

学位論文題名

Involvement of protein kinase C- ϵ in signal transduction of thrombopoietin in enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of primitive hematopoietic progenitors

(IL-3依存性未分化造血前駆細胞増殖を増強する
トロンボポエチンのシグナル伝達へのPKC- ϵ の関与)

学位論文内容の要旨

【背景】

サイトカインレセプターファミリーに属するc-mplのリガンドであるトロンボポエチン(TPO)は1994年にクローニングされ、血小板産生を調節する主要なサイトカインとして報告された。その後TPOは単独またはIL-3などのサイトカインとの組み合わせにより、赤芽球前駆細胞や多能性前駆細胞の増殖をも支持することが判明し、一方、TPOの*in vivo*投与は血小板のみでなく赤血球や白血球の増加をもたらし、TPOが未分化造血前駆細胞の増殖を刺激することが証明された。

TPOのシグナル伝達は広く研究され、JAK-STAT経路やMAPキナーゼ経路がその増殖刺激に関与することが報告されているが、プロテインキナーゼC(PKC)の関与も少数ながら報告されている。PKCには少なくとも11のアイソフォーム(亜分子)があり、種々の細胞の生存、増殖、分化に関与することが知られている。そこでマウスIL-3依存性未分化造血前駆細胞増殖に与えるTPOの作用を検討し、TPOのシグナル伝達にPKCが関与するか否かを6種の亜分子(α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ)に焦点を当てて検討した。

【材料および方法】

1. 細胞：10～15週齢の雄性BDF₁マウスに5-FU(150mg/kg)を尾静脈より静注し、2日後に大腿骨より骨髓細胞を採取した(5-FU marrow cell)。比重遠心法により単核球を得、抗CD4、CD8、B220、Gr-1、Mac-1抗体を用いた免疫磁性ビーズ法にて分化抗原陰性細胞(Lin⁻ cell)とした。さらに、Lin⁻細胞から抗stem cell antigen(Sca-1)抗体陽性細胞を得た(Lin⁻Sca-1⁺ cell)。
2. コロニー形成法：既報のメチルセルロース法により、培養皿当たり5×10⁴個の5-FU marrow cell、2000個のLin⁻ cellまたは400個のLin⁻Sca-1⁺ cellをサイトカイン存在下に炭酸ガス培養器で培養した。14日目に倒立顕微鏡下に50個以上の細胞集塊をコロニーとしてコロニー数を算定した。
3. PKC染色：細胞をTPO単独または阻害剤と孵置後に洗浄し、サイトスピンを用いて塗抹標本を作成した。抗PKC- α 、- β 、- γ 、- δ 、- ϵ 、- ζ 抗体とFITC標識二次抗体で

染色後、さらに核染色を施し共焦点レーザー顕微鏡で観察、写真撮影した。

4. 阻害剤：PKC阻害剤としてカルフォスチンC、GF109203X、PKC- ϵ translocation inhibitor peptideを用い、TPO添加の60分前に細胞浮遊液に添加した（inhibitor peptideは2時間）。その後、洗浄することなくTPOとさらに2時間孵置した。

【結果】

5-FU marrow cellを用いると、TPO単独ではコロニー形成を支持しないが、IL-3と相乗的に作用し、コロニー数を2倍に増した。巨核球コロニーの増加は観察されたが、増加したコロニーは主として赤芽球混合コロニーであった。無血清培養の結果からこの相乗作用は血清を介したものではないことが確認された。Lin⁻Sca-1⁺ cellでもTPOはIL-3と相乗的に作用してコロニー数を増加させ、TPOは直接未分化造血前駆細胞に作用することが示された。

コロニー構成細胞数の変化を顕微鏡下に連日観察すると（"mapping study"）、IL-3単独群とIL-3+TPO群の間で、細胞倍加時間に有意差はなかったが、コロニー構成細胞が100個になるまでの平均日数はIL-3+TPO群で有意に短く、TPOは静止期にある未分化造血前駆細胞のG₀期を短縮することによりコロニー数の相乗的増加をもたらすことが示唆された。

