

氏名	つねとう もとかず 經 遠 智 一
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第44号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Enforced expression of PU.1 rescues osteoclastogenesis from embryonic stem cells lacking Tal-1 (PU.1強制発現によって Tal-1 遺伝子欠損 ES 細胞から破骨細胞を誘導可能になる)
学位論文審査委員	(主査) 西連寺 剛 (副査) 佐藤建三 林 眞一

## 学位論文の内容の要旨

転写因子 Tal-1 は血液細胞の分化に必須であると考えられており、Tal1 遺伝子欠損 (-/-) マウス及び胚性幹 (ES) 細胞からは全ての血液細胞系譜の分化が見られない。一方、破骨細胞、マクロファージ、B 細胞系譜の分化に必須である転写因子 PU.1 は Tal1 (-/-) ES 細胞を血液細胞系譜へと分化を促しても発現が見られないことから、破骨細胞系譜では Tal-1 の下流に PU.1 があると推測されている。本研究は Tal-1 遺伝子欠損 ES 細胞へ PU.1 を発現させることによって破骨細胞系譜の分化誘導が可能となるかを検討し、それによって Tal-1 の血液細胞の分化決定における機能解析を試みた。

### 方 法

Tal1 (-/-) ES 細胞に PU.1 遺伝子を導入しテトラサイクリン非存在下で PU.1 を発現することが出来るクローンを作製し、その ES 細胞クローンを破骨細胞へと分化誘導した。分化誘導は ES 細胞とストローマ細胞株 OP9 及び ST2 との共培養で行った。また、他の血液細胞系譜 (B 細胞、マクロファージ、赤血球、巨核球、肥満細胞) の分化誘導も検討し、その有無を RT-PCR 法による遺伝子発現、形態観察、貪食能に関する機能アッセイを用いて解析した。

### 結 果

テトラサイクリン非存在下で PU.1 遺伝子を発現させることが出来る Tal1 (-/-) ES 細胞株 (TUNE 細胞) を 3 系統確立し、破骨細胞系譜へと分化誘導を試みた。テトラサイクリン存在下で PU.1 を

発現しない状態では Tal1 (-/-) ES 細胞株と同様に破骨細胞は誘導できなかったが、テトラサイクリン非存在下で PU.1 を強制発現させると破骨細胞特異的な TRAP 陽性で多核の細胞誘導が確認された。また誘導された細胞は象牙片を吸収したことから、機能的な破骨細胞が誘導されていることを確認した。これらの TRAP 陽性細胞の誘導は野生型の破骨細胞と同様に M-CSF と RANKL のシグナルに依存していることもそれぞれの阻害抗体を加えることで明らかにした。一方 B 細胞、赤血球、巨核球、肥満細胞への分化に関しては、PU.1 を強制発現させた Tal1 (-/-) ES 細胞をそれぞれの細胞系譜へと分化誘導しても各細胞系譜特異的な遺伝子発現がないことを RT-PCR 法によって示した。マクロファージに関してはラテックスビーズを貪食し、マクロファージ特異的な macrosialin 陽性の細胞が PU.1 を発現させることによって誘導されることを確認した。

テトラサイクリンの添加時期をずらし、PU.1 の発現時期と TRAP 陽性細胞の出現頻度を検討したところ、PU.1 を 2 から 4 日目以降に発現させた群において最も効率よく TRAP 陽性細胞が誘導された。次にどのような細胞が PU.1 の強制発現によって破骨細胞へと誘導されるかを検討した。上記の PU.1 の発現時期と効率の関係から、ES 細胞の培養系の 4 日目に出現する Flk-1 陽性の中胚葉系細胞がその候補であると考え、培養 4 日目の Flk-1 陽性細胞をマグネティックソーティング法で分離し、Flk-1 陽性分画と陰性分画をそれぞれ破骨細胞へと分化誘導した。野生型 ES 細胞からは TRAP 陽性細胞のほとんどが Flk-1 陽性分画から誘導され、PU.1 を強制発現させた TUNE 細胞では全ての TRAP 陽性細胞が Flk-1 陽性分画から誘導された。以上の結果から、中胚葉系細胞である Flk-1 陽性細胞が PU.1 の強制発現によって破骨細胞へと分化誘導されていることが示唆された。

## 考 察

PU.1 の強制発現によって Tal1 (-/-) ES 細胞株から誘導された TRAP 陽性細胞数は野生型の ES 細胞からの誘導に比べて 1/10 程度だった。この結果は、Tal-1 非存在下で PU.1 の強制発現のみで破骨細胞を分化誘導できるものの、効率よく破骨細胞を誘導するためには Tal-1 自身あるいは Tal-1 が誘導する他の遺伝子がこれに関与していることが考えられる。

## 結 論

転写因子 Tal-1 は血液細胞の分化に必須であると考えられていたが、破骨細胞系譜、マクロファージ系譜に関しては Tal-1 非存在下でも PU.1 の発現でそれぞれの血液細胞系譜の分化が起こりうることを明らかにした。この結果から Tal-1 は従来考えられていた中胚葉系細胞から血液幹細胞への分化ではなく、血液幹細胞に PU.1 などの特定の血液細胞系譜の分化に必須な転写因子を発現させることに機能している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は Tal-1 遺伝子欠損 ES 細胞を用い PU. 1 遺伝子をテトラサイクリンシステム制御下で強制発現させ、破骨細胞誘導を可能にしたものである。破骨細胞誘導効率は野生型 ES 細胞からの比べ PU. 1 の強制発現系では 1/10 程度と低かったものの、血液細胞分化に Tal-1 は不可欠であるという現在までの定説を覆す結果が導き出された。本論文の内容は、血液幹細胞のみならず広く幹細胞分野での分化機構を解明する上で新たなモデルを提唱するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。