

学位論文題名

Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Involved  
in the Protection of Primary Cultured Human  
Erythroid Precursor Cells From Apoptosis

(ホスファチジルイノシトール3キナーゼは  
ヒト正常赤芽球前駆細胞のアポトーシスの阻害に關与する)

学位論文内容の要旨

1. 緒言

赤血球の分化・増殖は種々のサイトカインや造血微少環境に制御された複雑な機構よりなっている。多くのサイトカインの中でも erythropoietin (EPO)は、正常赤血球造血に必須の因子であり、EPO 受容体を介したシグナル伝達は、後期赤芽球系前駆細胞(colony forming unit-erythroid: CFU-E)の増殖、分化、生存を制御している。これまでの研究から、EPO の受容体への結合は、チロシンキナーゼ型受容体蛋白 Jak2 を一過性に活性化し、さらに Jak2 自体や STAT 蛋白、phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI-3K)、SHP-1、Shc、Vav、Gab1、Gab2、Syk、Ship、IRS-2 および EPO 受容体など、多くの蛋白のチロシンリン酸化を引き起こすことが明らかにされている。そのなかで、PI-3K は種々の細胞のアポトーシスを抑制するが、ヒト正常赤芽球系前駆細胞の生存、増殖、分化における PI-3K の生理的な役割についてはほとんど解明されていない。一方、シグナル伝達実験には  $10^7$  個から  $10^8$  個レベルの均質な細胞が必要であり、正常ヒト造血前駆細胞を得ることが困難であったことから、これまでは主に株化細胞が研究に用いられてきた。しかし、造血細胞のシグナル伝達経路は検討に供する株化細胞によって異なることが明らかになりつつある。また種特異性が存在する。本研究では、ヒト CD34 陽性細胞の大量純化と系特異的分化・増殖誘導を用いて、ヒト正常造血前駆細胞におけるシグナル伝達実験を可能にした。このような背景をもとに、EPO 惹起シグナル伝達経路のなかで、これまでの細胞株を用いてきた研究では報告結果が様々でその意義が不明であった PI-3K 系に關し、特異的 PI-3K 阻害剤 LY294002 を用いて造血前駆細胞における PI-3K の生理的意義について検討した。

2. 対象と方法

ヒト CFU-E : 健康人に顆粒球コロニー刺激因子(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 (IL-3)、stem cell factor (SCF)、EPO とともに血清含有液体培地で7日間培養して

CFU-E を得た。CFU-E の分化・増殖誘導：純化ヒト CD34+細胞を EPO, SCF 及び IL-3 とともに液体培養し、赤芽球系への分化・増殖誘導を行った。8 日目に細胞を回収し CFU-E に相当する細胞を得た。コロニー形成法：EPO (2U/ml) を含む 0.25ml の無血清 fibrin clot 培地に CFU-E を 1,000 個/ml 濃度で植え込み、5%CO<sub>2</sub>/10%O<sub>2</sub> incubator で 7 日間培養後、固定しヘモグロビン(Hb)染色を行った。Hb 陽性細胞 2 個以上からなるものを赤芽球コロニーとして算定した。液体培養：1×10<sup>5</sup>~5×10<sup>5</sup> 個/ml の CFU-E を EPO (2U/ml) を含む無血清液体培地に浮遊して検討した。フローサイトメトリー：propidium iodine と annexin V との二重染色を行い FACS Calibur で測定した。免疫沈降・ゲル電気泳動・western blotting：既報 (BLOOD, 92:443, 1998) のごとく行った。アポトーシス：DNA 断片化は Cell Death Detection ELISA™ を用い、cytosolic oligonucleosome-結合 DNA を定量した。

### 3. 結果

ヒト CFU-E の増殖に対する PI-3K 阻害剤 LY294002 の影響をコロニー形成法と液体培養法を用いて検討した。LY294002 は 10-20 μmol/L でヒト CFU-E の増殖を抑制し、最大抑制は 50 μmol/L で認められた。この抑制は濃度依存性であるとともに時間依存性であり、且つ、不可逆性であった。また、生細胞率に影響を与えない時点から CFU-E のコロニー形成を抑制することから、その機序にアポトーシスの関与を推定した。実際、LY294002 によって annexin V 陽性細胞の増加が認められ、また、濃度及び時間依存性の DNA 断片化の増加が認められたことから、少なくともその一部にアポトーシスが関与していることが明らかとなった。そこで、PI-3K の下流の分子である AKT の Ser-473 のリン酸化について検討したところ、AKT は恒常的にリン酸化しており、増殖を抑制する LY294002 の濃度でリン酸化が抑制された。すなわち、LY294002 の PI-3K に対する効果は特異的であると考えられ、PI-3K はその下流の AKT などを介して、ヒト CFU-E のアポトーシスに対して拮抗的に働いていると考えられた。しかし、この LY294002 が抑制する経路は、EPO のすべての抗アポトーシス効果を説明するものではなかった。すなわち、培養液から EPO を除くことによって LY294002 の有無に関わらずアポトーシスが促進される一方で、LY294002 は EPO の有無に関わらずアポトーシスを促進した。

