

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890024

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスを用いた巨核球・血小板産生メカニズムの系統的解析

研究課題名（英文） Systematic analysis of megakaryopoiesis and platelet production by using genetically modified mice.

研究代表者

上妻 行則 (KOZUMA YUKINORI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：90550145

研究成果の概要(和文)：巨核球造血と血小板機能に Bim 及び CD226 が関与するか否かを *bim* ノックアウト(KO)マウス、CD226 KO マウスの巨核球と血小板を用いて解析した。その結果、Bim は巨核球造血において、巨核球の apoptosis と細胞周期を制御する 2 つの役割を担っていることが証明された。CD226 は巨核球成熟過程において血小板産生を制御すること、血小板機能を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate whether Bim and CD226 are involved in megakaryopoiesis and platelet function, we characterized megakaryocytes and platelets in *bim* knockout (KO) mice and CD226 KO mice. We have demonstrated the dual role of Bim during megakaryopoiesis, namely the control of apoptosis and cell cycle progression. We have suggested that CD226 is involved in platelet production and platelet function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：血栓・止血学

キーワード：巨核球、血小板

1. 研究開始当初の背景

血小板の母細胞である巨核球は、巨核球系統特異的サイトカインであるトロンボポエチン(TPO)の作用により造血幹細胞から核の多倍化と胞体の成熟を伴いながら分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成し、その先

端が断裂することにより血小板が産生されるが、巨核球の生存、分化・成熟、血小板産生にどのような細胞内情報伝達物質が関与するか、未だ充分には解明されていない。しかし、研究代表者のこれまでの研究によって、

巨核球造血に関する以下の知見を得た。

- (1) Bcl-xL タンパクの発現は、巨核球生存に重要であること、Bcl-xL タンパクは、TPO を介した Akt の活性化を通して apoptosis を抑制していることを証明した。
- (2) caspase 活性化は初期巨核球造血に関与するが、巨核球胞体突起形成には関与しないと考えられた。
- (3) 成熟巨核球が胞体突起を形成する過程に、p38MAPK、calpain の関与が示唆された。
- (4) proapoptotic protein, Bim は巨核球の apoptosis を制御することが示唆された。
- (5) 接着因子 CD226 が、巨核球成熟過程において骨髄間質細胞及び内皮細胞と巨核球の接着に関与し、血小板産生を制御することが示唆された。

これら 1)~5) の知見は、CD226 以外は何れも apoptosis に関連タンパクである。従来、巨核球造に apoptosis が関与するという仮説が提唱されてきたが、個々の apoptosis 関連タンパクの関与を解析した研究はほとんどない。しかし、研究代表者は現在までに比較的少ない細胞数でも巨核球動態を解析できる実験系を構築し、また *in vitro* の培養実験系において、共焦点顕微鏡、各種阻害剤、細胞内情報伝達物質の western blotting などを通して得られた知見をもとに、巨核球造血に関与する情報伝達物質を絞り込んできた。本研究においては、これらの知見を基礎とし、遺伝子改変マウスを用いて情報伝達系を系統的に解析する。

2. 研究の目的

研究期間内に、以下の 2 点を明らかにする。

- (1) 巨核球造血、血小板産生に apoptosis 関連タンパクである Bim, Calpain, p38MAPK が関与するのか。
- (2) 巨核球成熟過程において骨髄間質細胞及

び内皮細胞との細胞間相互作用、特に接着因子 CD226 がどのように関与するのか、もし関与するとすればどのような細胞内情報伝達系が作動するのか。また、血小板機能において CD226 がどのような役割を担い、どのような細胞内情報系が作動するのか。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの準備

Bim, CD226, Calpain の巨核球造血における役割を詳細に検討するために、*bim* KO, CD226 KO マウス, Calpain の内在性阻害作用を有する *calpastatin* KO マウスを使用する。

