

学位論文題名

Stem Cell Factor Protects c-kit⁺ Human Primary Erythroid Cells from Apoptosis

(Stem cell factor は c-kit 陽性ヒト赤芽球系前駆細胞の
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、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。また、stem cell factor (SCF) や erythropoietin (EPO) などの造血因子は血球の分化・増殖に働き、その存在がアポトーシス回避に働くことが報告されている。しかし、正常ヒト造血前駆細胞のアポトーシスに関与する SCF の作用機序や細胞内シグナル伝達経路は不明である。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・生存に深く関わる multi-potential cytokine である。また SCF は、白血病や骨髄異形成症候群を含む腫瘍細胞の増殖に深く関わっている。すなわち、SCF の作用機序をアポトーシスとの関連の上で解析することは、種々の骨髄不全疾患や骨髄増殖性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、正常ヒト赤芽球系前駆細胞をモデルとして、cytokine depletion によるアポトーシスに感受性を有する赤芽球系細胞を同定し、造血前駆細胞のアポトーシスに拮抗する SCF の細胞内シグナル伝達経路を解析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 (IL-3)、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 と磁性ビーズを用いて ECFC から Glycophorin A⁺ (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、cytokine depletion 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。コロニー形成法には血清含有培地、液体培養には無血清培地を用いた。DNA 断片化は、細胞質内 DNA を電気泳動で確認するとともに、Cell Death Detection ELISA™ を用いて定量化した。また、アポトーシス細胞は、Annexin-V を用いて flow cytometry にて解析した。AKT リン酸化の測定は、既報(BLOOD, 94 : 1568, 1999)のごとく western blotting にて行った。

3. 結果

ECFC の分化レベルは、前期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)と同等であるが、ECFC は

SCF の受容体である 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各種サイトカインによる DNA 断片化を検討した。その結果、GPA⁺/c-kit⁺細胞ではサイトカインフリーで著明な DNA 断片化を認めしたが、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サイトカインフリーによる DNA 断片化に極めて抵抗性であった。以上から、SCF は c-kit⁺赤芽球系前駆細胞のアポトーシスに拮抗していることが明らかとなった。SCF は、EPO と同様に単独でも GPA⁺/c-kit⁺細胞のコロニー形成能を保持したが、その効果は一時的であった。SCF は、ECFC の DNA 断片化を濃度依存性に解除した。その効果は、生理的濃度の 1~5ng/mL から認められた。

SCF がヒト赤芽球系前駆細胞のアポトーシスを抑制する細胞内経路については、これまでの検討で、Src family kinase が Fas 介在の細胞死に拮抗する生存シグナルとして重要な働きをしていることが示唆されている。そこで Src family kinase の特異的阻害剤である PP2 を用いて、SCF がアポトーシスを抑制する際の Src family kinase の関与を検討した。その結果、DNA 断片化を解除する SCF の効果は、PP2 によって抑制された。一方、PP2 の非活性型 analog PP3 にはこの作用が認められなかった。また、PP2 は DNA 断片化を解除する EPO の効果を抑制しなかった。以上より、赤芽球系前駆細胞のアポトーシスに拮抗する SCF の生存シグナルは、EPO と異なり Src family kinase を介していることが示された。

PI-3K/AKT 経路は CFU-E の生存維持経路であることが証明されている。そこで、SCF による赤芽球系前駆細胞のアポトーシス抑制における PI-3K の関与を、Src family kinase との関連のもとで、AKT を指標として検討した。ECFC に SCF を加えて AKT リン酸化を検討したところ、PI-3K 阻害剤の LY294002 や PP2 の添加で、SCF による AKT リン酸化阻害された。このことから、SCF による Akt リン酸化に Src family kinase が関与していることが示唆された。

