

氏名(本籍)	すずきのりお 鈴木 教郎 (三重県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3189号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality (赤血球系細胞特異的なエリスロポエチン受容体の発現によるエリスロポエチン受容体欠損マウスの致死性回避)
主査	筑波大学教授 医学博士 長澤 俊郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 小林 公子
副査	筑波大学助教授 博士(医学) 桜井 武
副査	筑波大学講師 博士(医学) 島野 仁

論文の内容の要旨

(目的)

エリスロポエチン (Epo) は赤血球形成を促進する造血因子であり, その受容体 (EpoR) は赤血球前駆細胞表面に存在する。EpoとEpoRの結合により, 細胞内に赤血球分化, 増殖, アポトーシス抑制のシグナルが伝達され, 成体内の赤血球数が増加する。近年, EpoRが血球細胞の他, 脳, 心筋, 骨格筋, 精巣, 子宮, 血管内皮などでも発現していることから, Epo-EpoRシステムの造血外機能や臨床応用に強い関心が寄せられている。しかし, Epo, EpoR欠損マウスがともに赤血球造血障害により胎生死するため, その後の発生や造血以外のEpo, EpoRの機能について, 個体レベルで検証することができず, 本質的な機能は分かっていなかった。そこで, 本論文では, 血球細胞に限局してEpoRを発現するマウスを発生工学手法により作成し, Epo-EpoRシステムの造血外機能について検討した。また, 本マウスを用いることにより, 個体レベルでのEpoRの赤血球産生における役割を解析した。

(対象と方法)

赤血球系細胞特異的にトランスジーン (Tg) を発現させるために, マウスの赤血球系転写因子GATA-1遺伝子由来の制御領域 (約8kb) を用いた。この制御領域にEpoR cDNAを連結させたTgを構築し, マウス受精卵へのインジェクションを行ない, トランスジェニックマウスを2系統樹立した。EpoR遺伝子ヘテロ欠損 (EpoR^{+/-}) マウスは, 米ジャクソン研究所より購入した。EpoR^{+/-}マウスとトランスジェニックマウスとの交配により, レスキューマウス (EpoR^{-/-}::Tg⁺) を得た。マウスの遺伝子型判定には, PCR解析およびサザンブロット解析を用いた。

レスキューマウスの遺伝子発現は, RT-PCR法により調べた。また, 薄切切片を用いた組織解析や, アポトーシス細胞検出を行なった。マウス骨髓細胞に¹²⁵I標識Epoを結合させることにより, 各遺伝子型マウスの骨髓細胞表面におけるEpoR発現量を測定した。マウスに貧血を誘導するために, 眼窩静脈から脱血した。この時の血漿中のEpo濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。Epo濃度の異なる半固形培地で骨髓細胞を培養し, 形成された赤血球コロニー数をカウントすることにより, 各マウスにおける赤血球前駆細胞のEpoに対する応答能, 感受性

を調べた。

(結果)

2系統のレスキューマウスは、ともに出生、生存、繁殖が可能であり、各臓器に組織学的異常も認められなかった。また、本マウスには内在性EpoRの発現が認められず、Tg由来のEpoRの発現が造血組織のみで検出されることを確認した。この結果から、非造血組織のEpo-EpoRが、マウスの発生、生存、繁殖に必須では無いことが明確に示された。

次に、EpoR欠損マウスが致死となる直前の受精後12.5日の胎児造血を調べた。EpoR欠損マウスでは肝臓の造血細胞のほとんどがアポトーシスを引き起こしていたが、レスキューマウスでは、野生型マウスと同レベルのアポトーシスの回避が認められた。EpoR欠損マウスの胎児造血は、Tgの導入により、ほぼ完全に回復したと考えられた。

EpoRが胎児心臓に発現し、心臓形成に重要な役割を果たすという報告がある。実際に、胎生12.5日目のEpoR欠損マウス心室壁が、野生型マウスに比べて著しく薄いことを確認したが、レスキューマウスでは、心臓にEpoRの発現が全く検出されないにも関わらず、心臓の組織学的異常が認められなかった。

2系統のレスキューマウスの骨髄細胞膜上のEpoR分子数は、それぞれ、野生型マウスの1.2倍と0.4倍であり、EpoR高発現型と低発現型のマウスであることが分かった。そこで、これらのマウスの造血能の違いを調べることにした。まず、各マウス骨髄細胞をEpo濃度の異なる半固形培地で培養し、形成される赤血球前駆細胞のコロニーを数えた。その結果、コロニー形成に必要なEpo濃度は、低発現型レスキューマウスでは、野生型マウスよりも高濃度であり、高発現型レスキューマウスでは野生型マウスよりも低濃度であることが分かった。EpoRの発現量の違いにより、赤血球前駆細胞のEpo感受性が異なることが示唆された。次に、レスキューマウスに貧血を誘導し、その回復を調べた。両レスキューマウスは、野生型マウスと同様に、貧血状態から回復することができた。回復時に、全てのマウスの血漿Epo濃度が著しく上昇したが、低発現型レスキューマウスのEpo濃度は、野生型マウスの3倍以上にまで上昇していた。

(考察)

本研究により、EpoRの造血以外での発現は、マウスの発生、生存および繁殖には必須ではなく、赤血球造血専門に機能していることが明らかとなった。培養細胞等を用いた実験から、Epo-EpoRが心臓や骨格筋、血管の形成などに重要な機能を果たしているという報告があるが、造血細胞以外でEpoRを発現しないマウスを用いたことにより、個体において、Epoが造血以外の臓器発生に必要ではないことが分かった。特に、EpoR欠損マウスに認められる心臓形成異常は、EpoRの欠失が直接的な原因ではなく、重度の貧血による心筋への酸素供給不足という、二次的要因によるものであると考えられた。Epoが脳虚血時の神経保護作用を有するという報告もあり、今後、ストレス環境下での造血外Epo-EpoRの機能について解析する必要がある。その際、本マウスは個体レベルでの解析において非常に有用である。

また、EpoRには選択的スプライシングにより生じるアイソフォームが複数存在し、全長型EpoRに対して抑制的に機能すると考えられていた。本レスキューマウスには全長型EpoR以外は存在しないことを確認しており、EpoRアイソフォームはマウスの造血にとって必須ではないことが分かった。

さらに、EpoRの赤血球前駆細胞上の分子数が異なると、Epoシグナルに対する感受性が変化するという個体レベルではじめて実証し、EpoRの厳密な発現量の調節により、赤血球造血が制御されていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究ではEpo-EpoRシステムは、造血以外の個体発生、生存および繁殖には必須ではなく、赤血球造血専門に機能し、また、EpoRのスプライシングアイソフォームはマウスの造血にとって必要ではないことを証明した。さらに、赤血球前駆細胞は、EpoR分子数の違いにより、Epoシグナルに対する感受性が変化するということを個体レベルで実証した。いずれの結果も極めて重要な知見であり、今後のEpoの造血以外の臨床応用の展開の方向性を示す研究として高く評価した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。