

氏 名 ・ (本籍)	小林 五十鈴 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	医博甲第 908 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 22 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	医学系研究科医学専攻
学 位 論 文 題 名	Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process (ダイニンに依存した赤芽球の脱核)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 妹尾 春樹 (副査) 教授 今井 由美子 教授 寺田 幸弘

学 位 論 文 内 容 要 旨

Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process
(ダイニンに依存した赤芽球の脱核)

申請者氏名 小林 五十鈴

研 究 目 的

赤芽球の脱核は哺乳類特異的な現象であり、そのメカニズムと生物学的意義は不明な点が多い。ヒト赤芽球の脱核は、不均等な細胞質分裂と類似点が見いだされており、脱核のメカニズム解明の重要な手がかりを提供すると期待される。我々は、ヒト純化造血幹細胞(CD34⁺細胞)が赤芽球に特異的に分化して脱核する過程で、関与する分子を種々の阻害剤を用いて解析してきた。その中で脱核前の赤芽球において核が細胞の一端に偏在すること(細胞極性化)が脱核の必要条件であることを見だし、仮説「細胞極性化が脱核開始に必須である」を持つに至った。一方、核の細胞内移動には、微小管形成中心(microtubule-organizing centers: MTOCs)とその形成分子、および物質・小胞輸送を担うモーター蛋白質(ダイニンとキネシン)が関わることが知られている。

本研究では、MTOCs 関連分子およびモーター蛋白質に対する阻害剤を用いて、細胞増殖と脱核の解析から、ヒト赤芽球の脱核におけるダイニンの役割と MTOCs 関連分子との関係を検討した。

研 究 方 法

G-CSF で動員したヒト末梢血由来 CD34⁺細胞を CliniMACS で純化し、分注の上、液体窒素で保存した。純化ヒト CD34⁺細胞は、interleukin-3 (IL-3)、stem cell factor (SCF)、erythropoietin(EPO)存在下で 7 日間液体培養して colony-forming unit-erythroid(CFU-E)へと分化させた。以降は EPO 単独培地に交換し、成熟赤芽球から脱核まで培養した。

脱核と通常の細胞分裂との相違を検討するために、モーター蛋白質及び MTOC s 関連分子の阻害剤を CFU-E へ投与し細胞増殖について検討したのち、成熟赤芽球の脱核に与える効果を検討した。細胞形態や核の位置、脱核率に関してはメイギムザ染色を行い光学顕微鏡により評価した。また細胞周期は FACS を用いて解析した。さらにダイニンと脱核との関係を検討するために共焦点顕微鏡、western blot を用いた。

研 究 成 績

正常ヒト CFU-E を各種阻害剤 EHNA (ダイニン阻害剤)、monastrol (Eg5 阻害剤)、ON-01910 (Plk1 阻害剤)、MLN8237 (Aurora A 阻害剤)、hesperadin (Aurora B 阻害剤) 存在下で培養した結果、全ての阻害剤が細胞増殖を抑制した。EHNA 存在下で培養した細胞は大きさに変化を認めず、monastrol、 MLN8237 では有糸分裂途中の細胞の増加、ON-01910 ではアポトーシス細胞の増加、hesperadin では多核細胞の増加を認めた。

成熟赤芽球を各種阻害剤 EHNA、monastrol、ON-01910、MLN8237、hesperadin 存在下で培養した結果、EHNA のみが脱核を抑制した。

次に成熟赤芽球への阻害剤投与後 24 時間における核の偏在(細胞極性)を検討した。EHNA 存在下で核が細胞の中心にある細胞の割合が有意に増加したが(阻害剤なしの溶媒のみの対照群比)、monastrol では核の位置に変化はなかった。ON-01910、hesperadin では多核の細胞など、核の形態などに異常を認める細胞が増加した。

以上の結果、正常ヒト赤芽球の脱核へのダイニンの関与を強く示唆していた。そこで、ヒト赤芽球の終末分化において、ダイニンは γ チュブリンと共に脱核まで発現していることを western blot にて確認した。一方、Eg5、Plk1、AuroraA、AuroraB は、いずれも脱核に向かって発現(蛋白質レベル)は低下していた。

またダイニンの細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察すると、CFU-E では細胞分裂時に分裂溝と両端の細胞膜側に局在していたが、成熟赤芽球では核の近傍に集積していた。 γ チュブリンの染色により MTOCs の位置を確認すると、成熟赤芽球では γ チュブリンから核を囲むように α チュブリンが伸長していた。一方、EHNA を成熟赤芽球に投与するとダイニンは彌漫性に細胞内に分散し集積を認めなかったが、 γ チュブリン、 α チュブリンは阻害剤による変化を認めなかった。

結 論

ヒト赤芽球においてダイニン阻害剤である EHNA が脱核を抑制することと、核の偏在を阻害することを示した。また、ダイニンは成熟赤芽球にも発現し、核の近傍に局在することを示した。以上よりダイニンは正常ヒト赤芽球の脱核時に、核を偏在させることで脱核の進行に寄与すると考えられた。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：妹尾春樹

申請者：小林五十鈴

論文題名：Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process（ダイニンに依存した赤芽球の脱核）

要旨

本研究は赤芽球の脱核において微小管形成中心（microtubule-organizing center; MTOC）が果たす役割を明らかにする目的でおこなわれた。赤芽球は脱核によって分化を進め赤血球へと成熟する。細胞分裂を阻害する種々の試薬を細胞に添加することによって赤芽球の脱核に及ぼす影響を調べたところ、ダイニン阻害薬である erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine(EHNA)のみが脱核を阻害した。ダイニンを阻害すると赤芽球の脱核現象における欠かせないステップである、核が細胞の中心から周辺部位へ偏移することを抑制した。以上の結果は赤芽球の脱核は MTOC に非依存性で、ダイニンに依存した過程であることを示していた。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下のとおりである。

1) 斬新さ

ヒト赤芽球の脱核現象のメカニズムを細胞分裂とのアナロジーでしかも分子レベルで明らかにしようとした研究である。得られたデータは種々の阻害剤を細胞に添加することによって脱核が細胞分裂とは異なる分子メカニズム、すなわちダイニン依存性の機構によって進む現象であることを明らかにしており、最新の発見であり、斬新である。

2) 重要性

赤芽球の脱核によって網状赤芽球そして赤芽球となった細胞は核を失ったことで独特な中央が凹な形態をとり、細胞の表面積をガス交換の高率が上がるよ

うに変化させると考えられる。しかし、その分子メカニズムには不明の点が少なくない。本研究の重要性は以下の点である。上述のようにいまだ解明が進んでいない、ヒト赤芽球の脱核現象のメカニズムを分子レベルで明らかにした点である。この知見はこんごこの赤血球系の関連した疾患の予防・診断・治療・予後の判定に裨益する所が大きいものと判断できる。基礎医学的な研究としても臨床医学的な研究としても本研究は重要と言える。

3) 実験方法の正確性

生化学的手法と免疫蛍光法を含む形態学的手法の両者を駆使して、矛盾のない結果を得ており、方法は正確である。これらのデータは定性的のみならず定量的にも詳細に解析されており信頼に足るものといえる。

4) 表現の明瞭さ

ポジティブデータのみでなく、コントロール群から得られたデータも正確に記述されており、文章は彫琢され、表現は一貫して明瞭である。

以上述べたように本論文は学位を授与するのにじゅうぶん値する研究と判断された。