

氏 名 ・ (本籍)	五十嵐 秀光 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 897 号
学位授与の日付	平成 27 年 9 月 24 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	The lysophosphatidic acid receptor LPA4 regulates hematopoiesis -supporting activity of bone marrow stromal cells (骨髄間質細胞のリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 は造血機能を制御する)
論文審査委員	(主査) 教授 佐々木 雄彦 (副査) 教授 高橋 直人 教授 廣川 誠

学位論文内容要旨

論文題目

(論文題目の和訳)

The lysophosphatidic acid receptor LPA4 regulates hematopoiesis-supporting activity of bone marrow stromal cells

(骨髄間質細胞のリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 は造血機能を制御する)

申請者氏名 五十嵐 秀光

研究目的

リゾホスファチジン酸 (LPA) はがん細胞の浸潤や増殖の誘導、受精卵の着床、血管・リンパ管形成、体毛形成等の多彩な生理機能を発揮する脂質メディエーターである。LPA は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して作用し、現在までに LPA1-LPA6 の 6 種類の受容体が同定されている。一次配列の相同性が高い LPA1-3 は Endothelial differentiation gene (Edg) ファミリーを構成し、Edg 型 LPA 受容体と総称される。一方、互いに相同的な LPA4-6 は、Edg 型 LPA 受容体と比較すると相同性が低いため、非 Edg 型 LPA 受容体と区分される。申請者が所属するグループは LPA に対する第 4 の受容体として LPA4 (Noguchi et al. *J. Biol. Chem.*, 2003) を同定し、LPA4 が胎生期のマウスにおいて血管及びリンパ管形成に重要な役割を持つことを明らかにした (Sumida et al. *Blood*, 2010)。LPA4 は骨芽細胞や胎仔線維芽細胞等の間葉系細胞に高い発現を示すことが知られている。骨髄中の間葉系細胞である骨髄間質細胞は造血幹・前駆細胞ニッチ (微小環境) を形成し、造血幹・前駆細胞の維持・増殖を制御しているが、骨髄間質細胞における LPA4 の発現や生物学的意義についての検討は未だされていない。そこで本研究は、マウスの骨髄造血幹・前駆細胞ニッチ形成における LPA4 の機能を明らかにすることを目的とする。

研究方法

まず始めにフローサイトメーターを用いてマウス骨髄中の成熟血球細胞、血管内皮細胞、骨髄間質細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞を単離し、定量的 PCR 法にて LPA4 の発現レベルを測定した。次に、野生型マウスと LPA4 欠損マウスを使って以下の実験を行い、両者を比較した。生理的条件下でのマウス骨髄中の造血幹細胞数と造血前駆細胞数を測定し、これら細胞数への LPA4 の寄与を調べた。また、骨髄抑制ストレスからの回復における LPA4 の機能を解析するために、マウスに X 線および抗癌剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) を用いて一時的な骨髄抑制を誘導し、致死率および骨髄中の造血幹・前駆細胞数の変動を測定した。加えて、致死量の X 線を照射したレシピエントマウスヘドナーマウス由来の骨髄を移植することで作製した骨髄キメラマウスに対しても 5-FU を用いた骨髄抑制を誘導して致死率を測定し、LPA4 が介在する骨髄抑制ストレスからの回復における責任細胞についても検討した。造血幹・前駆細胞の増殖因子である幹細胞因子 (Stem Cell Factor: SCF) の骨髄における含量は

ELISA 法にて測定した。また、骨髄間質細胞を培養し、造血幹・前駆細胞の増殖関連因子の mRNA 発現量を定量的 PCR 法にて解析した。

研究成績

LPA4 は骨髄間質細胞において他の細胞集団と比較して高い発現が認められた。生理的条件下の LPA4 欠損マウスの造血幹細胞数は野生型マウスと差異が認められなかったが、造血前駆細胞数が減少していた。LPA4 欠損マウスは野生型マウスと比較し骨髄抑制ストレスに対する感受性が高く、X 線照射および 5-FU 投与のいずれのモデルでも早期に死亡した。また、野生型マウス由来骨髄細胞に置換された LPA4 欠損骨髄キメラマウスは野生型骨髄キメラマウスより早期に死亡し、骨髄移植を行っていない LPA4 欠損マウスと同様の結果が得られた。骨髄抑制後の LPA4 欠損マウスの骨髄造血幹・前駆細胞数の回復は遅延していた。また、骨髄抑制後の回復期における LPA4 欠損マウスの骨髄中の SCF の含量は減少していた。骨髄間質細胞を用いた in vitro の実験系でも同様に、野生型マウス由来骨髄間質細胞と比較して LPA4 欠損マウス由来骨髄間質細胞では SCF の mRNA 発現レベルが低下していた。また、SCF と同様に骨髄抑制後の造血幹・前駆細胞の増殖因子であるテネイシン C の mRNA 発現レベルも LPA4 欠損マウス由来骨髄間質細胞では低下していた。

