

氏名(本籍)	こ う つ ま ゆ き の り 上 妻 行 則 (鹿 児 島 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5092 号		
学位授与年月日	平成 21 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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	巨核球造血における <i>apoptosis</i> の役割		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	澁谷 彰
副査	筑波大学教授	博士(医学)	島野 仁
副査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学講師	博士(医学)	清水 律子

論文の内容の要旨

目的

巨核球造血への *apoptosis* の関与について 1) Bcl-xL の発現調節機構, 2) caspase の活性化の役割, 3) Bim の役割について検討を行った。

対象と方法

WT, *vav-bcl-2* Tg, *bim* KO マウスより CD34-/KSL, MEP, 巨核球を採取し, 胞体突起形成能, コロニーアッセイ, 免疫染色, Western blotting などを行い, 巨核球分化・成熟能を検討した。情報伝達経路の検討には, 巨核球系細胞株 UT-7/TPO も使用した。

結果

1) Bcl-xL の発現は巨核球へ分化・成熟するに従い増加し, 巨核球胞体突起の platelet bud でも確認された。TPO 枯渇により Bcl-xL タンパクの発現は低下し, Bcl-xL の 12kDa の断片が検出されたが, mRNA 量に変化はなかった。この Bcl-xL 発現の低下は, caspase 阻害剤により阻害されたため, TPO 枯渇時に caspase-3 が活性化され, 活性化 caspase-3 により Bcl-xL が切断されることが明らかになった。一方, TPO 存在下でも PI3K 阻害剤添加により Bcl-xL の切断が観察されことから, TPO シグナルの下流で PI3K 活性化が caspase-3 活性化を阻害し, Bcl-xL 切断を阻害すると考え, active Akt-1 導入 UT-7/TPO 細胞株を準備し, TPO を枯渇させたが caspase-3 活性化, Bcl-xL 切断は認められなかった。Akt を介した Bcl-xL の維持が巨核球の *apoptosis* 抑制に重要であるかを確認するために, active-Akt-1 導入細胞株に Bcl-xL siRNA を導入した結果, TPO 存在下でも *apoptosis* に陥る細胞が増加した。以上より, Bcl-xL タンパクは胞体突起形成巨核球の platelet bud においても発現し, その発現は TPO を介した Akt の活性化を通して制御されていることが証明された。

2) *vav-bcl-2* Tg マウスを用いて caspase 活性化の関与を検討した。5-FU を投与し, 生体内の血小板産生能を検討した結果, Tg では投与後 8 日目以降の血小板数の overshoot は認められず, この時期の骨髓標本では,

Tg 巨核球数は有意に低下し、未熟巨核球の比率が低下していた。一方、造血幹細胞から巨核球への分化は低下していたが、MEP からの分化には差がなかったことから、Tg マウスでは造血幹細胞から巨核球への初期分化の障害が示唆された。初期巨核球造血における caspase 活性化の関与を検討するために、c-kit+/Lin- 細胞に caspase 阻害剤を添加したところ巨核球コロニー形成能は阻害された。さらに c-kit+/Lin- 細胞を TPO 存在下で培養した結果、TPO 添加 6 時間後に caspase-3 の活性化が認められた。血小板産生への caspase 活性化の関与を検討したが、巨核球胞体突起形成能は両者で差はなく、caspase 阻害剤添加も影響を与えなかった。以上から、caspase 活性化は初期巨核球造血に関与するが、血小板産生に caspase 活性化は関与しないと結論した。

3) TPO シグナルによる Bim タンパクの発現を検討した結果、TPO 枯渇により Bim タンパクの発現が誘導された。また、TPO 添加により Bim はリン酸化され、タンパク量が減少したが、proteasome 阻害剤添加によりその発現は維持された。次に、巨核球造血における Bim の役割を検討するために、*bim* KO マウスを用いた。5-FU 投与した結果、血小板の回復は KO マウスで軽度遅延していた。c-kit+/Lin- 細胞の TPO 依存性の増殖能は KO で有意に低下し、c-kit+/Lin- 細胞の細胞周期は KO マウスで WT に比して細胞周期の G1 から S 期の遅延が認められた。この原因を解明するために c-kit+/Lin- 細胞に TPO を添加し、p27^{kip1} の degradation を測定した結果、KO では p27^{kip1} degradation の遅延が認められた。以上より、Bim タンパクは TPO 枯渇時に発現し、TPO 存在下ではリン酸化を受け、proteasome により分解されること、Bim は p27^{kip1} の degradation に関与し、細胞周期エントリーを制御することが示唆された。

考察

巨核球造血時の apoptosis におけるシグナル伝達機構において、1) PI3K-Akt の下流で Bcl-xL が intact な状態で維持されることが巨核球の apoptosis 抑制に重要であること、2) caspase 活性化は巨核球からの血小板産生には関与せず、幹細胞から巨核球への分化に重要な役割を果たすこと、3) Bim タンパクは造血幹細胞・巨核球の apoptosis を促進するのみならず、造血幹細胞からの細胞周期エントリーを調節していることが示唆された。

審査の結果の要旨

本論文は造血前駆細胞から巨核球、血小板への分化、成熟の際の巨核球の apoptosis における新しいシグナル伝達機構を示したきわめて質の高い研究成果である。

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。