

氏 名	お だ まさ あき 小 田 昌 朗
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1289 号
学位授与の日付	平 成 14 年 5 月 23 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Regulatory Factors Involved in Megakaryocytopoiesis (巨核球・血小板形成に関与する制御因子に関する研究)

(主 査)
論文調査委員 教 授 永 尾 雅 哉 教 授 伏 木 亨 教 授 小 川 正

論 文 内 容 の 要 旨

種々の異なる機能を持った血液細胞は、共通の造血幹細胞から様々な造血因子等の作用を受けて、分化、成熟する。血小板は止血機能を持つ血液細胞だが、正確には巨核球がさらに分化し、胞体突起形成 (PPF) した後の細胞断片であり、巨核球の形成においては、特異的に作用する造血因子であるトロンボポエチン (TPO) の寄与するところが大きい。しかし、他の血液細胞における造血因子の役割が広く解明されているのに比べて、巨核球における TPO の役割に関する研究は遅れていた。本研究では高純度に精製した巨核球を調製し、TPO によって巨核球で発現誘導される 2 種類のケモカインの、巨核球、血小板形成に対する機能や、新規 regulator of the G-protein-signaling (RGS) タンパク質の巨核球での機能について解析している。主な研究成果は次の通りである。

1. 巨核球で TPO により誘導される遺伝子の同定

マウス骨髓細胞より精製した巨核球において TPO により誘導される因子の探索を PCR-subtraction 法を用いて行い、TPO によって発現の上昇する遺伝子として、CXC motif を持つ 2 種類のケモカイン、platelet factor-4 (PF-4) と未知遺伝子を見出した。未知遺伝子の発現は脾臓に限局していた。相同性検索を行った結果、この未知遺伝子はヒト neutrophil activating peptide-2 (NAP-2) のマウス homologue であると結論した。

2. NAP-2, PF-4 の巨核球成熟分化における役割

巨核球形成を促進する TPO で、巨核球形成に阻害効果を持つとされるケモカインである NAP-2 と PF-4 が誘導されたことより、巨核球からの血小板産生過程に対し阻害的なフィードバック機構が働いていると推測し、これらのケモカインの多倍体化・PPF における役割を調べた。まず、マウス骨髓より精製した成熟巨核球の PPF に対する PF-4, NAP-2 の影響を調べたところ、NAP-2 ではわずかであったが、PF-4 は強力に PPF を阻害した。また、c-Kit⁺ CD41⁺ として精製した未成熟な巨核球前駆細胞に対する影響も調べたところ、PF-4 は PPF 阻害効果だけでなく、多倍体化に対する抑制効果も示した。未成熟巨核球では NAP-2 でも PPF 阻害効果が見られた。TPO との共存で巨核球形成において促進効果を持つことが報告されている CXC ケモカインの一種である SDF-1 についてもポジティブコントロールとして巨核球分化への影響を調べたところ、SDF-1 単独でもその効果を発揮することを見い出した。以上のケモカインの効果は、B 細胞より分化誘導させた巨核球でも確認できた。PF-4 は、ストローマ細胞における TPO 産生に阻害的に働くという報告があることから、TPO により発現が誘導される NAP-2 と PF-4 は、巨核球特異的な分化形態に対し、直接オートクラインで作用するだけでなく巨核球形成を支持するシステムにネガティブに働いている可能性が示唆された。

3. 巨核球特異的新規 RGS タンパクの性状解析

TPO により制御を受ける因子探索の際、新規のマウス RGS18 cDNA を単離した。この cDNA は 235 残基のアミノ酸からなる分子量約 28kDa のタンパク質をコードしていた。そして RGS タンパク質で保存されている RGS ドメインのアミノ酸配列で系統樹を作成した結果、RGS18 はサブファミリー B に属しており、その中でも RGS5 と最も相同性が高かった。

また RGS18 は脾臓でもっとも高い発現が観察された。次に、RGS18 に対するラット抗血清を作製して脾臓の凍結切片を免疫染色した結果、巨核球が特異的に染色され、巨核球内では細胞質に存在することが明らかになった。RGS18 は G タンパク質 α サブユニットの 4 つのサブファミリーのうち G_{ai} と G_{aq} に対して明らかに GTPase activating protein (GAP) 活性促進効果を示した。また *in vitro* binding assay においても RGS18 は、活性化状態の G_{ai} と G_{aq} と結合した。次に実際にどのような刺激で RGS18 と G_{α} サブユニットが結合するか調べるため、その受容体が G タンパク質結合型であるケモカインでの刺激を試みた。その結果、SDF-1 により RGS18 と G_{ai} の結合促進を確認できた。SDF-1 は巨核球の分化過程に促進効果をもつということ、また RGS18 が特に巨核球に高発現していることから、RGS18 は、G タンパク質を介した巨核球の機能に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

種々の血液細胞は共通の造血幹細胞から、様々な造血因子や骨髄ストローマ細胞が作用することで、分化、増殖過程を経て成熟する。血小板は止血機能を持つ血液細胞であるが、正確には巨核球が分化し、胞体突起形成 (PPF) した後の細胞断片であり、巨核球形成には、特異的に作用するサイトカインであるトロンボポエチン (TPO) の寄与するところが大きい。しかし、他の血液細胞における造血因子の役割が広く解明されているのに対し、巨核球形成における TPO の研究は遅れていた。その理由として TPO の同定が他の造血因子に比べ遅かったことも挙げられるが、材料となる巨核球の確保が困難なこと、また巨核球の性状を示すような細胞株が存在しなかったことが一番の原因であった。そこで、本論文ではそれらを補うために、骨髄細胞の *ex vivo* culture 及び、ES 細胞からの巨核球への分化誘導系から高純度に精製した巨核球を得て、巨核球・血小板形成に関与する制御因子に関する研究を行った。成果として評価すべき点は次の通りである。

1. 巨核球特異的に作用する TPO により誘導される遺伝子を PCR-subtraction 法を用いて探索し、NAP-2 と PF-4 の 2 種のケモカインを同定している。NAP-2 はこれまでに報告のない未知遺伝子であったが、相同性検索の結果、ヒト NAP-2 のマウス homologue であると結論づけている。
2. NAP-2、PF-4 の巨核球の分化過程における影響を調べ、NAP-2 は PPF に、また PF-4 は PPF と多倍体化に抑制的に働くことを明らかにした。これまで、TPO との共存で巨核球形成を促進するという報告のあった SDF-1 は、SDF-1 単独でも PPF 促進効果を有することを明らかにした。巨核球に作用する TPO は、巨核球の分化促進に寄与するだけでなく、同時に巨核球自身、また巨核球形成を支持する環境に対してもネガティブに作用するケモカインの生成を促し、巨核球の過度の分化を抑制している可能性を示した。
3. 新規の RGS タンパク質、RGS18 が、巨核球で高発現しており、G タンパク質シグナル経路の G_{ai} と G_{aq} に対する結合能、GAP 活性を有していること、またその際 G_{ai} と G_{aq} に対する結合能は SDF-1 により上昇することを明らかにしている。これらの結果から、RGS18 は、G タンパク質を介した巨核球の機能に関与している可能性を示唆した。

以上のように、本論文は今まで血液細胞の成熟過程の研究の中で遅れていた巨核球、血小板の分化増殖過程に関する新しい知見を得ており、栄養生化学、細胞生理機能学、生体情報応答学、分子細胞生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年4月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。