選択的PKC阻害剤であるカルフォスチンCとGF109203XはTPOのIL-3依存性コロニー形成への相乗作用を抑制し、その濃度からnovel PKCの関与が示唆された。そこで直接的証拠を得るため、Lin⁻ cellを対象に6種のPKC亜分子に対する抗体を用いてどのPKC亜分子がTPOによって活性化されるかを免疫細胞学的に検討した。表出されていた α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 ζ -PKCの内、TPOによってPKC- ϵ の表出パターンと細胞内局在が変化し、活性化されたことが示唆された。この変化はPKC阻害剤によって阻害された。さらにPKC- ϵ 特異的阻害剤であるPKC- ϵ translocation inhibitor peptideはTPOによるPKC- ϵ の表出パターンと細胞内局在の変化およびTPOのIL-3依存性コロニー形成増強作用を阻害した。以上よりIL-3依存性未分化造血前駆細胞の増殖を増強するTPOのシグナル伝達の少なくとも一部にPKC- ϵ が関与することが強く示唆された。

【考案】

TPOのシグナルがJAK-STAT経路やMAPキナーゼ経路により伝達されることが報告されているが、これらのシグナルのみでTPOの細胞増殖作用に十分か否かは結論が得られていない。そこで、本研究ではPKCに焦点を当てて検討し、未分化造血前駆細胞では γ を除く5種の亜分子が表出され、細胞の種類によって表出されるPKC亜分子のパターンが異なること、IL-3依存性増殖を増強するTPOのシグナル伝達の少なくとも一部にPKC- ϵ が関与することを示した。前駆細胞増殖増強の機序として、アポトーシスの抑制やDNA合成刺激などがあげられる。TPOがG₀期を短縮したことからは後者の可能性が強いと考えられるが、前者の可能性を完全には除外できない。本研究ではGF109203Xなどの選択的PKC阻害剤と、より特異性の高いPKC- ϵ translocation inhibitor peptideを用いたが、後者の阻害効果は前者よりは弱く、その一因として後者の細胞膜透過が不十分であった可能性が示唆される。

PKC- ϵ を過剰発現した線維芽細胞はヌードマウスにおける腫瘍形成能と増殖速度を増すこと、白血病細胞株でPKC- ϵ を過剰発現するとサイトカイン除去によるアポトーシス

に抵抗性となること、などのこれまでの報告はTPOの細胞増殖刺激シグナルの少なくとも一部にPKC- ϵ が関与するとする本研究結果と合致する。しかし、c-Mplを表出するUT-7細胞では、TPOの増殖刺激はPKC- ϵ ではなく、PKC- α とPKC- β によって伝達されるとの報告もあり、増殖刺激とPKC- ϵ の関係については細胞の種類やTPOの濃度なども含めてさらに検討する必要があると思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 武 蔵 学

学位論文題名

Involvement of protein kinase C- ϵ in signal transduction of thrombopoietin in enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of primitive hematopoietic progenitors

(IL - 3 依存性未分化造血前駆細胞増殖を増強する
トロンボポエチンのシグナル伝達への PKC- ϵ の関与)

c-mplのリガンドであるトロンボポエチン (TPO)は1994年にクローニングされ、血小板産生を調節する主要なサイトカインとして報告された。その後TPOは単独またはIL-3などのサイトカインとの組み合わせにより、赤芽球前駆細胞や多能性前駆細胞の増殖をも支持することが判明し、一方、TPOの*in vivo*投与は血小板のみでなく赤血球や白血球の増加をもたらし、TPOが未分化造血前駆細胞の増殖を刺激することが証明された。

TPOのシグナル伝達は広く研究され、JAK-STAT経路やMAPキナーゼ経路がその増殖刺激に関与することが報告されているが、プロテインキナーゼC (PKC) の関与も少数ながら報告されている。PKCには少なくとも11のアイソフォーム (亜分子) があり、種々の細胞の生存、増殖、分化に関与することが知られている。そこでIL-3依存性マウス未分化造血前駆細胞増殖に与えるTPOの作用を検討し、TPOのシグナル伝達にPKCが関与するか否かを6種の亜分子 (α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ) に焦点を当てて検討した。

