

|             |                                                                                                                                                       |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 戴 士 (医 学)                                                                                                                                             |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                             |
| 学 位 記 番 号   | 論 医 博 第 1907 号                                                                                                                                        |
| 学位授与の日付     | 平 成 18 年 7 月 24 日                                                                                                                                     |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当                                                                                                                               |
| 学 位 論 文 題 目 | Over-expression of c-Myb increases the frequency of hemogenic precursors in the endothelial cell population.<br>(c-Myb の過剰発現は内皮細胞集団中の血液前駆細胞の頻度を増加させる) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 長 澤 丘 司      教 授 中 畑 龍 俊      教 授 山 中 伸 弥                                                                                                |

### 論 文 内 容 の 要 旨

胎生期マウスの血管内皮細胞および ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞の一部は成体型血液細胞への分化能を持つことが知られており、血管内皮細胞は造血幹細胞を含む成体型血液細胞系列の起源の一つであると考えられている。しかし、血管内皮細胞が血液細胞系列へ運命決定する分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。c-Myb は成体型造血の発生に必要な転写因子の一つであるが、血液細胞への分化能を持つ血管内皮細胞では c-Myb の発現量が高いことが既に報告されている。このことから、c-Myb は血管内皮細胞が内包する血液細胞分化プログラムの一つである可能性が示唆される。本研究では、マウス ES 細胞の試験管内分化系を利用して、テトラサイクリン依存的に (Tet-Off システム) c-Myb の過剰発現を誘導する実験系を構築した。c-Myb 蛋白の寿命が非常に短いため、この実験系では過剰発現の速やかな解除が可能である。この利点を生かして血管内皮細胞の段階でだけ限定的に c-Myb の過剰発現を誘導し血液分化能に及ぼす影響を検討した。

OP9 ストローマ細胞層上で ES 細胞の分化を誘導し、培養 3 日目から 5 日目まで c-Myb を過剰発現させた。培養 5 日目に血管内皮細胞を FACS により純化し、OP9 細胞上に再播種して血液細胞のコロニーを形成させた。血管内皮細胞純化後の培養は全て c-Myb の過剰発現を解除する条件下で行った。c-Myb を過剰発現した血管内皮細胞は、対照に比べて高い頻度で血液細胞コロニーを形成した。頻度の増加率は CFU-Mix と BFU-E で高く (5 ~ 6 倍)、CFU-GM と CFU-M ではやや低かった (3 ~ 1.5 倍)。また、純化した血管内皮細胞を IL-7 と OP9 細胞の存在下で限界希釈培養した結果、B リンパ球へ分化する前駆細胞の頻度も対照に比べて 3 倍程度増加していた。さらに、純化した血管内皮細胞を OP9 細胞上で 1 週間培養した後すべての細胞を回収し、OP9 細胞上に再播種して生じる血液細胞コロニーを計数したところ、c-Myb を過剰発現した血管内皮細胞に由来する培養ではコロニー形成細胞の回収率が対照に比べて顕著に高いことを見いだした。RT-PCR による解析では、成体型血液細胞の発生にかかわる転写因子群 (Tal1, Lmo2, Runx1, HoxB4, Mll, Tel / Etv6, Bcl2) の発現亢進が c-Myb を過剰発現させた血管内皮細胞で認められた。

以上の結果より、血管内皮細胞における c-Myb の過剰発現はその血液分化能を亢進させるだけでなく、血管内皮細胞から生じた血液前駆細胞の生存・増殖にも促進的な影響を与えることが明らかとなった。本研究により、c-Myb は血管内皮細胞から血液細胞系列が分岐する以前の分化段階において血液分化プログラムの一部として機能し得ることが強く示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

胎生期の血管内皮細胞が成体型血液細胞へ分化することから、血管内皮細胞は成体型血液細胞系列の起源であると考えられている。造血能を持つ内皮細胞では転写因子 c-Myb の発現量が高いことから、c-Myb は内皮細胞が持つ血液発生プログラムの一部である可能性が示唆される。しかし、一般に c-Myb は造血前駆細胞の維持・増殖に関与すると考えられており、内皮細胞からの血液発生におけるその機能は明らかではなかった。

本学位申請者は、マウス ES 細胞の試験管内分化系を利用して c-Myb の過剰発現を誘導する実験系を構築した。過剰発現を速やかに解除できるこの実験系の利点を生かして、血液細胞に分化する前の内皮細胞の段階でだけ c-Myb の過剰発現を誘導し血液分化能に及ぼす影響を検討した。その結果、c-Myb を一旦過剰発現した内皮細胞は対照に比べて 3 倍程度高い頻度で血液細胞コロニーを形成した。また、ストローマ細胞上で 1 週間培養した後に回収される 2 次コロニー形成細胞も顕著に多かった。c-Myb を過剰発現した内皮細胞では Bcl2 や HoxB4 など造血発生に関与する遺伝子群の発現亢進が認められた。以上の結果から、c-Myb は血液発生プログラムの一部として血管内皮細胞で機能するという新しいモデルを提出した。

以上の研究は、成体型造血の発生機構の解明に貢献し造血幹細胞の成立機序の理解に寄与するところが多い。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、平成18年7月6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。