

論文概要

論文題目

Nestin 陽性細胞における Notch シグナルが骨髄
内造血及び髄外造血に与える影響

指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 千葉滋 教授

所属 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

氏名 坂本 竜弘

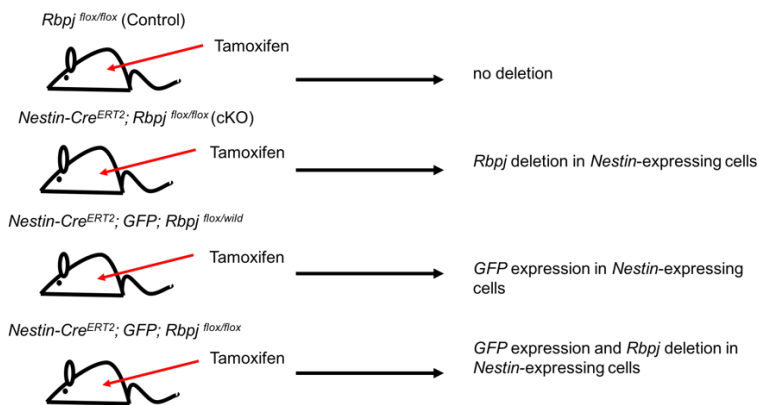
目的：

造血幹細胞を支持する骨髄内の造血微小環境（造血幹細胞ニッチ）を構成する細胞の1つとして Nestin 陽性細胞がある。Nestin は元々神経幹細胞のマーカーとして発見された分子であり、神経幹細胞の分化及び神経組織の発生に重要なシグナル伝達経路として Notch シグナル系が挙げられる。これらの知見から骨髄内の Nestin 陽性細胞の分化・発生に関しても Notch シグナルが重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。

この仮説を立証するため、骨髄の Nestin 陽性細胞において Notch シグナル系に非常に重要な転写因子 *Rbpj* を選択的に欠失させるマウスモデルを用いて、骨髄内 Nestin 陽性細胞における Notch シグナルが造血に与える影響について解明することが本研究の目的である。

対象と方法：

CreERT2-loxP システムを用いてタモキシフェン投与によって Nestin 陽性細胞特異的に *Rbpj* を欠失させたコンディショナルノックアウトマウスを用いて解析を行った。また Nestin 陽性細胞の同定・解析のため Cre recombinase 存在下で *GFP* を発現するように遺伝子改変したマウスも同時に解析した（下図）。

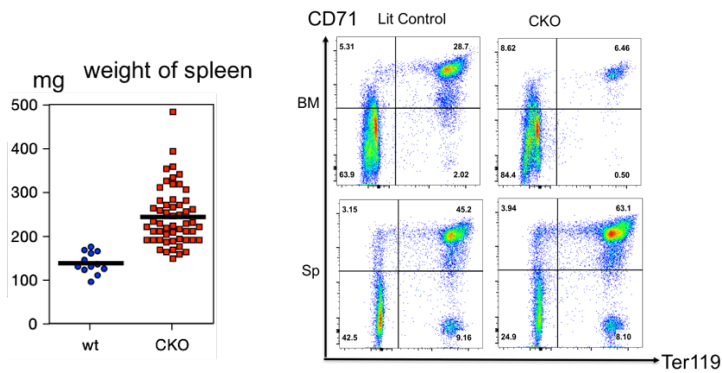


次にコンディショナルノックアウトマウスの表現型が血液細胞に由来するものか造血支持細胞に由来するものか同定するために骨髄移植を行い、解析を行った。また分取した GFP 陽性細胞について遺伝子発現の変化を解析するために RNA シークエンスを行った。

