

京都大学	博士（医科学）	氏名	山田信之輔
論文題目	Regulation of lymphoid-myeloid lineage bias through Regnase-1/3-mediated control of Nfkbiz (Regnase-1/3によるNfkbiz発現調節を介したリンパ球-骨髄球の系譜決定制御)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、造血幹・前駆細胞 (HSPC) は分化方向性に関して極めて不均一な集団であり、特定の分化方向性に偏りを示すことが示唆されている。このような分化偏向は炎症などの骨髄環境の変化により影響を受けることが知られているが、分化偏向を制御する分子機構はほぼ未解明である。</p> <p>Regnase-1 (Reg1) は mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) に存在するステムループ構造を認識する RNA 分解酵素であり、免疫恒常性の維持に不可欠である。機能的ドメインの類似性から Reg1 は Reg2, 3, 4 と共にファミリーを形成しており、中でも Reg1 と Reg3 は類似した発現制御を受ける点で重複した機能が示唆されるものの、骨髄造血における役割に関して不明であった。</p> <p>本研究では、Reg1 と Reg3 が骨髄造血における分化方向性の選択にとって重要であり、Reg1/3 の共通の標的遺伝子として Nfkbiz が HSPC において骨髄球への分化偏向を促すことを明らかにした。野生型と Reg1/3 DKO 細胞との混合胎仔肝細胞移植の結果、DKO 細胞による骨髄再構築は、顕著な B リンパ球分化障害を示し、対照的に骨髄球系分化には障害は認めなかった。さらに、様々な分化段階において細胞増殖や細胞死に変化が認められないこと、さらに Il7r-cre⁺Reg1^{fl/fl}Reg3^{+/+}に由来する DKO 細胞ではリンパ球分化障害が認められないことから、Reg1 と Reg3 は分化決定前の HSPC で分化方向性を制御していることが示唆された。前述の混合キメラマウスから単離した Lin⁻Sca1⁺Kit⁺ (LSK) 細胞における single cell RNA-seq (sc-RNAseq)を行ったところ、野生型と比較して DKO 細胞では、骨髄球系統と赤血球・血小板系統に関連した遺伝子発現を示す細胞が増加し、リンパ球系関連の遺伝子発現を示す細胞は減少していた。さらに DKO 細胞は Mpo や Elane といった骨髄球系分化に特徴的な遺伝子に加え、骨髄造血において機能未知な Nfkbiz が高発現しており、詳細な検討の結果 Reg1/3 の標的遺伝子として同定した。注目すべきことに、Nfkbiz の遺伝的欠損により、DKO 細胞で認められた造血変化は劇的に改善し、B 細胞分化誘導の結果 DKO 前駆細胞の B リンパ球分化能もまた改善を認めた。Nfkbiz はクロマチン制御に関与する事から、Flt3-CD48-LSK 細胞を用いて sc-ATACseq 解析を行ったところ、Reg1/3 重欠損で認められたエピジェネティック変化は Nfkbiz 欠損により著しく回復した。これにより Reg1/3 による Nfkbiz 発現制御は骨髄造血において極めて重要であることが明らかとなった。</p> <p>Nfkbiz 発現制御の仕組みを理解するため、luciferase reporter assay により Nfkbiz 3'UTR 配列を詳細に調べた結果、Reg1/3 認識配列として連続した UAU-loop のステムループを同定した。さらに、その構造を破壊するアンチセンスオリゴ核酸 (ASO) は Reg1/3 による Nfkbiz mRNA 分解を効率的に阻害した。HSC 培養系を用いて ASO による分化方向性への影響を検討したところ、ASO 処理により HSC は骨髄球に関連した遺伝子変動を認めたが、骨髄球分化はほぼ認められなかった。しかし、IL-1βや TNF を加えると ASO 導入 HSC は著しい骨髄球系バイアスを示し、骨髄球分化が加速した。</p> <p>以上より、Reg1 と Reg3 による Nfkbiz mRNA 分解はエピゲノム制御を介して HSPC の分化方向性を制御することが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

造血幹・前駆細胞 (HSPC) は多分化能を持つが、細胞毎に分化方向性に偏りを持ちうる。しかし、造血分化の運命決定機構は明らかとなっていない。mRNA 分解酵素である Regnase-1(Reg1)は炎症制御に重要である一方、骨髄造血における機能は明らかでない。

本研究は、Reg1 とそのファミリーである Reg3 が共通のステムループ構造を認識する事を示し、これらの重欠損マウスがリンパ球分化障害とミエロイド分化の亢進を示す事を見出した。1細胞遺伝子発現解析から、Reg1/3 重欠損 HSPC はミエロイド分化への偏りを示した。分子機構の解析から、HSPC において Reg1/3 が Nfkbiz mRNA を分解する事、前駆細胞における Nfkbiz の過剰発現がミエロイド分化を強く誘導する事を見出した。さらに、Nfkbiz と Reg1/3 の三重欠損マウスは Reg1/3 重欠損マウスで認められた造血変化が改善し、造血幹細胞集団におけるクロマチン変化が回復した。Reg1/3 による mRNA 上の Nfkbiz 標的配列を同定し、ステムループ構造を破壊するアンチセンスオリゴ核酸を HSC 培養系に導入する事で、Nfkbiz の発現増加、及び炎症性サイトカインによるミエロイド分化を著しく促進することが可能となった。

以上の研究は造血幹細胞の分化運命決定の分子機構の解明に貢献し炎症を背景とする造血系疾患の病態解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医科学）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 6年 1月 10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