーカー陰性、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性 CD150 陽性細胞の絶対数を上昇させることはできなかった。そして、競合的骨髄再構築アッセイでは一次移植時には有意差を検出できなかったが、二次移植時に Wnt5a 添加群は非添加群により有意差を検出できたことから、Wnt5a は *in vitro* の培養系において造血幹細胞集団の維持に重要であると考えられる。これまで造血幹細胞を *in vitro* で増幅する際、細胞分裂を誘導させる因子に注目が集まってきたが、本研究によって造血幹細胞の分裂をある程度抑制する Wnt5a のような因子が、*in vitro* で HSC 集団を増幅、維持する際に重要になると考えられる。そして、*in vitro* 培養系の結果から Wnt5a の造血幹細胞に対する効果は大きくはないものの、HSC プールを維持するのに必要であると考えられる。

in vivo アッセイにおいて Wnt5a の欠損は胎仔期において HSC の数にも骨髄再構築能にも影響を与えなかったことから、Wnt5a は HSC の発生や運命決定に必須の因子でないと考えられる。また、Wnt5a を成体骨髄 HSC レベルで欠損させてもコントロール群と比較して有意な差を検出することができなかった。Wnt5a 欠損胎仔肝臓 HSC および Wnt5a コンディショナル欠損成体 HSC の移植実験の結果から、血球系細胞における Wnt5a の欠損は胎仔 HSC および成体 HSC には影響が無いと考えられる。

Cre / LoxP システムを用いて特定の非血球系細胞特異的に Wnt5a を欠損させる実験では、Wnt5a を Tie-2-Cre 陽性細胞で欠損させると骨髄再構築能が減少することから、Tie-2-Cre 陽性細胞由来の Wnt5a が HSC の維持に重要であると考えられる。過去の報告によると、ニッチ由来の分泌因子であると考えられる SCF は Leptin 受容体陽性の間葉系細胞と Tie-2 陽性の血管内皮細胞が重要であることが示されたが、Wnt5a に関しては Leptin 受容体陽性の間葉系細胞でなく、Tie-2 陽性細胞が HSC の維持に重要であるということが示された。すなわち、ニッチ構成細胞の種類によって発現するニッチ因子が異なり、HSC 制御の仕方にも違いがあると考え

られる。また Wnt シグナルは局所的に効果を示すことから、HSC は血管内皮細胞に近接して存在していると考えられる。近年、Tie-2 陽性細胞も含まれる動脈性ニッチが HSC の維持に重要であるという報告がなされた。本研究では SCF だけでなく、Wnt5a が Tie-2 陽性細胞から供給され HSC の維持に重要であることが示されたが、それが動脈であるかは明らかでない。これは、動脈特異的に Cre-recombinase を発現させるマウスを用いた欠損モデルによって明らかになると考えられる。