結論

LPA4 欠損マウスは骨髄抑制ストレスに対する高い感受性を示し、骨髄抑制後の回復期における造血幹・前駆細胞数の回復遅延が認められた。骨髄キメラマウスを用いた実験にて、骨髄抑制ストレスに対する感受性はレシピエントの LPA4、つまり非血球系細胞の LPA4 に依存していることが示された。また、骨髄抑制後の回復期における骨髄中の SCF の産生が抑制されており、in vitro でも同様に骨髄間質細胞の SCF やテネイシン C の発現レベルが低下していたことから、造血幹・前駆細胞ニッチを構成する骨髄間質細胞の LPA4 は SCF やテネイシン C 等の造血幹・前駆細胞の増殖因子の産生を促進する機能を持ち、骨髄抑制ストレスに対する抵抗性を賦与することが強く示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 佐々木 雄彦

申請者： 五十嵐 秀光

論文題名：

The lysophosphatidic acid receptor LPA4 regulates hematopoiesis-supporting activity of bone marrow stromal cells
(骨髄間質細胞のリゾホスファチジン酸受容体 LPA4 は造血機能を制御する)

要旨

申請者の研究は、論文内容要旨に示すように、リゾホスファチジン酸 (LPA) およびその受容体である LPA4 の造血における役割を明らかにするために行われたものである。始めに骨髄における様々な細胞の LPA4 の発現レベルを解析し、造血幹・前駆細胞ニッチを構成する骨髄間質細胞に LPA4 が高いレベルで発現していることを明らかにした。次いで LPA4 欠損マウスの解析により生理的条件下での LPA4 は造血前駆細胞の分化を制御する可能性を示した。また、骨髄抑制ストレス下における欠損マウスの解析を行い、骨髄抑制に対する感受性が欠損マウスで高かったことから、骨髄抑制後の回復期において造血幹・前駆細胞による増殖因子の産生を LPA4 が制御していることが示唆された。

本研究によって、LPA4 が造血幹・前駆細胞の分化制御および造血幹・前駆細胞の増殖因子の産生制御を行っていることが強く示唆され、骨髄抑制に対する抵抗性の獲得に重要な分子である可能性が明らかとなった。

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通りである。

1) 斬新さ

LPA4 の生理機能に関する報告は少なく、造血幹・前駆細胞ニッチ構成細胞の機能を制御する分子も不明な部分が多い。申請者は造血幹・前駆細胞ニッチ構成細胞の LPA4 が造血細胞の増殖因子の産生を制御する分子であることを明らかにしており、本研究の内容は非常に斬新である。

2) 重要性

悪性腫瘍の治療において抗癌剤投与や放射線治療は有用な治療法である。しかし、その治療に伴う好中球減少症は避ける事のできない副作用の一つである。現在、好中球減少症に対して末梢血中に造血幹細胞を動員する G-CSF 製剤が使用されているが、疼痛・発熱・肝機能障害等の副作用が認められることが報告されている。申請者の研究により、LPA4 のアゴニストは造血幹・前駆細胞ニッチの造血幹・前駆細胞の増殖を促進する可能性が示されたので、G-CSF に並ぶ新たな造血薬の創薬シーズの提供という観点から、本研究の重要性は示されている。

3) 研究方法の正確性

フローサイトメーターを使用した解析、定量的 PCR 法および ELISA 法を用いた各分子の発現量の定量的解析等は客観的である。しかも、十分な検体数で実験を繰り返すことで、統計学的有意な差を再現よく得ることに成功している。よって、本研究で行われた実験手法には高い正確性が伴っていると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

研究の背景、目的、結果および考察が明瞭に示されており、文章も簡明である。

以上述べたことから、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。