

氏名(本籍)	南口仁志(大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第383号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成13年9月12日
学位論文題目	Simultaneous signaling through c-mpl, c-kit, and CXCR4 enhances the proliferation and differentiation of human megakaryocyte progenitors: possible roles of the PI3-K, PKC, and MAPK pathways. (ヒト巨核球系前駆細胞の増殖分化に対するThrombopoietin, Stem cell factor, Stromal cell-derived factor-1の制御作用－PI3-K, PKC, MAPKの役割－)
	審査委員 主査 教授 小笠原 一 誠 副査 教授 木村 博 副査 教授 佐藤 浩

## 論文内容の要旨

### 【目的】

ヒト造血幹細胞の純化と増幅は、造血幹細胞移植療法への応用といった臨床的な展開もあって、今日、極めて重要な課題となっている。ヒト造血幹細胞において、c-mpl、c-kit、CXC receptor-4(CXCR4)を介するシグナルの活性化による巨核球系前駆細胞の増殖分化に対する作用について検討し、同時に、Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)、Protein kinase C (PKC)、Mitogen activated protein kinase (MAPK) pathwayを介するシグナルの意義について解析を試みた。

### 【方法】

アフエレーシスにより採取した末梢血由来の単核細胞を、CD34、IL-6 receptor (IL-6R)、c-kit、CXCR4に対するモノクローナル抗体で多重染色後に、FACSにより分画し、CD34<sup>+</sup>IL-6R<sup>-</sup>細胞における、c-kit、CXCR4の発現パターンの解析を行った。メチルセルロース法により、Thrombopoietin (TPO)、Stem cell factor (SCF)、Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)存在下で無血清培養を行った。形成された巨核球コロニーを回収し、Propidium iodideで染色した後、epifluorescent microfluorometryを用いて巨核球のDNA contentを測定した。次に、メチルセルロース法により、TPO、SCF、SDF-1存在下での巨核球コロニー形成に対するPI3-K 阻害剤 (LY294002)、PKC阻害剤 (GF109203X)、MEK阻害剤 (PD98059) の影響を検討した。また、TPO、SCF、SDF-1存在下で無血清液体培養を行い、CD41<sup>+</sup>細胞の増殖及びそのDNA contentに対するPD98059の影響を検討した。TPO存在下で5日間無血清液体培養を行い、増殖した巨核球をTPO、SCF、SDF-1存在下で無血清液体培養を行い、倒立顕微鏡下にProplateletの形成数を経時的に測定した。Proplateletの形成数に対するPD98059の影響を検討した。

### 【結果】

末梢血由来CD34<sup>+</sup>細胞におけるIL-6R、c-kit、CXCR4の発現は、80% (図1-B)、30~40% (図1-D)、50~60% (図1-E、F、G)であった。CD34<sup>+</sup>IL-6R<sup>-</sup>細胞におけるc-kitの発現は50~60%であり (図1-I)、一方、CXCR4の発現は20~30%で、c-kit<sup>high</sup>分画に比べてc-kit<sup>low</sup>分画に高い傾向がみられた (図1-I)。SDF-1単独、SCF単独、SDF-1+SCFは、CD34<sup>+</sup>IL-6R<sup>-</sup>細胞由来の巨核球コロニー形成を支持しなかった。TPOは巨核球コロニー形成を支持し、TPO+SCF、TPO+SDF-1は、巨核球コロニー数を有意に増加させた。TPO+SCF+SDF-1は、TPO単独に比べ巨核球コロニー数を約2倍に増加させた (図2)。巨核球コロニー形成に対する、SDF-1、SCF、TPOの協調作用は、CD34<sup>+</sup>IL-6R<sup>-</sup>c-kit<sup>low</sup>細胞において最も顕著であった (図3)。SDF-1、SCFによ

