

氏名	佐々木 達哉		
学位の種類	博 士 (生物工学)		
学位記番号	博 乙 第 2796 号		
学位授与年月日	平成 28年 7月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Extrinsic Regulation of Mouse Hematopoietic Cell Clusters during Early Embryogenesis (胎生期マウス造血細胞クラスターの外的制御)		
主査	筑波大学教授	農学博士	深水 昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	木村 圭志
副査	筑波大学講師	博士 (農学)	石田 純治

論 文 の 要 旨

造血幹細胞は、自身を取り囲む“ニッチ”と呼ばれる微小環境により制御されている。マウス個体発生において、造血幹細胞は大動脈・生殖隆起・中腎を形成する AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域及び胎盤で発生することが知られているが、これらにおける造血幹細胞のニッチによる制御の詳細は不明である。

著者はまず、マウス胎盤造血細胞とそのニッチを組織学的に観察するため免疫染色を行い、胎盤造血細胞が AGM 領域と同様に、造血幹細胞マーカーを発現する細胞集団である造血細胞クラスターを形成し、血管内皮細胞に隣接することを明らかにした。この制御機構を解明するため、レーザーマイクロダイセクション法により胎盤造血細胞クラスター周囲のニッチ細胞を直接採取し、このニッチ細胞におけるサイトカインの遺伝子発現を検討したところ、*Kitl* (*kit ligand*) 遺伝子が優位に発現していた。次に、ニッチ細胞の本態を同定するためフローサイトメトリー法により胎盤の血管内皮細胞と間葉系細胞を単離し、同様にサイトカインの発現を検討したところ、*Kitl* は血管内皮細胞に優位に発現していた。*Kitl/c-Kit* シグナルを阻害する抗 *c-Kit* 中和抗体をマウス胎仔の心臓に直接注入し、胎盤造血細胞クラスターにおける *Kitl/c-Kit* シグナルの役割を検討した。その結果、中和抗体注射群では胎盤造血細胞クラスターでの造血発生に必須の転写因子群 *Runx1*、*c-Myb*、*Gata-2* の遺伝子発現がコントロールと比較して低下していたことから、*Kitl/c-Kit* シグナルが胎盤造血細胞クラスターの発生を制御している事が明らかになった。

一方で、中和抗体注射群における遺伝子抑制効果は 20~30%程度であり、造血細胞クラスターの制御には *Kitl/c-Kit* シグナル以外の因子も関与する事が示唆された。そこで、別の制御因子を同定するた

め、胎盤と同様の造血細胞クラスターを形成する AGM 領域の中腎に着目し、中腎に発現が認められる *Sall-1* 遺伝子に GFP をノックインした *Sall-1* GFP Transgenic マウスを利用して、その制御メカニズムを検討した。GFP の発現を指標として中腎細胞をフローサイトメトリーにより単離し、中腎におけるサイトカインの発現を検討したところ、*Csf1* (*Colony stimulating factor 1*) 遺伝子の高発現が認められた。また、AGM 領域の造血細胞クラスターでは *Csf1* の受容体 (*Csf1r*) の発現が認められたことから、中腎から分泌される *Csf1* がそのレセプターである *Csf1r* を発現する造血細胞クラスターを制御する可能性が示唆された。造血細胞クラスターにおける *Csf1/Csf1r* シグナルの役割を検証するため、骨髄系細胞分化に必須の転写因子である *Spic* と *Cebpa* の遺伝子発現を測定したところ、*Csf1r* 陰性の造血細胞クラスターと比較して *Csf1r* 陽性の造血細胞クラスターにおいて *Cebpa* の発現が有意に高かった。また、造血コロニーアッセイを行ったところ、*Csf1* 存在下で CFU-GM (顆粒球マクロファージコロニー形成単位) 及び CFU-M (マクロファージコロニー形成単位) が増加した。以上より、中腎から分泌される *Csf1* が AGM 領域の造血細胞クラスターに発現する *Csf1r* に結合することで、骨髄前駆細胞への分化を制御することが示唆された。

審 査 の 要 旨

造血幹細胞は、全系統の血球に分化する多分化能とともに、自己複製能を有する細胞と定義される。胎生期において造血幹細胞は AGM 領域及び胎盤にて発生するが、これらのニッチ制御の解明は発展途上であった。

著者はまず、胎盤造血細胞のニッチ制御機構を検討した。胎盤ではニッチ細胞特異的なマーカーが同定されていないことから、フローサイトメーターによりニッチ細胞を単離して解析することは困難であった。そこで、著者は造血細胞クラスターの周囲の細胞をレーザーマイクロダイセクション法により直接採取した。本サンプルにおける造血系サイトカインの遺伝子発現を検討したところ、*Kitl* のみが発現しており、ニッチの本態が血管内皮細胞であることを明らかにした。

さらに著者は、AGM 領域における造血細胞のニッチ制御機構も検討した。*Sall-1* GFP Transgenic マウスを利用して、中腎細胞をフローサイトメトリーにて単離したところ、中腎細胞が *Csf1* を発現することを明らかにした。また、AGM 領域の造血細胞クラスターはそのレセプターである *Csf1r* を発現することを示した。骨髄系細胞分化に必須の転写因子の遺伝子発現解析及び造血コロニーアッセイの結果から、中腎から分泌される *Csf1* が造血細胞クラスターの骨髄前駆細胞への分化を制御する可能性を示した。中腎がサイトカインにより、AGM 領域の造血細胞クラスターの分化を制御する現象は新規性の高いものである。

これらの研究成果は、多能性幹細胞から造血幹細胞を生体外で誘導する技術の開発のための研究に有用な示唆を与える研究と評価出来る。

平成 28 年 1 月 18 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員の出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるのに十分な資格を有する者として認める。