マウス未分化造血前駆細胞を用いると、TPO単独ではコロニー形成を支持しないが、IL-3と相乗的に作用し、コロニー数を2倍に増した。巨核球コロニーの増加は観察されたが、増加したコロニーは主として赤芽球混合(GEMM)コロニーであった。無血清培養の結果からこの相乗作用は血清中の因子を介したものではないことが確認された。分化抗原陰性・stem cell antigen陽性細胞(Lin⁻Sca-1⁺ cell)でもTPOはIL-3と相乗的に作用してコロニー数を増加させ、TPOは直接未分化造血前駆細胞に作用することが示された。

コロニー構成細胞数の変化を顕微鏡下に連日観察すると ("mapping study"), IL-3単独群とIL-3+TPO群の間で、細胞倍加時間に有意差はなかったが、コロニー構成細胞が100個になるまでの平均日数はIL-3+TPO群で有意に短く、TPOは静止期にある未分化造血前駆細胞のG₀期を短縮することによりコロニー数の相乗的増加をもたらすことが示唆された。

選択的PKC阻害剤であるカルフォスチンCとGF109203XはTPOのIL-3依存性コロニー形成への相乗作用を抑制し、その濃度からnovel PKCの関与が示唆された。そこで直接的証拠を得るため、Lin⁻ cellを対象に6種のPKC垂分子に対する抗体を用いてどのPKC垂分子がTPOによって活性化されるかを免疫細胞学的に検討した。表出されていた α 、 β 、 δ 、 ε 、 ζ -PKCの内、PKC- ε の表出パターンと細胞内局在がTPOによって変化し、活性化されたことが示唆された。この変化はPKC阻害剤によって阻害された。さらにPKC- ε 特異的阻害剤であるPKC- ε translocation inhibitor peptideはTPOによるPKC- ε の表出パターンと細胞内局在の変化およびTPOのIL-3依存性コロニー形成増強作用を阻害した。以上よりIL-3依存性未分化造血前駆細胞の増殖を増強するTPOのシグナル伝達の少なくとも一部にPKC- ε が関与することが強く示唆された。

口答発表に際し、副査の武蔵教授からG₀期短縮が報告されている他のサイトカインのシグナル伝達におけるPKC- ε の関与について、また造血幹細胞以外の細胞での細胞増殖シグナルにおけるPKC- ε の関与について質問があったが、申請者はG₀期を短縮するIL-6、IL-11などについてはPKC- ε の関与に対する報告がなく申請者も検討していない旨回答し、またPKC- ε を過剰発現した線維芽細胞はヌードマウスにおける腫瘍形成能と増殖速度を増すこと、白血病細胞株でPKC- ε を過剰発現するとサイトカイン除去によるアポトーシスに抵抗性となることなどの報告があり、TPOの細胞増殖刺激シグナルの少なくとも一部にPKC- ε が関与するとして本研究結果と合致することを回答した。次に副査の浅香教授から、TPOによりblast cellではなくGEMMコロニーが増加した理由、PKC- ε 以外のPKC isoformの検討について、本研究をどのように臨床応用できるのかについて質問があった。申請者はコロニーアッセイにおいて、TPOは未分化造血前駆細胞G₀期を短縮する結果、培養期間内にblast cellコロニーが増殖、成熟してGEMMコロニーとなる可能性よりGEMM増加の理由を説明し、PKC- ε 以外のisoformの検討ではPKC染色において、細胞内局在や染色パターンの変化がなく活性化が示されなかった旨回答した。臨床応用については直接には結びつかないが、細胞増殖のシグナル伝達を明らかにし、それを阻害する事により、癌に対する分子標的療法につながっていく可能性がある事を回答した。最後に主査の田中教授より、PKC- ε inhibitor peptideの特異性についてと、PKC- ε のtranslocationについてPKC染色以外の方法やtranslocationしたのは一過性の可能性はないかとの質問があった。申請者はinhibitor peptideの特異性の高さが報告されていること、ウエスタンブロット法を使用してPKC- ε のtranslocationを証明しようと3度試みたが細胞数が少なく確認できなかったこと、活性化の持続については数度の実験において時間を変えて施行し、それぞれの時間において活性化が示されたことを回答した。

本研究はマウス未分化造血前駆細胞におけるTPOの作用とそのシグナル伝達にPKC- ε が関与することを科学的に報告したという点で高く評価された。今後TPOのシグナル伝達のさらなる解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。