るTPO存在下の巨核球コロニー形成数の増加は、CXCR4、c-kitの発現レベルと良く相関した(図1-I)。コロニーを形成した巨核球のmodal DNA classは、TPO+SDF-1及びTPO+SCF+SDF-1存在下で、TPO単独と比べ有意に高かった。一方、TPO+SCF存在下ではmodal DNA classの増加はみられなかった(図4)。PI3-K阻害剤(LY294002)、PKC阻害剤(GF109203X)は、dose-dependentに巨核球コロニー形成を各々約100%、70%まで抑制した(図5)。また、10  $\mu$ mol/L LY294002及び5.0  $\mu$ mol/L GF109203Xは、TPO+SDF-1による巨核球コロニー形成を、TPO単独によるレベルまで抑制した(図5)。一方、MEK阻害剤(PD98059)は、全く巨核球コロニー形成を抑制しなかった(図6)。無血清液体培養において、PD98059はDay 7でCD41<sup>+</sup>細胞の増殖を抑制したが、Day 14では、TPO、TPO+SDF-1存在下のCD41<sup>+</sup>細胞数を増加させた(図7)。CD41<sup>+</sup>細胞のmodal DNA classは、control(0.05% DMSO)に比べ、PD98059存在下で有意に高かった(図8)。PD98059存在下において、TPO+SDF-1により増殖するCD41<sup>+</sup>細胞のmodal DNA classは、TPO単独によるレベルまで抑制された(図8)。巨核球によるProplatelet形成数は、培養7日目から増加し、培養9日目に最大となった。PD98059存在下において、Proplatelet形成数は調べたサイトカインの種類に関わらず著明に増加した(図9)。

#### 【考察】

巨核球系前駆細胞はCD34<sup>+</sup>IL-6R<sup>-</sup>細胞分画に純化されること、及び、SCFはTPOで支持される巨核球前駆細胞の増殖を促進し、一方、SDF-1は、TPOで支持される巨核球前駆細胞の増殖と分化の両方を促進することが示された。また、PI3-KとPKCは、TPO、SDF-1、SCFによる巨核球前駆細胞の増殖シグナルに関与していると示唆された。SDF-1によるTPO存在下の巨核球コロニー形成数の増加は、PI3-KとPKCに依存していると示唆され、一方、SCFによるTPO存在下の巨核球コロニー形成数の増加は、主にPI3-Kに依存していると考えられた。MAPK pathwayは、巨核球前駆細胞の増殖の初期段階にも関与している可能性が考えられるが、主に後期段階の増殖から分化へ移る成熟過程に関与していることが示唆された。また、MAPK pathwayは、SDF-1+TPO存在下の巨核球前駆細胞のNuclear maturation (endomitosis)に関与することが示唆された。血小板産生の最終段階であるProplatelet形成は、SDF-1、SCF、TPOいずれにも依存せず、また、MAPK pathwayはProplatelet形成を抑制していることが示唆された(図10)。

#### 【結論】

SDF-1/CXCR4を介するシグナルが巨核球造血の増殖と分化に作用すること、c-mpl、c-kit、CXCR4を介するシグナル間に巨核球コロニー形成における協調作用があることが明らかにされた。また、PKC、PI3-Kが増殖に関与し、MAPKが分化に関与することが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、Thrombopoietin (TPO)/Stem Cell Factor (SCF)存在下でのヒト末梢血由来巨核球系前駆細胞の増殖・分化に対するStromal cell-derived factor-1 (SDF-1)の影響を検討している。その結果、SDF-1は主としてMitogen activated protein (MAP) kinaseを介するシグナルによって、巨核球系前駆細胞の分化にTPO及びSCFとsynergisticに作用することが初めて明らかにされた。さらに、TPO、SCF、SDF-1は何れもPhosphatidylinositol-3 Kinase、Protein Kinase CとMAP kinase経路を活性化するが、その巨核球系前駆細胞に対する作用は分化段階で各々異なることが示唆された。以上より、本研究は博士(医学)の学位授与に値すると認める。