

Title	Roles for c-Myc in Self-renewal of Hematopoietic Stem Cells
Author(s)	佐藤, 友亮
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45473
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	佐藤友亮
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19298 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Roles for c-Myc in Self-renewal of Hematopoietic Stem Cells (造血幹細胞の自己複製における c-Myc の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲 (副査) 教授 平野 俊夫 教授 竹田 潤二

論文内容の要旨

[目的]

造血幹細胞は自己複製能と多分化能によって個体の一生涯に涉って血液細胞を供給し続ける。近年、Notch シグナルや HOXB4 が造血幹細胞に自己複製を誘導することが報告されているが、その分子機構は明らかではない。本研究では、Notch や HOXB4 による造血幹細胞の自己複製機構における細胞周期制御分子の発現変化を検討すると共に、細胞周期制御分子を導入し、純粋に細胞周期を回転させることにより造血幹細胞に自己複製を誘導することが可能かどうか検討した。

[方法ならびに成績]

マウス Lin⁻Sca-1⁺ 細胞に 4-hydroxytamoxifen (4-HT) によって Notch1 活性が誘導される Notch1/ERT と HOXB4 をレトロウイルスを用いて導入した。Notch1/ERT 導入細胞は、4-HT 非存在下では、SCF、FLT3L、IL-6 などのサイトカイン存在下でも 14 日以上増殖できなかったのに対し、4-HT 存在下では 14 日以上増殖を続けた。同様に、Mock ベクター導入細胞は各種のサイトカイン存在下でも 14 日以上増殖できなかったのに対し、HOXB4 導入細胞は同様の条件下で 14 日以上増殖した。培養 7 日目の PI 染色による細胞周期の解析では、4-HT 存在下で培養した Notch1/ERT 導入細胞は、4-HT 非存在下で培養した細胞と比較して S-G2/M 期の細胞比率が上昇していた。HOXB4 導入細胞においても、Mock ベクター導入細胞と比較して S-G2/M 期の細胞比率の上昇が認められた。培養 7 日目の時点で細胞周期制御分子の発現を半定量的 RT-PCR 法で解析すると、4-HT 存在下で培養した Notch1/ERT 導入細胞および HOXB4 導入細胞では、それぞれ、4-HT 非存在下で培養した細胞および Mock ベクター導入細胞と比較して、*c-myc*, *cyclin D2*, *D3*, *E*, *E2F1* の発現が上昇していた。

他の細胞系では c-Myc は単独で細胞増殖を誘導することが報告されていることから、c-Myc によって造血幹細胞に自己複製を誘導することが可能かどうか検討した。4-HT により c-Myc 活性が誘導される Myc/ERT をマウス Lin⁻Sca-1⁺ 細胞に導入したところ、Myc/ERT 導入細胞は 4-HT 非存在下では、SCF、FLT3L、IL-6 などのサイトカイン添加の条件でも 21 日以上増殖することができなかったが、4-HT 存在下では 21 日以上増殖した。培養 7 日目の細胞周期の解析結果では、4-HT 処理した Myc/ERT 導入細胞は、4-HT 非存在下で培養した細胞と比較して、S-G2/M

期の細胞比率が上昇し、cyclin D1, D2, D3, E, E2F1 などの発現も認められた。Myc/ERT 導入細胞を 4-HT 存在下で 28 日間培養した後のフローサイトメトリーによる解析では、培養細胞の約半数が Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ などの未分化な表面形質を保持していた。また、4-HT 処理した Myc/ERT 導入細胞は 4-HT 処理していない細胞と比較して、CFU-Mix などのコロニー形成能が増加し、細胞の不死化に関わるテロメラーゼ活性も上昇していた。

