

京都大学	博士 (医学)	氏 名	酒卷 太郎
論文題目	<b>Hoxb5 defines the heterogeneity of self-renewal capacity in the hematopoietic stem cell compartment</b> (造血幹細胞分画内の自己複製能不均一性は Hoxb5 により規定される)		
(論文内容の要旨) 造血幹細胞(HSC)は、自己複製能と多分化能を有する血液幹細胞と定義される。しかしながら、どのようにして自己複製能が維持されるのか、その分子機序はあまり解明されていない。これまでの移植実験の結果から、HSC 分画内に自己複製能の不均一性が存在し、長期に渡り自己複製能を有する長期造血幹細胞(LT-HSC)と一過性にしか有さない短期造血幹細胞(ST-HSC)が混在していることが明らかになっている。また LT-HSC は造血系階層の最上位に位置し、細胞分化が進むことで ST-HSC が産生され、その細胞運命は固定されたものと理解されている。 自己複製能分子機序を解明する鍵として、これまでに、Hoxb5 遺伝子がマウス HSC 分画のごく一部に発現していること、さらに Hoxb5 遺伝子の発現を指標に HSC 分画を陽性、陰性分画に分離することで、マウスへの移植実験より陽性分画が LT-HSC 様、陰性分画が ST-HSC 様表現型を呈することを報告してきた(Nature 2016)。そこで、この実験手法を応用し、Hoxb5 陽性分画と Hoxb5 陰性分画を比較することで、なぜ HSC 分画内に自己複製能の不均一性が存在するのか、さらにはその分子機序の解明を試みた。 造血幹細胞は、細胞分裂に伴い自己複製能を失い、細胞分化を開始すると考えられている。これまでの報告から HSC はその大半が静止期(G0)に留まり、一部の細胞が細胞分裂を行うと理解されている。また HSC 分画内には休眠状態にある細胞集団が存在することが示唆されている。そこで、造血系階層の最上位に位置する Hoxb5 陽性分画がより休眠状態にあるかを確認したところ、Hoxb5 陽性、陰性分画ともに同程度に細胞分裂することが明らかになった。 そこで、RNAseq を用い、細胞周期関連の遺伝子発現解析を行ったが、Hoxb5 陽性、陰性分画に有意な差は認められなかった。このことから、自己複製能と細胞休眠には相関性が無いことが示唆された。 そこで、新たに自己複製能を規定する因子を同定するため、移植実験を含む様々なストレス環境下(造血ストレス)での骨髓内の変化を解析した。その結果、Hoxb5 陽性分画が選択的に骨髓内造血幹細胞分画に濃縮することが明らかとなった。さらに造血ストレスの程度に依存して、濃縮が促進されることが示唆された。 これらの結果より、1細胞あたりにかかる造血ストレスが自己複製能に相関すると仮定し、定量的な実験を行った。 これまで、マウスへの移植実験を行う際にドナー細胞 10 細胞に対し、補助的に骨髓細胞を 2×10 <sup>5</sup> 細胞同時に移植していた。この補助細胞の数を増減することでドナー細胞にかかる細胞分裂ストレスをコントロールした。結果は、補助細胞を増やす(低ストレス環境下)ことで ST-HSC として運命決定されたと考えられていた細胞分画(Hoxb5 陰性 HSC)が LT-HSC 様表現系を示すことが明らかになった。 さらに、高ストレス環境下において、Hoxb5 陰性 HSC に Hoxb5 を強制的に発現することで LT-HSC 様表現系を示すか移植実験を行ったところ、Hoxb5 陽性 HSC 移植時と同様に自己複製能が長期に維持されることが明らかになった。 以上より、細胞運命決定された LT-HSC と ST-HSC が混在するというこれまでの定説を覆し、HSC 分画内における自己複製能の不均一性は造血ストレスの程度により細胞運命が柔軟に変化することから生じる事、さらにその造血ストレスに対する耐性を Hoxb5 が制御していることを明らかにした。			

(論文審査の結果の要旨)

造血幹細胞 (HSC) 分画の細胞が持つ自己複製能が不均一であることは知られていたが、その不均一性が生じる機序は解明されていなかった。一因として、HSC 分画から自己複製能に応じた細胞の単離・解析が困難であったことが考えられる。本研究では、Hoxb5 発現を指標とすることで自己複製能に応じた HSC 分離を可能とし、自己複製能の不均一性が生じる機序を明らかとした。これまで、HSC は休眠期にあることで自己複製能を維持すると考えられてきたが、Hoxb5 レポーターシステムを用いた細胞周期解析・RNA-seq による遺伝子発現解析の結果、細胞周期と自己複製能には明らかな相関性は見出せていない。そこで、造血ストレスに応じ HSC 分画が変化することに着目し、様々な造血ストレス環境下における骨髓解析を行い、造血ストレスの多寡に応じ HSC 分画中の Hoxb5 陽性分画が選択的に濃縮されること、造血ストレスを軽減させることで Hoxb5 陰性分画でも陽性分画同様に自己複製能が維持されることを明らかとしている。また、Hoxb5 陰性 HSC に Hoxb5 を過剰発現させることで、より長期に自己複製能が維持されることを示し、Hoxb5 が造血幹細胞の自己複製能を制御することを明らかとした。

以上の研究は、造血幹細胞が持つ自己複製能の不均一性の機序解明に貢献し、造血幹細胞の自己複製能の制御因子を解明することに寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士 ( 医学 ) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 2 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降