

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	布施 香子
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 803 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness-monitoring system based on NS-GFP transgene expression (NS-GFP 導入遺伝子の発現量に基づく幹細胞未分化性モニタリングシステムで機能的な造血幹細胞集団を分離する)
論文審査委員	主査 教授 片貝 智哉 副査 准教授 今井 千速 副査 教授 曾根 博仁

### 博士論文の要旨

#### 1. 背景

Nucleostemin (NS) は神経幹細胞をはじめ各種臓器や腫瘍幹細胞など未分化な細胞で発現する核小体タンパク質で、造血組織では造血幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC) 及び前駆細胞で発現が高い。また、体細胞に NS を高発現させるとリプログラミングや脱分化を誘導でき、NS は細胞の未分化性に関わる重要な因子と考えられる。申請者らは生体内の NS 発現をモニターする目的で NS 遺伝子のプロモーター/エンハンサー部位に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (NS/GFP Tg マウス) を作成した。これまでに、このマウスを用いて胎児精巣細胞、肝細胞、神経細胞、脳腫瘍、胚細胞腫瘍で、NS/GFP 発現量に基づいて各種幹細胞集団を分離してきた。また、このマウスを用いた急性骨髄性白血病 (AML) 発症モデルから NS/GFP 高発現の AML 細胞集団を分離、これらの強い白血病発症能力を確認してきた。

HSC は、生涯にわたり全ての血液細胞の源となる細胞で、未分化性を維持したまま増殖する自己複製能と自己複製は不能だが各系統に分化する前駆細胞を生み出す多分化能を兼ね備えた細胞である。過去の検証から、マウスモデルにおいて成体骨髄細胞中の CD34- LSK (Lineage- Sca-1+ c-Kit+) 細胞分画に HSC は極めて高度に濃縮されるとされ、フローサイトメトリー (FACS) で分離できる。さらに CD150・CD48 を組み合わせることで長期再構築能をもつ HSC (CD150+CD48-LSK、long-term HSC: LT-HSC) を純化できる。

ただし、最近のトランスクリプトーム、プロテオミクス、エピジェネティクス解析の結果から、このような細胞表面マーカーが均一で HSC また LT-HSC とされる画分でも機能的には不均一であり、古典的な造血細胞ヒエラルキーに当てはまらない細胞集団が存在することも明らかになっている。

#### 2. 目的

以上の知見から、造血システムは推測されていたよりも複雑であり、これまでとは異なる手法でHSCを解析する必要があるが生じている。今回申請者らはマウス正常造血細胞を用いて、NS/GFP発現量とHSCとしての機能を検討した。

### 3. 方法

NS/GFP Tg マウスから末梢血・脾臓・骨髄細胞を得て解析および移植実験に用いた。細胞表面マーカーによるLSK、HSC、LT-HSCの分離、分化マーカーの解析、NS/GFP発現量の測定はFACSで行った。LT-HSCをNS/GFP発現量で4群に分け、RNA抽出後にマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析と移植実験に使用した。LT-HSCを用いたシングルセル解析では造血幹細胞特有と報告されている9遺伝子の発現とNS/GFP発現量を評価した。

### 4. 結果

#### 1) 造血細胞におけるNS/GFP発現量の評価

NS/GFP発現量はHSC>リンパ球系または骨髄球系前駆細胞>成熟好中球・TおよびBリンパ球の順に高値を示す。LSKをIL-3、IL-6を含む培地で2日間培養し分化を誘導するとNS/GFP発現量は減弱した。次にLSK分画をCD150・CD48の発現量によりLT-HSC、MMP : multipotent progenitor (CD15-CD48-LSK)、hematopoietic progenitor cell :HPC 1およびHPC2 (CD150-CD48+LSK および CD150+CD48+LSK) の4群に分離、比較するとLT-HSCでNS/GFP発現量は最高値を示した。つまり、NS/GFP発現量と血球の分化度は負の相関を示した。

