

氏 名	みず 水 たに 谷 ち 知 さと 里
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2612 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Sustained activation of MEK1 - ERK1 / 2 pathway in membrane skeleton occurs dependently on cell adhesion in megakaryocytic differentiation (巨核球分化の際に MEK1-ERK1/2 シグナル経路の膜分画における持続的な活性化は細胞接着に依存性におこる)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

造血システムは液性因子と細胞間相互作用によって制御されている。血液幹細胞は骨髓内で間質細胞や、細胞外間質より様々なシグナルを細胞接着を介して受け取っていると推測される。一方スペクトリンは膜骨格の主な構成分子として知られており、アクチン繊維とネットワークを構成している。膜骨格は格子状となって膜蛋白と結合しており、レセプター、イオンチャネルの分布に重要で、細胞形態・極性・接着に影響を及ぼしていると考えられている。

ヒト巨核球性白血病細胞株 CMK は TPA 処理によって培養プレートに接着し、巨核球へ分化誘導する。一方 MAP (mitogen-activated protein) キナーゼの細胞質での一時的活性化と核へ移動後の持続的活性化はこの分化に必須であることはよく知られている。本研究では、CMK 細胞の分化誘導過程における膜分画 MAP キナーゼの活性化を、細胞接着との関連に着目して検討した。

まず、CMK 細胞を 10,000g TritonX 可溶性分画、100,000g TritonX 不溶性分画、100,000g TritonX 可溶性分画に分けたところ、100,000g TritonX 不溶性分画がスペクトリンを主に含む分画であり、これ以降この分画を膜骨格分画(膜分画)として解析を行った。TPA 刺激によって MEK (MAPK/ERK kinase) 1 および ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2 の活性化が膜分画において二相性に見られた。最初の活性化は TPA 刺激により浮遊状態で見られたが、これは一過性(60分以内)で細胞辺縁突起部(スペクトリンに一致し膜骨格を反映する)に観察された。第二相目の活性化は細胞接着した場合に、同じく膜分画に持続性に見られ、浮遊状態では活性の持続は認められなかった。また接着を解除した場合には MEK1 および ERK1/2 の第二相目の活性化は消失し、再接着するとこの第二相目の活性化が認められた。

次にどちらの活性化が分化に重要かを検討した。接着面の基質に関わらず接着が持続している場合にのみ、CMK は分化インテグリン α IIb $\cdot$ β 3 を発現し、接着を解除した場合や第二相目の MEK/ERK の活性化を抑制した場合は発現の低下が認められた。

細胞質の ERK1/2 は microtubule に沿って分布しているが、この分布は Nocodazole によって microtubule を阻害しても変化はない。しかし、細胞接着に伴い CMK 細胞が分化すると、microtubule に沿った ERK1/2 の分布は失われる。

以上により、本研究において CMK 細胞における TPA 刺激による分化過程において、膜分画における MAP キナーゼの活性化は二相性に認められ、第一相目は TPA による直接刺激、第二相目は接着に伴い持続するものと考えられた。また MEK1-ERK1/2 シグナル経路の持続的な活性化は細胞接着に依存して膜分画でおこり、この膜分画における持続的な活性化が CMK 細胞における TPA 刺激による巨核球への分化に必要であると考えられた。また ERK1/2 と microtubule の分布の一致は、一部の ERK1/2 が microtubule 上に沿って膜分画に移動し、そこで活性化され、細胞が強固に接着し分化すると、microtubule から離れる可能性が推測される。

論文審査の結果の要旨

血液細胞は骨髄内で様々なシグナルを細胞接着を介して受け取っていると推測される。しかし、細胞接着と細胞分化の関係にはいまだ解明されていない部分も多い。本研究は、ヒト巨核球性白血病細胞株 CMK 細胞の分化誘導過程における膜分画 MAP キナーゼの活性化を、細胞接着との関連に着目して検討したものである。

TPA 刺激による MAP キナーゼの活性化が CMK 細胞の分化に必要なことは知られているが、このとき膜分画では MEK1/ERK の活性化が二相性に認められた。最初の活性化は浮遊状態で一過性に、第二相目の活性化は細胞接着した場合のみに持続性に認められた。また接着が持続している場合にのみ、CMK は分化インテグリンを発現し、接着を解除した場合や第二相目の MEK1/ERK の活性化を抑制した場合は発現の低下が認められた。すなわち膜分画における接着に伴う MAP キナーゼの持続的活性化が CMK 細胞における TPA 刺激による巨核球への分化に必要であると考えられた。さらに細胞質の ERK1/2 は microtubule に沿って分布しているが、細胞接着に伴い分化するとこの分布は失われることが確認され、一部の ERK1/2 が microtubule 上に沿って膜分画に移動し、細胞が接着するとそこから離れる可能性が推測された。

本研究は、血液細胞の分化と細胞接着との関係の解明に貢献し、血液細胞の分化過程の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位申請者は平成15年3月3日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。