



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45473">https://hdl.handle.net/11094/45473</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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、純粹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<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>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<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>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<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>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レース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<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>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<sup>6</sup>個の細胞をLy5.2陽性の1×10<sup>5</sup>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つたが、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つた。その結果、活性型Notch1、Notchの下流で機能するRBP-J $\kappa$ 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つた。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つた。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つた。

#### [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<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>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涉る造血再構築能を有することが明らかとなつた。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つた。

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つた。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つた。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<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>のマウス造血幹/前駆細胞に4週間に涉って、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つた。

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。