#### 2) NS/GFP発現量と遺伝子発現パターン

LSKをNS/GFP発現量により段階的に4群(NS/GFP 1+, 2+, 3+, 4+)に分離し、網羅的遺伝子発現解析としてGene set enrichment analysis : GSEAにより既知のHSC遺伝子発現パターンと比較した。結果、NS/GFP発現量が高いほどLT-HSCの遺伝子発現パターンと類似性が高かった。LT-HSCのシングルセルqPCRの結果、HSC特有とされる9遺伝子(Vwf、Cdkn1c;p57など)はNS/GFP高値のLT-HSCで発現が高く、NS/GFP低値ではこれらの発現も低値であった。これらの結果はNS/GFP発現量と内在的なHSCの性質との相関を示唆すると考える。

#### 3) NS/GFP発現量とHSCの再構築能の関連

次にNS/GFP発現量がHSCの機能的指標となるか確認するために、NS/GFP 1+~4+のLSKを用いて同系マウスへの移植実験を行った。NS/GFP 3+および4+LSKは高い再構築能を示し、特にNS/GFP4+LSKはBおよびTリンパ球、顆粒球の各系統の細胞に分化した。以上よりNS/GFP発現量とHSCの機能的活動性が連動することが支持された。

#### 4) NS/GFP発現量により機能的HSCを新しく分離する

最後に、HSCの機能的活動性とNS/GFP発現量の意義をさらに検証するために、前駆細胞であるCD34+LSKとCD34+LSKのうちNS/GFP高値(上位1%)の細胞画分を用いて、それぞれ同系マウスに移植した。既報と同様にCD34+LSK自体は長期再構築能を示さなかった一方で、NS/GFP高値CD34+LSKは長期再構築能を示し、この細胞画分は機能的にLT-HSCと同等であることが証明された。

## 5. 考察

これまで HSC は複数の細胞表面マーカーを組み合わせ効率的に分離されてきたが、機能的な HSC 活性は不均一であり、これは HSC 解析上の課題であった。申請者らによる遺伝子発現パターン解析とマウスの移植実験の結果から内在的・機能的な HSC 活性と NS/GFP 発現量は相関した。申請者らの NS/GFP Tg マウスは、これまでと異なる独自のシステムで機能的な HSC をモニタリング可能である。今回、新しい機能的 HSC 画分 (NS/GFP 高値 CD34+LSK 画分) を同定でき、このような機能的活性に着目する方法は今後の HSC 解析の発展に役立つものと考えられる。

### 審査結果の要旨

Nucleostemin (NS) は神経幹細胞をはじめ、各種臓器や腫瘍幹細胞など未分化な細胞で発現する核小体タンパク質であり、造血組織では造血幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC) および前駆細胞において高い発現を示す。HSC は自己複製能と多分化能を兼ね備えており、細胞表面抗原に基づいた分離、解析が行われてきたが、近年のトランスクリプトーム、プロテオミクス、エピジェネティクス解析の結果から、HSC または長期造血再構築能を有する LT-HSC 画分において、細胞表面抗原は均一でも機能的には不均一であることが明らかになってきた。

申請者らは、生体内の NS 発現をモニターする目的で NS 遺伝子のプロモーター/エンハンサー部位に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (NS/GFP Tg マウス) を作成し、マウス正常造血細胞における NS 発現量と HSC の機能に着目した解析を行った。

まず、造血細胞における NS/GFP 発現量の評価において、NS/GFP 発現量と血球の分化度が逆相関することが示された。また、遺伝子発現解析では Gene Set enrichment analysis により、既知の HSC 遺伝子発現パターンと NS/GFP 発現量は連動しており、内在的な幹細胞性との相関が示唆された。次に、NS/GFP 発現量が HSC の機能的指標となるかを確認するために、同系マウスへの移植実験を行い、NS/GFP 高発現細胞が高い再構築能を持つことを明らかにした。最後に、マウス前駆細胞を用いた移植実験により、本来再構築能と持たない前駆細胞画分であっても、NS/GFP 高発現の細胞が長期再構築能を持ち、機能的には HSC であることが示された。これら一連の結果から、NS/GFP 発現量のモニタリングは HSC 機能の指標として有用であると考えられる。

本研究は、これまでと異なる独自のシステムにより機能的 HSC をモニタリングした点において注目に値し、今後の HSC 解析の発展に寄与するものと考えられる。また、新たな機能的 HSC 画分 (NS/GFP 高値 CD34+LSK 画分) を初めて同定した意義は大きく、博士論文としての十分な価値を認める。