

造血幹細胞の自己複製能とテロメラーゼ活性の関係についての研究

清水 なつみ (筑波大学 生物学類 4年)

指導教官：林 純一 (筑波大学 生物科学系)

【背景・目的】

造血幹細胞は、すべての血球細胞に分化する能力（多分化能）と、多分化能を保持したまま増殖する能力（自己複製能）を持った細胞であると定義されており、この2つの能力によって個体の一生にわたりすべての血球細胞を供給し続ける。マウス造血幹細胞は、9種類の表面抗原に対する抗体とFACSを用いて高度に純化することができ、わずか1個の造血幹細胞を致死量放射線照射したマウスに移植しても造血を長期に渡って再構築できることが証明されている。しかし、連続移植が無制限には成立しないことや、移植された造血幹細胞の再構築能が低下していることなどから、造血幹細胞の自己複製能の限界が示唆されており、自己複製は完全ではないののではないかと考えられている。

真核生物の染色体末端にはテロメアと呼ばれる構造が存在し、これによって染色体の分解や融合が防がれ、安定性が保たれている。体細胞では、細胞分裂に伴ったDNA複製の際にこの末端部分は完全には複製されず、従って細胞分裂が繰り返される度にテロメアは短小化し、ある閾値に達すると細胞は分裂を停止し老化に至ると考えられている。一方、生殖系列の細胞や幹細胞では、テロメラーゼと呼ばれる酵素の働きによりテロメアの長さが維持されていると考えられている。そこで本研究では、マウスにおける造血幹細胞の移植実験を行い、造血幹細胞の自己複製能についてテロメア長を分子レベルでの指標として解析を行った。

【方法】

C57BL/6(Ly5.1)マウスの骨髄細胞から造血幹細胞分画であるCD34-c-kit+Scal+Linage-(CD34-KSL)細胞をFACSを用いて分離し、1個、10個、100個を 2×10^5 個の競合細胞(Ly5.2)と共に致死量放射線照射したマウス(Ly5.2)に移植した。また、テロメラーゼの触媒サブユニットであるTERT遺伝子のノック

アウト(TERT-/-)マウスからCD34-KSL細胞を分離し、同様に移植実験を行った。造血の再構築は、移植3~4ヶ月後のマウスの末梢血を採取し、蛍光標識された抗CD45.1, CD45.2, B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1抗体を用いたFACS解析で確認した。移植した造血幹細胞の再構築能は造血幹細胞活性(Repopulation unit:RU)を用いて評価した。また移植が成立したマウスの骨髄細胞を、FACSを用いてドナー細胞由来の細胞(Ly5.1陽性)と競合細胞由来の細胞(Ly5.1陰性)に分離し、Flow-FISH法によりテロメア長の比較を行った。

【結果・考察】

Flow-FISH法によりテロメア長を比較した結果、移植された1個の造血幹細胞由来の骨髄細胞のテロメア長は、競合細胞由来の骨髄細胞のテロメア長より短くなっていることがわかった。また、TERT-/-マウスの造血幹細胞数を1個移植した場合も、骨髄細胞のテロメアの短小化の割合はほぼ同じであった。10個または100個移植した場合には、テロメアの短小化はほとんど見られなかった。また、移植した造血幹細胞のテロメアの長さが短くなる程再構築能は低下することがわかった。以上のことから、造血幹細胞でのテロメラーゼ活性は非常に低く、その活性レベルはTERT-/-マウスとほとんど変わりなく、細胞分裂の回数が増加する程テロメアは短小化し、長期骨髄再構築能も低下すると考えられる。したがって、造血幹細胞の自己複製は不完全であるが、個体の一生においては造血幹細胞の分裂速度は極めて遅いため分裂の回数も非常に少なく、テロメアの短小化が老化に至る閾値に達して分裂が停止することはないが、移植実験においては造血幹細胞の分裂が促されるために、テロメアの短小化が過剰に起こると考えられる。今後、TERT遺伝子を造血幹細胞で強制発現させることにより、テロメラーゼ活性やテロメア長と造血幹細胞の活性との関係についてさらに解析を進めて行く予定である。