

学位論文題名

Stem Cell Factor Prevents Fas-Mediated Apoptosis of Human Erythroid Precursor Cells with Src-Family Kinase Dependency

(Stem cell factor は Src-family kinase に依存して
ヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する)

学位論文内容の要旨

1. 緒言

ヒトの造血系では Fas/Fas ligand (Fas-L) システムや、tumor necrosis factor- α (TNF α)、interferon- γ (IFN γ) などによる death domain を介したアポトーシスが造血調節に深く関与することが知られており、この機構の破綻が各種の疾患を引き起こすと考えられる。一方で stem cell factor (SCF) や erythropoietin (EPO) などの造血因子は血球の分化・増殖に働く。また、その存在がアポトーシスを回避に働くことが報告されているが、これらの生存シグナルが Fas/Fas-L を介する死のシグナルとどのように拮抗するのかは不明である。申請者は、ヒト正常赤芽球系前駆細胞の Fas/Fas-L 誘導アポトーシスが SCF によって阻害されることを見出した。SCF は EPO と異なり、多系列の造血幹・前駆細胞に作用し、その受容体(c-kit)とともに、造血細胞の分化・成熟、およびその生存や腫瘍化に深く関わる multi-potential cytokine である。すなわち、SCF の作用機序を Fas/Fas-L 誘導アポトーシスとの関連の上で解析することは、種々の骨髄増殖性疾患や骨髄不全疾患の病態解明に寄与すると考えられる。以上から、本研究では、SCF の細胞内シグナル伝達経路のうち、造血前駆細胞の Fas/Fas-L 誘導アポトーシスに焦点をあて、これに拮抗する SCF 惹起シグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

2. 対象と方法

健常人に G-CSF を投与して動員した末梢血造血幹・前駆細胞から、抗 CD34 モノクローナル抗体(mAb)と免疫磁性ビーズを用いて造血幹・前駆細胞を純化した(CD34⁺細胞)。純化 CD34⁺細胞を interleukin-3 (IL3)、SCF、erythropoietin (EPO) とともに血清含有液体培地で 7 日間培養し、赤芽球コロニー形成細胞 (erythroid colony-forming cells: ECFC) を得た。さらに抗 c-kit mAb と抗 glycoprotein A (GPA) mAb および磁性ビーズを用いて ECFC から GPA⁺/c-kit⁺細胞を純化し、同時に GPA⁺/c-kit⁺細胞と GPA⁻/c-kit⁺細胞を作成した。これらの細胞を対象として、Fas 類似 mAb(CH11)によるアポトーシスと、それに対する SCF の効果を検討した。コロニー形成法と液体培養には無血清培地を用い、免疫沈降・ゲル電気泳動・western blotting は既報 (BLOOD, 94 : 1568, 1999) のごとく行った。DNA 断片化は Cell Death Detection ELISA™ を用いた。Caspase 8 および Caspase 3 活性の測定にはそれぞれ FLICE/Caspase-8 Colorimetric Protease Assay Kit と CPP32/Caspase 3 Colorimetric Protease Assay Kit を用いた。

3. 結果

ECFC の分化レベルは、前期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)と同等であり、EPO 非存在下では急速にアポトーシスに陥るため、以下の検討はすべて EPO 存在下で行った。SCF は、抗 Fas mAb(CH11)による ECFC の赤芽球コロニー形成抑制を濃度依存性に解除した。その効果は、生理的濃度の 1ng/mL から認められた。SCF による CH11 誘導コロニー形成抑制の解除が、SCF による細胞表面の Fas (CD95) の down regulation によるものではないことを示すため、ECFC を EPO または EPO+SCF と 6 時間培養して前後の表面形質を検討した。その結果、Fas の発現に変化を認めなかった。また、細胞抑制を示さない抗 Fas mAb(ZB4)存在下では、CH11 の効果を認められなくなった。以上から、CH11 による赤芽球コロニー形成抑制と SCF によるその阻害は、それぞれ特異的な作用であることを確認した。CH11 による ECFC の DNA 断片化は時間依存性であり、培養 6 時間後から認められた。SCF はこの増加を部分的に抑制した。また、CH11 による caspase 8 と caspase3 の活性は培養 4 時間後から上昇したが、SCF によって部分的に抑制された。以上から、SCF は caspase 8 の活性化を抑制することで CH11 によるアポトーシスに拮抗していることが示唆された。ECFC は c-kit の発現に関して不均一な集団であることから、GPA⁺/c-kit⁺細胞、GPA⁺/c-kit⁻細胞、非赤芽球細胞 (GPA⁻/c-kit⁻細胞) のそれぞれについて CH11 による DNA 断片化と SCF によるその解除を検討した。その結果、GPA⁺/c-kit⁺細胞で CH11 による DNA 断片化と SCF によるその解除が認められた。GPA⁺/c-kit⁻細胞と非赤芽球細胞は CH11 による DNA 断片化に極めて抵抗性であった。以上から、SCF は c-kit を介して Fas/Fas-L 誘導アポトーシスに拮抗していることが明らかとなった。

次に SCF による生存シグナルを検討するため種々の阻害剤を用いて検討した。その結果、Src family kinase の特異的拮抗剤 PP2 によって、CH11 によるコロニー形成能抑制に拮抗する SCF の効果が完全に抑制された。一方、PP2 もしくはその非活性型 analog PP3 は EPO もしくは EPO+SCF で誘導した赤芽球コロニー形成を抑制しなかった。一方、非活性型 analog PP3 にはこの作用が認められなかった。さらに、PP2 は GPA⁺/c-kit⁺細胞において、SCF による CH11 誘導 DNA 断片化の解除を完全に阻止した。最後に ECFC における Src family kinase の存在を Lyn を指標として検討した。ECFC を SCF を除いた EPO 含有無血清培地で 12 時間培養し、SCF/EPO による Lyn のリン酸化と enolase 活性を測定した。SCF で処理 12 分後に enolase 活性の上昇を認め、SCF+EPO による enolase 活性の上昇はより顕著であった。