(2) 巨核球造血能の *in vitro* 培養実験系による解析

- ① 成熟巨核球の胞体突起形成能（免疫細胞染色後に蛍光顕微鏡で観察）
 - ② 造血幹細胞から TPO 存在下に巨核球を誘導したときの分化能（細胞サイズ、核 ploidy を flow cytometry (FACS) で観察）及び胞体突起形成能
 - ③ 巨核球前駆細胞から巨核球への分化能（巨核球コロニー形成能：CFU-MK）
 - ④ 造血幹細胞の frequency (CD34⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻細胞を FACS で測定)
 - ⑤ 巨核球・赤血球前駆細胞の frequency (CD34⁻, c-kit⁺, Sca-1⁻, IL7R⁻, FcγR low, Lin⁻細胞を FACS で測定)
 - ⑥ 巨核球の超微形態観察（電子顕微鏡）
 - ⑦ 巨核球における細胞内情報伝達系の解析（免疫沈降法および western blotting）
- ### (3) 巨核球造血能の *in vivo* による解析
- ① 定常状態における血小板数
 - ② マウスに抗血小板抗体、5-FU などの抗がん剤投与により血小板数を減少させた後の血小板回復能（血小板数を継時的に観察）
 - ③ 抗血小板抗体または抗がん剤投与後血

血小板回復期の骨髄中巨核球のサイズ及び核 ploidy の観察 (FACS で観察)

- ④ 血小板回復期の巨核球の形態学的観察
- (4) 血小板機能検査
 - ① 血小板凝集能 (血小板惹起物質: thrombin, collagen, convulxin など)
 - ② 血小板接着能 (collagen, fibrinogen への血小板接着を蛍光顕微鏡で観察)
 - ③ 血小板における細胞内情報伝達系の解析 (免疫沈降法および western blotting)
- (5) 血小板機能の *in vivo* による解析
 - ① 出血時間の測定
 - ② 血小板寿命の測定 (FACS で観察)
 - ③ 血栓形成能の解析 (塩化鉄による血管障害によって生じる血栓を蛍光顕微鏡により観察)

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 巨核球造血における Bim の役割

造血幹細胞、巨核球をサイトカイン存在下で培養後にサイトカインを枯渇し apoptosis を誘導したところ、*bim* KO 血球は WT と比較して apoptosis に有意に耐性であることより、Bim は造血幹細胞及び巨核球の apoptosis 制御に重要な役割を果たすと考えられた。5-FU 投与後の血小板回復を観察したところ、野生型(WT)では投与後 8 日目以降に血小板数の overshoot がみられたが、*bim* KO では overshoot に先立つ早期の血小板回復が遅延していた。血小板回復期の骨髄を観察したところ、骨髄内巨核球は数、サイズ共に *bim* KO では有意に低下していた。しかしながら、巨核球胞体突起形成能を培養系で観察したところ、*bim* KO と WT で差は認められなかった。さらに造血幹細胞を TPO 存在下で培養し、巨核球への分化能を検討したところ、*bim* KO 造血幹細胞から巨核球への分化能の低下を認めた。また、*bim* KO では G1

から S 期への細胞周期進行が遅れていた。以上の結果から、Bim は造血幹細胞および巨核球の apoptosis、巨核球造血初期の細胞周期 エントリーを制御することが明らかになった。

② 巨核球造血における CD226 の役割

CD226 KO マウスの解析を行ったところ血小板数は WT と差がなかった。生体内での巨核球造血を評価するために 5-FU を投与したところ、KO マウスでは WT より血小板回復が早期に起こり、血小板数の overshoot が WT よりも著しく亢進していた。また、血小板回復早期の骨髄内巨核球数は、KO マウスで著しく増加していたが、胞体突起形成能には差を認めなかった。そこで、TPO 枯渇培養巨核球に TPO を添加し細胞内情報伝達を検討したところ、p44/42 及び Akt のリン酸化レベルは WT よりも KO 巨核球で亢進していた。最後に培養系での巨核球とストローマ細胞株(MS-5)との接着能、骨髄内 MK とストローマ細胞との接着を測定したところ、KO マウスでは WT と比較して有意に低下していた。以上のことから、CD226 は巨核球とストローマ細胞との接着をとおして、巨核球造血を負に制御することが示唆された。

③ 血小板機能における CD226 の役割

ヒト洗浄血小板に recombinant(rh) CD112, CD155 及びコントロールとして BSA を添加した後、collagen, convulxin での血小板凝集能を測定したところ、BSA 添加と比較すると rh CD112 添加では血小板凝集能は著しく抑制された。一方、rh CD155 添加による血小板凝集の抑制は rh CD112 添加時より弱かった。また、抗 CD226 ブロッキング抗体を添加すると rh CD112 添加により抑制された血小板凝集能が回復した。生体内における血小板機能の評価のために塩化鉄による血管障害モデルを作成したところ、CD226 KO マ

