| | |
|---|---|
| 氏名（本籍） | 加藤貴康（新潟県） |
| 学位の種類 | 博士（医学） |
| 学位記番号 | 博甲第6240号 |
| 学位授与年月日 | 平成24年3月23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 | 人間総合科学研究科 |
| 学位論文題目 | 転写因子Hes1による急性骨髄性白血病の発症抑制現象の発見とその分子機構の解析 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 主査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 高橋　智 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 医学博士 | 二宮治彦 |
| 副査 | 筑波大学講師 | 博士（理学） | 依馬正次 |
| 副査 | 筑波大学講師 | 博士（医学） | 福島　敬 |


## 論文の内容の要旨

**（目的）**

転写因子 hairy enhancer of split1（Hes1）は様々な組織において幹細胞の維持や細胞分化抑制能を持つことが広く知られている。一方で、慢性骨髄性白血病においては、Hes1の過剰発現が骨髄球を不死化させ、白血病発症を促進するとの報告があるが、同時に、Hes1の上流シグナルと位置付けられるNotchシグナルは骨髄性腫瘍に対して腫瘍抑制的に働くという報告もある。本論文においては、Hes1ノックアウトマウスを用いて造血幹細胞や前駆細胞の機能を明らかにすることを目的とした。また、Hes1ノックアウトマウスを用いてMLL-AF9遺伝子導入によるマウス急性骨髄性白血病モデルを作製することにより、骨髄性白血病幹細胞が維持されるメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

**（対象と方法）**

マウス胎生14.5日のHes1-/-およびHes1+/+胎仔肝から造血幹細胞分画を含むcKit+Sca1+Lineage-分画（KSL）をFACSAriaでソートしコロニー形成能を比較した。次にHes1-/-およびHes1+/+胎仔肝（Ly5.2）を9.5Gyの放射線照射マウスに競合細胞（Ly5.1）と併せて移植し、移植後の末梢血でLy5.2陽性細胞とLy5.1陽性細胞のキメリズムを比較することにより、Hes1により造血幹細胞の骨髄再構築能につき検討した。次にHes1+/+およびHes1-/-胎仔肝より分離した共通骨髄前駆細胞（CMP）に、白血病融合遺伝子であるMixed-lineage leukemia（MLL）-AF9を遺伝子導入し、不死化したMLL-AF9導入CMP細胞を4.5Gyもしくは9.5Gyの放射線照射マウスに移植し、Hes1の白血病発症における影響について検討した。またMLL-AF9導入CMP細胞に関しては、Hes1-/-細胞とHes1+/+細胞についてコロニー形成能、細胞表面抗原、細胞周期、アポトーシス、MLL白血病に関連するmRNAの発現レベルについて比較検討をおこなった。さらにMLL-AF9導入Hes1+/+CMP細胞にdominant negative Hes1（dnHes1）を導入し、不死化した細胞を同様にマウスへ移植し、白血病発症の有無につき検討した。併せてコロニー形成能、表面抗原、細胞周期、アポトーシスにつき解析した。

**（結果）**

Hes1-/-およびHes1+/+KSL細胞のコロニー解析では、2回目以降の継代にてHes1-/-群のコロニー数が有意

に減少していた。Hesl+/+ および Hesl+/+ 胎仔肝細胞を用いて 3 回のマウス継代移植をおこなった。Hesl-/- マウス群は T 細胞キメリズムが有意に低下していたが、総キメリズムについてはコントロール群と有意差がみられなかった。MLL-AF9 導入 Hesl-/-CMP は Hesl+/+CMP と同様に 3 回以上のコロニー継代が可能であり、コロニー数も Hesl-/- 群が多い傾向にあった。細胞株化した両群において細胞表面抗原、細胞周期、アポトーシスに関して有意差を認めなかった。MLL-AF9 導入 Hesl-/-CMP を移植したマウスは移植後 4 ～ 6 週後に 75%が白血病を発症し、62%が死亡した。また dnHesl/MLL-AF9 導入 CMP のコロニー形成能は、mock/MLL-AF9 導入 CMP 細胞と同等であった。細胞表面抗原、細胞周期やアポトーシスに有意差を認めなかった。dnHesl/MLL-AF9 導入 CMP 移植マウスは 6 週から 10 週にかけて全マウスが白血病を発症し死亡したが、mock/MLL-AF9 導入 CMP 移植マウスは 12 ～ 18 週で 70%が白血病を発症し死亡した。白血病を発症した dnHesl/MLL-AF9 導入 CMP 移植マウス骨髄を採取し 2 次移植を行ったが、2 次移植マウスは 4 週以内に白血病を発症して死亡した。MLL 白血病に関連する mRNA の発現レベルは、細胞株化した MLL-AF9 導入 CMP において、Meisl の発現が Hesl-/- 群で Hesl+/+ 群と比較し有意に上昇していた。HoxA9 の発現レベルは両群で有意差を認めなかった。

**(考察)**

Hesl は分裂期に戻ることのできる可逆的な静止期を長期に渡って維持するために必要であることが示されており、Hesl が造血幹細胞をはじめとする各種幹細胞の維持や分化に与える作用に注目が集まりつつある。Hesl-/- 胎仔肝を用い 3 回の継代移植を行ったが、Hesl は造血幹細胞の維持や自己複製能に影響を与えなかった。今回の実験により、Hesl ノックアウトマウス胎仔肝においても、Hesl は造血幹細胞における自己複製や維持に必須ではないことが示された。

これまでの Notch シグナルと T 細胞性白血病などの造血器腫瘍に関連する報告から、Hesl が白血病幹細胞の発症や維持に必須であると予想された。しかし、Hesl の欠損により白血病が早期に発症した本研究の結果から、MLL-AF9 急性骨髄性白血病において、Hesl が腫瘍抑制因子として作用していると考えられる。2011 年になり、造血器腫瘍である慢性骨髄単球性白血病において Notch シグナルが腫瘍抑制因子として働いているとの報告がなされた。Hesl は、白血病幹細胞の分化段階や細胞系統の違いによって、癌遺伝子として機能する場合と腫瘍抑制因子として機能する場合があることが示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究から、胎仔肝由来の造血幹細胞の維持に Hesl は必須ではないことが明らかになった。また Hesl は、Meisl の発現を抑えることで MLL-AF9 急性骨髄性白血病に対して腫瘍抑制的に働くことが示された。本論文は、Hesl の機能の二面性を示したものとして、高く評価される。

平成 23 年 12 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。