結果：

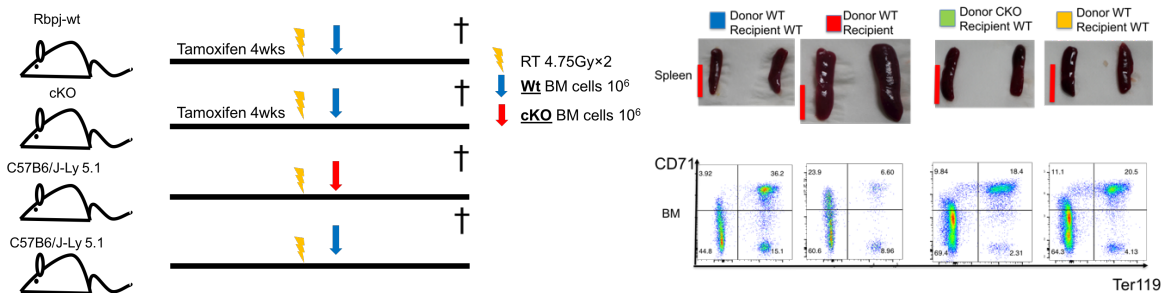
GFP 陽性細胞は CD45 陰性 Ter119 陰性 CD31 陰性細胞（非血液及び非血管内皮細胞）の 0.5%程度で cKO マウスでも保たれていた。各分画において *Rbpj* の欠失を genomic DNA の PCR で確認したところ GFP 陽性細胞のみで *Rbpj* が欠失したバンドが認められた。

cKO マウスではコントロールと比較して、血算及び骨髄での顆粒球系細胞の分化に有意差を認めなかった。また骨髄の造血幹細胞及び顆粒球系前駆細胞分画にも有意差を認めなかった。骨髄では CD71 陽性 Ter119 陽性の成熟赤芽球分画の減少を認め、その前段階である CD71 陽性 Ter119 陰性分画はやや増加していた。脾臓においては軽度脾腫を認め、有核細胞数及び CD71 陽性 Ter119 陽性細胞が増加していた(下図)。上記結果より骨髄での赤芽球の分化障害とそれを代償するような脾臓での赤芽球造血亢進が起こっているものと推測された。



しかし脾臓摘出した cKO マウスでは、骨髄の赤芽球の分化障害は消失していた。

骨髄移植モデルにおいては cKO マウスに *Rbpj* wild type マウスの骨髄を移植したマウスでのみ表現型が再現された。*Rbpj* wild type マウスに cKO マウスの骨髄細胞を移植したマウスでは赤芽球の分化障害を認めなかった (下図)。



RNA シークエンスではケモカイン関連の pathway に発現変動を認め、*Cxcl12* を含むケモカインの発現変動がみられた。

考察：

cKO マウスでみられた骨髄での赤芽球の分化異常においては骨髄における CD71 陽性 Ter119 陽性の前赤芽球以降の成熟赤芽球分画の減少と、CD71 陽性 Ter119 陰性の BFU-E 及び CFU-E に代表されるより未熟な赤芽球分画の増加が観察され、前赤芽球への分化が障害されることでそれ以前の分化段階の赤芽球が増加しているものと考えられた。また脾臓では脾腫と赤芽球の増加がみられたことより骨髄での赤芽球造血の異常を脾臓で代償していると考えられた。しかし脾臓摘出により骨髄での赤芽球分化異常が消失し貧血も消失した。

これにより Nestin 陽性細胞の Notch シグナルは赤血球の分化だけでなく赤血球造血の場の選択に関与している可能性があると考えられた。

RNA シークエンスにおいて GFP 陽性細胞で CXCL12 を初めとしたケモカインを code する遺伝子で表現型と一致した発現変動を認めたことから、そのメカニズムに関しては GFP 陽性細胞の産生するケモカインが関与している可能性がある。

結論：

本研究により骨髄中の Nestin 陽性細胞における Notch シグナルは赤血球の分化及び造血の場の選択に関与している可能性があることが示唆された。そのメカニズムについてはさらなる研究が必要であるが、CXCL12 に代表されるケモカインが関与している可能性があると考えられた。