4. 結語

ヒト造血系のモデルとして、ヒト赤芽球系前駆細胞を用いて、Fas を介した細胞死とその SCF による拮抗メカニズムについて検討した。本論文において、SCF は CH11 によって誘導されるアポトーシスを解除すること、さらにこの解除は細胞表面上の現象ではなく、Src family kinase を介する細胞内の情報伝達経路に依存していることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男
副 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Stem Cell Factor Prevents Fas-Mediated Apoptosis of Human Erythroid Precursor Cells with Src-Family Kinase Dependency

(Stem cell factor は Src-family kinase に依存して
ヒト赤芽球系前駆細胞の Fas を介したアポトーシスを抑制する)

ヒトの造血系では Fas/Fas ligand (Fas-L) システムに代表される death domain を介したアポトーシスが造血調節に深く関与することが知られており、この機構の破綻が各種の疾患を引き起こすと考えられる。一方で stem cell factor (SCF) や erythropoietin (EPO) などの造血因子はアポトーシスに拮抗することが報告されているが、そのメカニズムは不明である。申請者は、ヒト正常赤芽球系前駆細胞の Fas/Fas-L 誘導アポトーシスが SCF によって阻害されることを見出した。本研究では、SCF の細胞内シグナル伝達経路のうち、造血前駆細胞の Fas/Fas-L 誘導アポトーシスに焦点をあて、これに拮抗する SCF 惹起シグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。対象と方法としては健常人に G-CSF を投与して動員した末梢血造血幹・前駆細胞から、抗 CD34 モノクローナル抗体(mAb)と免疫磁性ビーズを用いて造血幹・前駆細胞を純化した(CD34⁺細胞)。この細胞を interleukin-3 (IL3)、SCF、EPO とともに血清含有液体培地で 7 日間培養し、erythroid colony-forming cells (ECFC) を得た。さらに ECFC から SCF の受容体である c-kit により GPA⁺/c-kit⁺細胞を純化し、同時に GPA⁺/c-kit⁺細胞と GPA⁺/c-kit⁻細胞を作成した。これらの細胞を対象として、Fas に対するモノクローナル抗体 CH11 によるアポトーシスと、それに対する SCF の効果を検討した。SCF は、CH11 による ECFC の赤芽球コロニー形成抑制を濃度依存性に解除した。その効果は、生理的濃度の 1ng/mL から認められた。ECFC を EPO または EPO+SCF と 6 時間培養して前後の表面形質を検討したところ、Fas の発現に変化を認めなかった。すなわち Fas (CD95) は SCF による down regulation を受けていなかった。CH11 による ECFC の caspase 8 と caspase 3 の活性上昇および DNA 断片化は時間依存性であり、それぞれ培養 4 時間後および 6 時間後

から認められた。SCFはこの増加を部分的に抑制した。以上から、SCFは caspase 8の活性化を抑制することでCH11によるアポトーシスに拮抗していることが示唆された。次に、GPA⁺/c-kit⁺細胞、GPA⁺/c-kit⁻細胞、非赤芽球細胞（GPA⁻/c-kit⁻細胞）のそれぞれについてCH11によるDNA断片化とSCFによるその解除を検討した。その結果、GPA⁺/c-kit⁺細胞でCH11によるDNA断片化とSCFによるその解除が認められた。GPA⁺/c-kit⁺細胞はCH11によるDNA断片化に極めて抵抗性であり、非赤芽球細胞のDNA断片化の振幅はGPA⁺/c-kit⁺細胞の10分の1以下であった。また、Src family kinaseの特異的拮抗剤PP2によって、CH11によるコロニー形成能抑制に拮抗するSCFの効果が完全に抑制された。さらに、PP2はGPA⁺/c-kit⁺細胞において、SCFによるCH11誘導DNA断片化の解除を完全に阻止した。最後にECFCにおけるSrc family kinaseの存在をLynを指標として検討した。ECFCをSCFを除いたEPO含有無血清培地で12時間培養し、SCFで刺激したところLynのリン酸化とenolase活性の上昇を認めた。以上から本論文において、SCFはCH11によって誘導されるアポトーシスを解除すること、さらにこの解除は細胞表面上の現象ではなく、Src family kinaseを介する細胞内の情報伝達経路に依存していることが示された。

質疑応答においては副査細川教授からSCFの生理的作用やECFCの性状、Fas-Lとして用いたモノクローナル抗体CH11と生体内のFas/Fas-Lにおけるシグナルの相違についての質問があった。次いで副査畠山教授から、生理的な状況におけるFas/Fas-Lの細胞死とそれに拮抗するSCFの作用の意義、Src family kinaseへのPP2の特異性についての質問があった。次いで主査西村教授から、赤芽球表面上のFas/Fas-Lを介した赤血球造血調節が実際に起こっている根拠、GVHDなどの赤血球系以外の系におけるFasによるアポトーシスとそれにSCFが拮抗する可能性についての質問があった。次いで副査小池教授から、今回の検討で赤芽球のアポトーシスに拮抗するサイトカインとしてSCFを選んだ理由、今回用いた正常赤芽球ではなく、細胞株を用いた同様の検討の有無についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論文における検討から、今後は骨髄不全における臨床応用や、赤芽球のみならず種々の細胞におけるFas/Fas-Lによる細胞死とそれに拮抗するSCFの作用の解明が期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。