The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells
Author(s)	松井, 敬子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59752
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【２】

氏　　名	松　井　敬　子（まつ い けい こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２５５５６　号
学位授与年月日	平成 24 年 4 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells （NAD 依存症ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 は、造血幹細胞の維持に必須の役割を果たす）
論文審査委員	（主査） 教　授　金倉　　譲 （副査） 教　授　下村　伊一郎　　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をもつが、生体の一生を通して造血を維持するために、そのほとんどは、“ニッチ”といわれる骨髄の微小環境に守られ、静止期にあると言われている。造血幹細胞の未分化性の維持には、環境の様々な因子が関与していると考えられるが、その詳細はいまだ明らかではない。近年、骨髄ニッチでの低酸素状態が、造血幹細胞が未分化性の維持に重要な役割を果たしていると報告され、造血幹細胞の生態とエネルギー代謝の関係が注目されている。Sir2は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）依存性のヒストン脱アセチル化酵素であり。カロリー制限下で出芽酵母や線虫の寿命を延長することが知られている。

本研究において私は、Sir2の哺乳類ホモログであるSIRT1の、造血幹細胞の未分化性維持における役割を検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

ヒト臍帯血とマウスの骨髄細胞におけるSIRT1の発現を、RT-PCR法にて検討した。SIRT1は、ヒト及びマウスの造血幹細胞と各系統の各分化段階すべての造血細胞において等しく発現していた。次に、造血幹細胞内でのSIRT1の働きを明らかにするために、マウスの骨髄細胞から造血幹細胞を多く含む分画であるKSL細胞を分取し、SIRT1阻害剤であるニコチナミド（NA）、または、その活性剤であるレスベラトロールを添加し、培養5日目にKSL分画に残留している細胞の割合を評価した。NA添加群ではKSL分画の割合は減少し、レスベラトロール添加群では増加していた。胎生14.5日の野生型(WT)とSIRT1欠損(KO)マウスの胎仔肝細胞からKSL細胞を分取し、培養5日目のKSL細胞の割合を評価したところ、先の実験結果に一致して、SIRT1 KO細胞ではWT細胞よりもKSL分画の細胞が減少していた。以上より、SIRT1は造血幹・前駆細胞の分化を抑制すると考えられた。次に、造血幹細胞の自己複製能へのSIRT1の影響を検討した。SIRT1 KOおよびWTマウス胎仔肝より分取したKSL細胞をそのまま半固形培地に播種したコロニーアッセイでは、両者のコロニー形成能に違いはなかったが、長期の培養での評価を可能とする継代コロニーアッセイ（replating assay）では、KOではWTに比べて早期にコロニー形成能を失った。また、マウス胎仔肝細胞KSL細胞の継代移植による長期造血再構築能の評価においては、KO KSL細胞で早期にドナーのキメリズムが低下していた。さらに、造血幹細胞の対称分裂による自己複製を評価するために、分裂娘細胞のコロニーアッセイを行った。SIRT1 KOおよびWTの胎仔肝KSL細胞を単細胞分離し、2つの娘細胞に分裂した時点で、それぞれ別の半固形培地に移して培養後のコロニー形態を観察した。2つの娘細胞がともにMixコロニーを形成した場合を自己複製として評価した。KO KSLにおいてMixコロニーペアーの数がWTに比べて有意に減少していたことから、WTのKSL細胞ではより多くの細胞が対称分裂により自己複製を行っていると考えられた。以上より、SIRT1 KOのKSL細胞では、WTよりも自己複製能が阻害され、早期に幹細胞の性質を失っていることが示された。次に、SIRT1が、造血幹細胞の自己複製を促し、未分化性を維持するその分子機構を明らかにするために、マウス骨髄KSL細胞のNA（+/-）での培養後における、造血幹細胞の増殖や細胞周期を制御する遺伝子の発現を、RT-PCRを用いて調べた。NA添加によりHOXB4、E2F-1、PMLの発現は抑制され、$p16^{INK4a}$、$p19^{ARF}$の発現は増強した。次に、$p16^{INK4a}$の発現を誘導する活性酸素(ROS)の蓄積について検討した。SIRT1 KOおよびWT胎仔肝KSL細胞の培養後におけるROSの蓄積と細胞分化の関連を調べたところ、SIRT1 KO KSL細胞では、培養後におけるROSの蓄積はWTに比べて増加しており、KSL分画の細胞の減少を認めたが、ROSを消去するN-アセチルシステインを添加することにより、KO KSLにおいてもKSL分画に残留する細胞が回復していた。このことからSIRT1による造血幹細胞の分化抑制は、ROSの消去を介している事が示唆された。また、SIRT1は、FOXO3aやp53の蛋白を脱アセチル化することにより、それらの活性を制御することも報告されている。タモキシフェン誘導性活性型FOXO3aを導入したKSL細胞では、SIRT1 KO細胞の未分化性が回復していたことから、SIRT1の下流においてFOXO3aが重要な役割を担っていると考えられた。また、p53の阻害剤(Pifithrin α)を添加した場合、SIRT1 KO細胞の未分化性が回復していたこと、p53KO細胞で、NAによる分化の促進が解除されたことから、SIRT1はp53の活性阻害を介して未分化性の維持に関与していることが示唆された。

〔　総　　括　〕

SIRT1は、FOXO3aの活性化とp53の活性阻害を介し、さらにROSを消去することによって造血幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を担っていると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ニコチナミドアデニンヌクレオチド(NAD)依存性のヒストン脱アセチル化酵素であるSIRT1が、造血幹細胞の未分化性の維持に重要であることを示した研究である。SIRT1は、線虫においてカロリー制限下での寿命延長に関わる分子であるSir2の哺乳類でのホモローグであり、エネルギー代謝やその他のストレス下での恒常性の維持に重要である。本研究では、SIRT1のノックアウトマウス由来造血幹細胞は、野生型（ＷＴ）造血幹細胞に比べて培養下での分化が早く、より早期に幹細胞としての造血維持能力を失う事を示した。さらにその機序として、SIRT1が、FOXO3aの活性化とp53の阻害とROSの消去を介して造血幹細胞の分化を阻害し、自己複製を促すことで幹細胞プールの維持に寄与していることを示した。

本研究において、造血幹細胞のエネルギー代謝に注目し、その重要な担い手であるSIRT1の役割を明らかにしたことは、今後の造血幹細胞維持機構の研究にとって示唆に富む知見である。よって学位に値する。