4. 結語

ヒト造血系のモデルとして、正常ヒト赤芽球系前駆細胞を用いて、アポトーシスに対する SCF の拮抗メカニズムについて検討した。本論文において、SCF は GPA⁺/c-kit⁺ ヒト赤芽球系前駆細胞のアポトーシスを抑制すること、およびその抑制として、Src family kinase から PI-3K/AKT 経路が関与していることを示した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 今村 雅寛
副査 教授 長嶋 和郎
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 Protects c-kit⁺ Human Primary Erythroid Cells from Apoptosis

(Stem cell factor は c-kit 陽性ヒト赤芽球系前駆細胞の
アポトーシスを抑制する)

ヒトの造血系では、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。また、stem cell factor (SCF)や erythropoietin (EPO)などの造血因子は血球の分化・増殖に働き、その存在がアポトーシス回避に働くことが報告されている。しかし、正常ヒト造血前駆細胞のアポトーシスに関与する SCF の作用機序や細胞内シグナル伝達経路は不明である。本研究では、正常ヒト赤芽球系前駆細胞をモデルとして、cytokine depletion によるアポトーシスに感受性を有する赤芽球系細胞を同定し、造血前駆細胞のアポトーシスに拮抗する SCF の細胞内シグナル伝達経路を解析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)。純化 CD34⁺細胞を interleukin-3 (IL-3)、SCF、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 と磁性ビーズを用いて ECFC から Glycophorin A⁺ (GPA⁺)/c-kit⁺細胞を純化し、同時に GPA⁺/c-kit⁻細胞と非赤芽球系細胞を作成した。これらの細胞を対象として、cytokine depletion 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。GPA⁺/c-kit⁺細胞では cytokine depletion で著明な DNA 断片化を認めたが、SCF は単独で濃度依存性に DNA 断片化を解除した。その効果は、生理的濃度の 1ng/mL から認められた。GPA⁺/c-kit⁻細胞と非赤芽球細胞は cytokine depletion 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⁺赤芽球系前駆細胞のアポトーシスに拮抗していることが明らかとなった。また、GPA⁺/c-kit⁺細胞の DNA 断片化を解除する SCF の効果は、Src family

kinase の特異的拮抗剤 PP2 によって完全に抑制された。一方、PP2 は DNA 断片化を解除する EPO の効果を抑制しなかった。以上より、赤芽球系前駆細胞のアポトーシスに拮抗する SCF の生存シグナルは、EPO と異なり Src family kinase を介していることが示された。さらに、SCF による赤芽球系前駆細胞のアポトーシス抑制における PI-3K の関与を、Src family kinase との関連のもとで、AKT を指標として検討した。ECFC に SCF を加えて AKT リン酸化を検討したところ、PI-3K 阻害剤の LY294002 や PP2 の添加で、SCF による AKT リン酸化が阻害された。このことから、SCF による AKT リン酸化に Src family kinase が関与していることが示唆された。以上から本論文において、SCF は $GPA^+/c\text{-kit}^+$ ヒト赤芽球系前駆細胞のアポトーシスを抑制すること、およびその抑制機序として、Src family kinase から PI-3K/AKT 経路が関与していることが示された。

質疑応答においては副査長嶋教授から、PP2 の細胞毒性について、 GPA^+ 細胞中の $c\text{-kit}^+$ 細胞の割合、 $GPA^+/c\text{-kit}^-$ 細胞がアポトーシスを起こさない理由についての質問があった。次いで副査畠山教授から、PP2 が Src family kinase の中のどのタンパクを抑制しているか、また Src family kinase への PP2 の特異性についての質問があった。次いで副査小池教授から、SCF が赤芽球系のアポトーシスを抑制する生理的な意義について、さらに赤芽球系以外の細胞に対する SCF のアポトーシス抑制作用の有無についての質問があった。次いで主査今村教授から、EPO の存在下で、SCF の有無ではコロニー形成能に差がないが、DNA 断片化に差が出ている理由、SCF が非赤芽球系細胞よりも赤芽球系細胞に強く影響する生理的意義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、今後は骨髄不全疾患や骨髄増殖性疾患における臨床応用や、赤芽球のみならず種々の細胞のアポトーシスに拮抗する 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。