ウスで血栓形成が WT より亢進していた。また出血時間も KO マウスで短縮していた。以上の結果より、CD226 は血小板機能を負に制御する分子である可能性が示唆された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトと今後の展望

本研究課題の成果は、ただ単に巨核球造血に Bim など apoptosis 関連タンパクが関与するか否かを明らかにしたことにとどまらず、apoptosis 関連タンパクが巨核球造血のどの時期に、どのような役割を担い、どのようなメカニズムで制御されているのか明らかにした学術性の高いものである。また、一般的に造血細胞の成熟過程においては、造血細胞と骨髄間質細胞が接着することによる細胞間相互作用が重要な役割を果たすことが知られているが、巨核球造血における骨髄間質細胞及び内皮細胞との細胞間相互作用のメカニズムに関しては、今日までほとんど解明されてこなかった。しかし、以前研究代表者の研究グループは、巨核球・血小板に CD226 が発現していることを報告したが (Kojima H *et al.* J Biol Chem 2003; 278:36748-36753)、この論文は血小板・巨核球分野の多くの論文で引用されるなど注目を集めているおり、血小板・巨核球系における CD226 の役割を CD226 KO マウスを用いて検討している研究者は他にいないことより、極めて独創性が高く、本研究課題の成果のインパクトは大きい。また巨核球研究とは対照的に、血小板研究はその歴史も長く、血小板活性化分子やその活性化機構など詳細な検討が行われてきたが、生体内で血小板活性化を抑制する分子については nitric oxide (NO) や prostaglandin I₂ (PGI₂) など少数しか見出されていない。本研究課題の成果による CD226 の血小板活性化の抑制機構の発見は、血小板研究に新たな知見を分

子細胞生物学に付け加えることのみならず、血栓性疾患における有効な予防法及び治療法の開発など臨床医学研究に与えるインパクトは大きく、かつ臨床医学研究の推進に大きく寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kozuma Y, Sawahata Y, Takei Y, Chiba S, Ninomiya H. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Br J Haematol. 査読有, vol.152, 2011, 631-639
- ② 上妻 行則、二宮 治彦. 砂糖水 (ショ糖水) 試験, Ham 試験, Medicina. 査読無, 47 卷、2010、60-62
- ③ Kozuma Y, Ninomiya H, Murata S, Kono T, Mukai HY, Kojima H. The pro-apoptotic BH3-only protein Bim regulates cell cycle progression of hematopoietic progenitors during megakaryopoiesis. J Thromb Haemost. 査読有, vol. 8, 2010, 1088-97
- ④ 上妻 行則、二宮 治彦. 貧血の検査法 b) 溶血に関する検査、血液診療エキスパート 貧血. 査読無、2010、48-53
- ⑤ Sato S, Kozuma Y, Hasegawa Y, Kojima H, Chiba S, Ninomiya H. Enhanced expression of CD71, transferrin receptor, on immature reticulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Int J Lab Hematol. 査読有, 32(1 Pt 1), 2010, e137-43
- ⑥ 上妻 行則、小島 寛. 巨核球分化におけ

るカスパーゼ活性化の意義、血液・腫瘍科、査読無、60巻、2010、192-199

- ⑦ 上妻 行則、二宮 治彦. Ham 試験ほか、PNH に関する血液検査、「日本臨床」増刊号 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査、査読無、68巻、2010、629-631
- ⑧ 上妻 行則、二宮 治彦. 発作性夜間血色素尿症（PNH）診断のための CD55、CD59 検査、診断と治療、査読無、97巻、2009、1924-1926

〔学会発表〕（計4件）

- ① 上妻 行則、巨核球造血における細胞間接着因子 CD226(DNAM-1)の役割、第33回日本血栓止血学会学術集会、2010年4月23日、城山観光ホテル（鹿児島県）
- ② 上妻 行則、巨核球造血における apoptosis 関連タンパクの役割、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月24日、国立京都国際会館（京都府）
- ③ 向井 陽美、C-Myb と CD9 による新たな巨核球造血制御機構、第71回日本血液学会学術集会、2009年10月23日、国立京都国際会館（京都府）
- ④ 上妻 行則、巨核球造血・血小板産生に対する抗血小板抗体の影響、第32回日本血栓止血学会学術集会、2009年6月6日、リーガロイヤルホテル小倉・北九州国際会議場（福岡県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上妻 行則 (KOZUMA YUKINORI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：90550145