

学 位 論 文 題 名

ラット骨髓由来後期赤芽球培養法の確立とそれを用いた
アポトーシスの評価

学位論文内容の要旨

化学的、物理的あるいは生物学的刺激が赤芽球造血に及ぼす影響について、これまでに*in vitro*培養系を用いた多くの研究がなされているが、そのほとんどが赤芽球前駆細胞、ならびに前期赤芽球である前赤芽球や好塩基性赤芽球を用いたものである。一方、ある種の化学物質では後期赤芽球である多染性赤芽球において、最も強く毒性を発現する。したがって、多様な外的因子の赤芽球系造血への影響を評価するには、従来の手段に加えて後期赤芽球を用いた解析が重要である。また、外的因子による赤芽球への影響としてのアポトーシスの誘導と抑制にはBcl-2ファミリータンパク質が重要な役割をもつ。本論文では、毒性評価に頻用されるラットの赤芽球造血、特に後期赤芽球の増殖・成熟に化学物質等の外的因子が及ぼす影響を評価するための培養系を確立し、これを用いて、後期赤芽球におけるBcl-2サブファミリー分子の役割を明らかにすることを目的とした検討を行った。

第一章では、後期赤芽球、特に多染性赤芽球について、Percollを用いた密度勾配遠心分離法によるラット骨髓からの濃縮法と培養法を検討した。多染性赤芽球は、3週齢ラットの比重1.040 g/mlと比重1.058 g/mlの境界から得られる画分に最も高い割合で回収された。得られた多染性赤芽球を培養したところ、造血因子であるエリスロポエチン(EPO)を添加した条件下で、正染性赤芽球・脱核した赤血球への成熟と細胞数の増加が生じ、また、ヘム合成が行われることが示された。

第二章では、EPOを加えて培養した細胞と加えなかった細胞におけるBcl-2ファミリータンパク質の遺伝子発現変動を解析し、ラット骨髓由来後期赤芽球で誘導されるアポトーシスにおけるBcl-2ファミリータンパク質mRNAの発現動態を解析した。その結果、ラット多染性赤芽球培養系へのEPO添加は、Bcl-2ファミリータンパク質のうちアポトーシス抑制分子であるBcl-xL、ならびにMcl-1の発現を増加させるとともに、赤芽球のアポトーシスを抑制した。このことから、Bcl-xL、およびMcl-1はラット後期赤芽球におけるアポトーシスの抑制因子として重要な役割を担っていることが明らかになった。

さらに、第三章では、ヘム合成阻害剤であるサクシニルアセトンを用い、化学物質がラット後期赤芽球に及ぼす影響について、アポトーシス誘導の観点から本培養系による評価を行った。その結果、サクシニルアセトンによる細胞内ヘム含量の低下がミトコンドリア経路を介したカスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導し、これにBcl-xL、ならびにMcl-1の発現低下が関与していることが示された。

以上の知見は、ラット骨髓由来後期赤芽球の培養系が様々な外的因子による後期赤芽球の増殖・成熟、ヘムの合成、ならびにアポトーシスの誘導への影響を評価する*in vitro*の系として有用であることを示すとともに、ラットの後期赤芽球において、Bcl-2サブファミリーであるBcl-xLとMcl-1が、EPO、あるいはヘム合成に依存した抗アポトーシス因子として重要な役割を担っていることを示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	稲 葉	睦
副 査	教 授	石 塚	真由美
副 査	准教授	寺 尾	晶
副 査	准教授	佐 藤	耕 太

学 位 論 文 題 名

ラット骨髓由来後期赤芽球培養法の確立とそれを用いた アポトーシスの評価

化学的、物理的、あるいは生物学的刺激が赤芽球系造血に及ぼす影響の解析には、従来、赤芽球前駆細胞、あるいは前期赤芽球である前赤芽球や好塩基性赤芽球の培養系が主に用いられてきた。ところが、例えば、ある種の化学物質は後期赤芽球である多染性赤芽球に強い毒性を及ぼす。したがって、多様な外的因子の赤芽球系造血に対する影響の評価には、後期赤芽球を用いた解析が欠かせない。一方、外的因子がもたらすアポトーシスの誘導、あるいは抑制には Bcl-2 ファミリータンパク質が重要な役割をもつが、後期赤芽球におけるその実態は不明である。本論文では、毒性評価に頻用されるラットの赤芽球造血、特に後期赤芽球の増殖・成熟に化学物質等の外的因子が及ぼす影響を評価するための培養系を確立し、これを用いて後期赤芽球における Bcl-2 サブファミリー分子の役割を明らかにすることを目的とした検討を行った。

第一章では、まずラット骨髓から多染性赤芽球を濃縮する方法を検討し、密度勾配遠心分離法によって比重 1.040 g/ml と比重 1.058 g/ml の境界に得られる画分に最も高い割合で回収されることを示した。次いで、得られた多染性赤芽球を培養し、造血因子エリスロポエチン(EPO)を添加した条件下で、正染性赤芽球・赤血球への成熟、細胞数の増加、ヘム合成が生じることを示した。

第二章では、EPO を加えて培養した細胞と無添加の細胞、それぞれにおけるアポトーシスの発現と Bcl-2 ファミリータンパク質 mRNA レベルの変動を解析した。その結果、ラット多染性赤芽球に EPO を添加すると、Bcl-2 ファミリータンパク質のうちアポトーシス抑制分子である Bcl-xL と Mcl-1 の mRNA レベルが高くなること、同時にアポトーシスが抑制されることを明らかにした。

さらに第三章では、ヘム合成阻害剤であるサクシニルアセトンがラット多染性赤芽球のアポトーシスに及ぼす影響について解析し、サクシニルアセトンによる細胞内ヘム含量の低下がミトコンドリア経路を介したカスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導し、これに Bcl-xL、Mcl-1 の遺伝子発現低下が関与することを明らかにした。

以上の結果は、化学物質など外的因子が後期赤芽球系造血にもたらす影響を評価するうえでラット骨髓由来多染性赤芽球の培養系が有用なことを示すとともに、後期赤芽球において、Bcl-2 サブファミリーである Bcl-xL と Mcl-1 が、EPO、あるいはヘム合成に依存した抗アポトーシス因子として重要な役割を担うことを示唆するものである。すなわち、本研究成果は化学物質等の毒性評価に新たな視点と手法を提示し、同時に、その根拠となる知見を示したものであり、獣医学術研究の進展に寄与するところ大である。したがって、審査員一同は、上記博士論文提出者浅野敬之の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科博士論文審査等に合格と認めた。