

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 片桐 隆幸
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1023 号
学位授与の日付 令和3年9月21日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Distinct effects of chondroitin sulfate on hematopoietic cells and the stromal microenvironment in bone marrow hematopoiesis.
(造血細胞と骨髄間質のコンドロイチン硫酸は異なる造血調節作用を示す)

論文審査委員 主査 教授 藤井 雅寛
副査 教授 片貝 智哉
副査 准教授 今井 千速

博士論文の要旨

[背景・目的]

骨髄造血においては、間葉系幹細胞や血管内皮細胞といった造血 niche と呼ばれる骨髄微小環境の構成細胞と造血幹細胞・前駆細胞上の分子間相互作用により調節されている。骨髄間質の大部分を占める Extracellular matrix (ECM) は長らく造血支持組織と考えられてきたが、近年造血調節において重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。ECM の主要成分であるグリコサミノグリカン (GAG) は、二糖の繰り返し構造を有する長鎖多糖である。GAG の中でヘパラン硫酸 (HS) やヒアルロン酸 (HA) は、種々のシグナル分子と結合し、免疫細胞の活動を調節することが明らかにされているが、コンドロイチン硫酸 (CS) についてはその骨髄造血における役割については明らかでない。また CS 鎖は、骨髄間質の他に造血幹前駆細胞 (HSPCs) を含む多くの細胞表面に CS プロテオグリカンの形で存在しており造血細胞上の CS 鎖がその機能に与える影響については不明な点が多い。本研究では CS の主要な合成酵素である CS GalNAc-T1 の KO マウス (T1KO) を用いて、造血細胞と骨髄間質に存在する CS の造血調節作用を検証した。

[方法]

8 週齢の WT マウスの脳、末梢血成熟細胞、骨髄 HSPCs (LSK 分画)、血管内皮細胞 (ECs)、間葉系間質細胞 (MSCs) から Total RNA を抽出し、qPCR により CS GalNAc-T1 mRNA 発現量を解析した。骨髄 CS の定量として、8-10 週齢の WT or T1KO マウスの大腿骨をフラッシュして GAG 画分を粗精製し、HPLC 法により CS 鎖の二糖組成分析を行った。骨髄中の HSPCs や、ECs (: CD45⁻, Ter119⁻, CD31⁺, CD144⁺)、MSCs (: CD45⁻, Ter119⁻, CD31⁻, CD144⁻, CD51⁺, PDGFR α ⁺) をフローサイトメトリーにより解析した。また分離した大腿骨を固定処理の上、凍結切片を作成し、抗 Lepin Receptor 抗体および抗 Endomucin 抗体を用いて免疫蛍光染色により血管性 niche 構造の差異を評価した。次に、造血細胞における CS の作用を検証するため、8-10 週齢のレシピエントマウス (CD45.1) に 9Gy 照射後、 2.0×10^6 個の BM MNC を同数の CD45.1 BM MNC で構成された共に競合移植しキメリズムを評価した。また、レシピエントマウスの骨髄 LSK 細胞を Cell sorter を用いて分離、Total RNA を抽出し、RNA-seq にて解析した。骨髄間質における CS の作用を検証す

るため、CD45.1 BM MNC を WT or T1KO レシピエントマウスに移植し、造血再構築能の差異を評価した。

[結果]

T1KO マウスの骨髄 CS は、WT の 2/3 程度に減少を認めた。CSGalNAcT1 は、骨髄の HSPCs と ECs に高発現していたが、MSCs には発現を認めなかった。定常状態において T1KO マウスでは、WT に比し HSPCs が多く存在したが、T1KO マウスの HSPCs は、WT のレシピエントマウスへの連続移植において、再構築能の低下を認めた。RNA-seq により、T1KO HSPCs では IFN- α/β シグナルの活性化と小胞体ストレスに関する遺伝子群の高発現が確認された。一方、T1KO のレシピエントマウスでは、連続移植後に再構築された HSPCs の数が WT レシピエントマウスよりも多かったことから、T1KO の骨髄間質は WT に比し HSPCs の分化・増殖に支持的に働くことが示された。WT と T1KO マウスの骨髄では、血管や MSC の分布に明らかな差異は認めなかったことから、CS の減少は血管性 niche の構造に影響を与えることなく造血機能を変化させることが示唆された。

[考察]

申請者らは HSPCs における CS 量の減少が長期造血再構築能の低下をもたらすことを明らかにした。CS と HS は胚性幹細胞 (ESC) にも発現を認め、特定の系統に分化する際にその発現量が変化することが知られている。本研究結果は、HSPCs の自己複製と分化においてもその量的変化により調節を受ける可能性を示唆している。また反対に、骨髄間質における CS 量減少が移植実験において造血再構築に支持的に働くことが明らかになった。つまり造血細胞自身と骨髄間質において CS が異なる造血調節作用を果たしており、CS は造血細胞と造血 niche のクロストークの key molecule であると考えられる。このことは CS が造血幹細胞移植後の造血回復や、白血病幹細胞の維持機構にも重要な役割を担っている可能性を示唆する。

審査結果の要旨

骨髄造血は、造血 niche と呼ばれる骨髄微小環境と造血幹前駆細胞の相互作用により調節されている。骨髄間質の大部分を占める Extracellular matrix (ECM) の主要成分であるグリコサミノグリカン (GAG) は、二糖の繰り返し構造を有する長鎖多糖である。GAG の中でヘパラン硫酸(HS)やヒアルロン酸(HA)は、種々のシグナル分子と結合し、免疫細胞の活動を調節することが明らかにされているが、コンドロイチン硫酸(CS)については、その骨髄造血における役割については明らかでない。本研究では CS の主要な合成酵素である CS GalNAc-T1 の KO マウス (T1KO) を用いて、造血細胞と骨髄間質に存在する CS の造血調節作用を検証した。

申請者らは造血幹前駆細胞 (HSPCs) における CS 量の減少が長期造血再構築能の低下をもたらすことを明らかにした。また反対に、骨髄間質における CS 量減少が移植実験において造血再構築に支持的に働くことが明らかになった。つまり造血細胞自身と骨髄間質において CS が異なる造血調節作用を果たしており、CS は造血細胞と造血 niche のクロストークの key molecule であると考えられる。このことは CS が造血幹細胞移植後の造血回復や、白血病幹細胞の維持機構にも重要な役割を担っていることを示唆するものであり、博士論文としての価値を認めた。