

氏名(本籍)	清 ^し 水 ^{みず} なつみ (東京都)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4684号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Identification of Genes Involved in the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells by Microarray Analysis of Stromal Cell Lines (ストローマ細胞株のマイクロアレイ解析による造血幹細胞の多分化能維持に 関与する分子の探索)		
主査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	中 田 和 人
副査	筑波大学准教授(連携大学院)	理学博士	三 好 浩 之
副査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を持つ未分化な細胞であり、すべての血球細胞を個体の一生に渡って供給し続ける。この造血幹細胞を体外で増幅あるいは分化させ、再生医療や遺伝子治療等へ応用することが期待されている。そのためには造血幹細胞の自己複製と多分化能維持に関与する分子を同定し、そのメカニズムを解明することが重要である。造血幹細胞の増殖や分化は、ニッチと呼ばれる骨髄中の微小環境によって制御されていると考えられている。実際、造血幹細胞をある種のストローマ細胞株上で培養すると、多分化能が維持され、ある程度増殖もすることが示されている。本研究では、ストローマ細胞株のマイクロアレイによる遺伝子発現解析により、造血幹細胞の多分化能維持に関与する分子群を同定することを目指した。

OP9, PA6 は *in vitro* で造血幹細胞を支持するストローマ細胞株の代表例であり、これまで多くの共培養実験に使用されてきた。また PA6 は造血支持能力の著しく低下したサブクローンも樹立されている。しかしこれらのサブクローンが *in vitro* 共培養後に造血幹細胞の *in vivo* での長期骨髄再構築能をどのくらい維持できるのかについては不明であった。そこでまず *in vitro* および移植実験による *in vivo* で造血幹細胞の支持能力を確認した。その結果サブクローンでは親株の PA6 や OP9 と比較して確かに支持能力が低下していることがわかった。このことか PA6 サブクローンで発現が低下している遺伝子群の中に造血幹細胞の多分化能維持に関与する遺伝子が含まれているのではないかと仮説を立てた。

次に、各種ストローマ細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析により比較した。今回使用した affymetrix 社の GeneChip アレイは 34000 以上もの遺伝子の解析が可能であるが、PA6 と PA6 サブクロンの遺伝子発現に違いはあまり見られず、PA6 と比較してサブクローンで 2 倍以上発現の低下した遺伝子はわずか 144 遺伝子であった。そのうち OP9 にも発現している遺伝子の中から候補遺伝子 11 個(既知遺伝子 8 個、機能未知遺伝子 3 個)を選択し、その cDNA をレンチウイルスベクターを用いて PA6 S-2 に対して強制発現させることによって、造血支持能力に回復が見られるかどうかを解析した。共培養後の造血幹細胞をメチルセルロース培地でのコロニー形成能により解析した結果、9 遺伝子 (1110007F12Rik,

1200009O22Rik, 2900064A13Rik, IL-6, CD53, Hgf, Ppap2b, Cxc15, IL1rn) を強制発現した場合、未分化な造血細胞の支持能力の回復が認められた。

次に、7 遺伝子 (1110007F12Rik, 1200009O22Rik, 2900064A13Rik, Ccl9, IL-6, Ppap2b, Cxc15) について競合長期骨髄再構築アッセイを行った。その結果、1110007F12Rik, Ppap2b, Cxc15 を強制発現した場合、再構築されたマウスの割合に回復が見られた。その中でも 1110007F12Rik を強制発現した場合には各マウスの血球キメリズムにも顕著な回復が認められ、この遺伝子が造血幹細胞の能力維持に関与することが示唆された。Tmem140 (transmembrane protein 140) と呼ばれるこの遺伝子は、185 アミノ酸からなるロイシンリッチ (23%) なタンパク質をコードしており、Gene Ontology において内在性膜タンパクに分類されるが、機能については全く未知である。この 1110007F12Rik が造血幹細胞の支持能力へ与える影響について、今後さらに解析を進める必要がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位論文において清水氏は多能性を維持した造血幹細胞の樹立のためにストローマ細胞で発現しなければならぬ重要な遺伝子を発見した。造血幹細胞支持能力のあるストローマ細胞と支持能力のないストローマ細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した報告は過去にもあるが、その報告ではかなりの数の遺伝子に発現変化が見られたのとは対照的に、今回の報告では PA6 S-2 で発現の低下が見られた遺伝子はわずか 100 余りであり、造血幹細胞の多分化能維持に関与する可能性のある遺伝子を大幅に絞り込むことができたと言える。今回解析した候補遺伝子の一つである 1110007F12Rik は、PA6 S-2 の造血支持能力の回復に働くことが示されたものの、PA6 サブクローンにおいて発現の低下する遺伝子の中に他にも造血幹細胞の支持に関わる遺伝子が含まれている可能性がある。今後さらに PA6 の造血支持能力に関わる遺伝子の同定を進めて行くことによって、ストローマ細胞による造血幹細胞維持の機構が解明されるものと期待できることから、本学位論文は学問的価値が高いと判断できる。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。