【179】

氏　名（本籍）	野　田　慎　一（三 重 県） （の　だ　しん　いち）
学 位 の 種 類	博　　士（理　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4993　号
学位授与年月日	平成 21 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	**Characterization of Murine Hematopoietic Stem Cells under Various Stress Conditions** （様々なストレス下におけるマウス造血幹細胞の性状解析）

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	筑波大学教授	理学博士	沼　田　　治
副　査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	三　好　浩　之

論 文 の 内 容 の 要 旨

造血幹細胞（Hematopoietic stem cell: HSC）は自己複製能と多分化能を持つ未分化な細胞で，個体の一生にわたって必要とされる血液細胞を供給し続けている。HSC は，*in vitro* 培養，移植や加齢等のストレスにより幹細胞機能の低下が起きることが知られており，HSC の体外増幅が困難であることや個体老化に伴う免疫機能低下や骨髄性白血病の原因であると考えられている。様々なストレス下における HSC の性状変化を理解することは，HSC を利用した再生医療や加齢に伴う疾患への治療にも大きく役立つものと考えられる。本研究では，マウス HSC を用いて，1）*in vitro* 培養，2）加齢，3）ミトコンドリアのエネルギー生産能の低下という 3 つのストレス状況下における HSC の性状変化を解析した。

1）*in vitro* 培養時における HSC の性状解析

HSC は生体内ではその大半が細胞周期の静止期にあり，HSC を体外に取り出して既知のサイトカインや増殖因子等で増殖を刺激して培養すると，増殖とともに分化も促進してしまい，その多くは幹細胞としての能力が失われてしまう。本研究では HSC の *invitro* 培養時における性状変化を詳細に解析するために FACS で単離したマウス HSC（CD34（–）KSL : CD34 陰性・弱陽性，c-kit 陽性，Scal 陽性，分化抗原マーカー陰性の細胞）を 1 個ずつ培養した後，細胞表面抗原の表現型と幹細胞能力（造血再構築能）との関係をクローナルに解析した。その結果，増殖した細胞数は個々のクローン間でかなりの差があり（4 ～ 3846），細胞数が多いほど未分化性の高い KSL 分画の割合は少なくなる傾向がみられた。また，KSL 分画の割合が高いクローンほど造血再構築能が高いことがわかった。さらにいくつかの未分化表面抗原マーカーについて解析を行った結果，幹細胞活性を維持しつつ増殖している細胞（cycling-HSC）は，CD48（–）KSL 細胞分画に含まれることを見出した。CD34（–）KSL（quiescent HSC），CD48（–）KSL(cycling HSC)，CD48（+）KSL（cycling non-HSC）の各細胞のマイクロアレイ解析を行ったところ，CD48（–）KSL 細胞と CD48（+）KSL 細胞の遺伝子発現の違いは CD34（–）KSL 細胞と比較してかなり少ないことがわかり，比較的少数の遺伝子群によって HSC の未分化性が維持されていることが示唆された。これらの結果は，HSC の未分化維持機構の解明，さらには HSC の体外増幅法の開発につながる有用な知見であると思われる。

2）加齢に伴う HSC の増殖能と機能の変化

HSC の自己複製は完全なものではなく，老化に伴う幹細胞機能の低下が知られており，加齢に伴う貧血，免疫機能低下，骨髄性白血病などとの関わりが示唆されている。本研究では加齢に伴う HSC の *in vivo* および *in vitro* における増殖能と幹細胞能力の変化について，細胞表面マーカーを用いて解析した。

その結果，HSC の表現型である CD34（–）KSL 細胞の数は加齢に伴い約 5 倍に増加するが，HSC の個々の能力は 1/5 に低下していることが明らかとなった。マウスに BrdU を連続投与し，*in vivo* での HSC の細胞分裂を調べたところ，老齢マウス（18 ヶ月齢以上）の HSC は若齢マウス（2 ～ 4 ヶ月齢）と比較して細胞分長周期が顕著に遅く，16 週後においても約 20％が BrdU（–）であった。HSC を *in vitro* で一週間培養した後の細胞数の増加では, 老齢と若齢マウスで大きな差はみられなかったが, HSC を含む未分化表現型（CD48（–）KSL）の細胞数が老齢マウスでは約 2 倍に増えていた。一方，*in vitro* 培養で増幅された老齢マウス HSC 由来の未分化表現型細胞の造血再構築能は，若齢マウス HSC 由来のものに比べ大きく低下していることがわかった。以上の結果から，老齢マウスでは HSC の増殖能力が低下するとともに幹細胞能力の低下した未分化表現型の細胞を多く作り出すような機能変化が生じていることが強く示唆された。

3）HSC におけるミトコンドリアのエネルギー生産能低下の影響

ミトコンドリアは，酸素呼吸によりエネルギー（ATP）を生産する細胞小器官であり，細胞の分化や細胞死にも関与していると考えられている。造血組織は HSC から新たな血液細胞が絶えず産生される分化増殖の盛んな組織であるが，ミトコンドリアのエネルギー生産能低下の影響については不明であった。そこでまず，野生型マウスの各分化段階にある血液細胞内の ATP レベルを比較したところ，最も増殖の活発な前駆細胞集団で細胞内 ATP 量が多いことがわかった。さらに欠失変異型ミトコンドリア DNA を持ちミトコンドリアの呼吸機能が低下しているマウスを用いた解析では，定常状態において，細胞内 ATP 量の低下に伴い HSC を含む未分化造血細胞集団および前駆細胞集団の顕著な蓄積が認められた。しかしながら，細胞増殖の低下やアポトーシスの増加といった異常は認められなかった。一方，*in vitro* 培養実験および *in vivo* 移植実験の結果から，強い増殖ストレス下ではミトコンドリアのエネルギー生産能低下によって HSC の増殖能低下や早期枯渇が起きることが明らかとなった。以上の結果から，ミトコンドリアのエネルギー生産は，HSC を含む未分化造血細胞集団から前駆細胞への分化を制御しているとともに急性増殖期における HSC の増殖と維持に重要な役割を持つことが明らかとなった。マウスより寿命の長いヒトではミトコンドリア機能低下による造血機能障害の可能性も考えられ，本研究で得られた知見は 2）の研究とともに高齢期における造血機能低下を理解する上で重要と考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位論文において野田氏は，マウス造血幹細胞を用いて *in vitro* 培養による多分化能維持，加齢，ミトコンドリアのエネルギー生産能の低下という 3 つのストレス状況下における造血幹細胞の性状変化を解析した。その結果，造血幹細胞の多分化能はごく少数の遺伝子によって維持されることそして老化やミトコンドリア呼吸機能低下により, この多分化能に加え増殖能も制限を受けることを明らかにした。これらの知見は，幹細胞の基礎生物学的領域のみならず，ヒトの骨髄移植医療においても有用であり，よって，本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。