### 4. 結語

本検討においては、これまで不明であった造血前駆細胞、少なくとも赤芽球系前駆細胞の生存における PI-3K 経路の重要性をはじめ明らかにした。また、本検討から、ヒト CFU-E をアポトーシスから防御する 2 つの経路が推定された。一つは、LY294002 に感受性のある経路であり、これは EPO とは直接関連していない可能性がある。また、他の経路は明らかに EPO 依存性で、少なくともその一部は LY294002 に対して非感受性であった。ヒト正常造血前駆細胞の生化学的解析は、単に細胞株で得られたものの追試に終わるものではなく、分化およびその増殖と死におけるシグナル伝達経路の細胞の特異性が真の意味で明らかになる可能性がある。この様な系を発展させることにより種々の造血障害の機構に対する理解がより一層深まると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 孝 司  
副 査 教 授 畠 山 昌 則  
副 査 教 授 細 川 眞澄男  
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

## Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Involved in the Protection of Primary Cultured Human Erythroid Precursor Cells From Apoptosis

(ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼは  
ヒト正常赤芽球前駆細胞のアポトーシスの阻害に関与する)

エリスロポイエチン(EPO)は赤血球造血の後半で重要な役割を持ち、特に colony forming unit-erythroid(CFU-E)で感受性が最大である。EPO 下流の因子の一つに phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K)がある。既報での赤芽球系の細胞株における PI-3K の役割は細胞株ごとに異なっていた。ヒト正常赤芽球系前駆細胞の生存、増殖、分化における PI-3K の生理的な役割は、これまで検討に十分な量の細胞を得るのが困難であったため、ほとんど解明されていない。このような背景をもとに、特異的 PI-3K 阻害剤 LY294002 を用いて造血前駆細胞における PI-3K の生理的意義について検討した。ヒト CFU-E は健康人に顆粒球コロニー刺激因子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+細胞をインターロイキン 3、stem cell factor(SCF)、EPO とともに血清含有液体培地で 7 日間培養して得た。まず、ヒト CFU-E の増殖に対する LY294002 の影響をコロニー形成法と液体培養法にて検討した。LY294002 は 10-20  $\mu\text{mol/l}$  でヒト CFU-E の増殖を抑制し、最大抑制は 50  $\mu\text{mol/l}$  で認められた。この抑制は濃度依存性であるとともに時間依存性であり、且つ、不可逆性であった。また、生細胞率に影響を与えない時点から CFU-E のコロニー形成を抑制することから、その機序にアポトーシスの関与を推定した。実際、LY294002 によって annexin V 陽性細胞の増加が認められ、また、濃度及び時間依存性の DNA 断片化の増加が認められたことから、少なくともその一部にアポトーシスが関与していることが判明した。そこで、PI-3K の下流の分子である AKT の Ser-473 のリン酸化について検討したところ、AKT は恒常的にリン酸化しており、増殖を抑制する LY294002 の濃度でリン酸化が抑制された。すな

わち、PI-3Kはその下流のAKTなどを介して、ヒトCFU-Eのアポトーシスに対して拮抗的に働いていると考えられた。しかし、このLY294002が抑制する経路は、EPOの全ての抗アポトーシス効果を説明するものではなかった。即ち、EPOの除去によりLY294002の有無に関わらずアポトーシスが促進される一方、LY294002はEPOの有無に関わらずアポトーシスを促進した。

本検討はこれまで不明であった赤芽球系前駆細胞の生存におけるPI-3K経路の重要性をはじめて明らかにした。また、本検討から、ヒトCFU-Eをアポトーシスから防御する2つの経路が推定された。一つは、LY294002に感受性のある経路であり、これはEPOとは直接関連していない可能性がある。また、他の経路は明らかにEPO依存性で、少なくともその一部はLY294002に対して非感受性であった。

発表終了後、畠山教授から、FasによるアポトーシスがSCFにて阻害されることとの関連についてとEPO以外からのPI-3K経路に関して質問があった。続いて細川教授からはEPOの除去後のEPO再添加で赤芽球系前駆細胞が増殖に関してとEPOによるPI-3K活性化の存在および、実際の腫瘍細胞でのPI-3Kの役割に関して質問があった。西村教授からはAKTの腫瘍への関与への指摘と抗腫瘍療法への応用に関して質問がなされた。最後に、小池教授からは、EPOの細胞死を抑制する機序に関して質問があった。これらの質問に対し、申請者は概ね適切な回答をした。

この論文はヒト正常赤芽球系前駆細胞において初めてPI-3K経路の重要性を明らかにしたとして高く評価され、今後の同様の系によるヒト正常造血前駆細胞の生化学的解析は、細胞株で得られた結果の追試に終わるものではなく、分化および増殖と死における情報伝達経路の細胞の特異性が真の意味で明らかにする可能性を持つものと期待される。

審査員一同は、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。