次に、Myc/ERT 導入細胞の生体内での機能を評価するため、移植実験を行った。Ly5.1 陽性 Myc/ERT 導入マウス Lin⁻Sca-1⁺ 細胞を 4-HT 存在下、非存在下で *in vitro* で 8 日間培養し (total 培養期間 12 日間)、得られた 4×10^6 個の細胞を Ly5.2 陽性の 1×10^5 個のコントロールの細胞と共に致死量放射線照射後の Ly5.2 陽性マウスの尾静脈より輸注した。4-HT 非存在下で培養した細胞を移植した場合に移植 4 週間後の末梢血中には Ly5.1 陽性細胞はほとんど認められなかったが、4-HT 存在下で培養した細胞を移植した場合には Ly5.1 陽性細胞が約 11% 認められた。更に、4-HT 処理した細胞は、移植 12 週後にも Mac1/Gr1 陽性の骨髄系、CD4/8 や B220 陽性のリンパ系など各種の系統の血球を産生し、6 ヶ月以上にわたって宿主の造血に寄与していた。

次に、Notch1, HOXB4 による *c-myc* の発現誘導機構を検討するため、293T 細胞において *c-myc* プロモーター (-1137/+516 bp) を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、活性型 Notch1、Notch の下流で機能する RBP-J κ の活性型 (RBP-VP16)、および HOXB4 が、*c-myc* プロモーターを活性化することが明らかとなった。さらに、各種の欠失変異体を用いた解析結果から、RBP-VP16 は *c-myc* プロモーターの -195 bp から -161 bp の部位を活性化することが明らかとなった。また、RBP-VP16 によって同領域に DNA 結合蛋白が形成されることがゲルシフトアッセイにおいて明らかとなった。

[総括]

Notch1, HOXB4 が *c-myc* プロモーターを活性化しその発現を誘導すること、Myc/ERT 導入マウス Lin⁻Sca-1⁺ 細胞が 4-HT 添加によって未分化な状態で増殖すること、および Myc/ERT により増幅した細胞が長期に渉る造血再構築能を有することが明らかとなった。これらの結果から、*c-Myc* は Notch, HOXB4 の下流で造血幹細胞の自己複製に寄与すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

[総評]

従来より造血幹細胞の自己複製機構については多くの研究がなされ、自己複製に関わる外的因子として Notch シグナル、内的因子として HOXB4 などの分子が同定されてきた。しかし、これらの分子がどのような機構を介して自己複製を誘導するのかは明かではなかった。

本研究においては、Notch シグナルや HOXB4 による造血幹細胞の自己複製過程における細胞周期制御分子の発現解析が行われた。その結果、造血幹細胞の自己複製過程においても通常の細胞増殖と変わらず *c-myc*, cyclin D2, D3, E, E2F1 などの G1/S 移行に必要な分子の発現が誘導されることが明らかとなった。また、Notch シグナル、HOXB4 のいずれもが G1/S 移行に絶対的な役割を担う *c-myc* のプロモーターを活性化し、その発現を誘導することも明らかとなった。また、その際、*c-myc* プロモーター内で Notch シグナルに反応する部位も同定された。

更に、*c-Myc* がサイトカイン存在下で Lin⁻Sca-1⁺ のマウス造血幹/前駆細胞に 4 週間に渉って、自己複製を誘導することが *in vitro* での表面形質の解析、コロニーアッセイから示された。また、*in vivo* の移植実験により *c-Myc* 活性により造血幹細胞の自己複製能が維持されることも明らかとなった。

これらの結果は、造血細胞の自己複製過程における細胞周期制御を分子レベルで明らかにしたものであり、現在国内外の多くの研究室において試みられている造血幹細胞の *in vitro* での増幅法の確立に極めて有用な情報であると考えられる。また近年、造血幹細胞以外にも神経系、筋肉系など他の細胞系においても幹細胞システムが存在することが明らかにされつつあり、本研究は他の細胞系の幹細胞研究に対しても貴重な知見を供することから、学術的価値は極めて高い。以上の点から、本研究は学位に値するものと考えられる。