

審査の結果の要旨

氏名 清田 純

本研究は造血幹細胞の自己複製能を制御する分子機構を明らかにするため、自己複製能が亢進しているアダプタータンパク質Lnk欠損(Lnk<sup>-/-</sup>)造血幹細胞と野生型(WT)造血幹細胞を比較検討することにより、自己複製能を制御するサイトカインを同定し、さらに新たに開発した、個々の細胞内のシグナル伝達物質のリン酸化を定量的に解析する手法 single cell phosphorylation imaging assay を用いて、自己複製能を制御するシグナル伝達経路を解析することを試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. single cell 無血清培養法による解析の結果、SCF, TPO, IL-3, IL-6およびIL-11のうち、単独で、造血幹細胞を高頻度に含むCD34 KSL細胞の分裂を引き起こせるサイトカインはSCFおよびTPOであることが示された。
2. WTおよびLnk<sup>-/-</sup> CD34 KSL細胞の分裂におけるSCFおよびTPOに対する反応性を、single cell 無血清培養法を用いて用量依存曲線を求め、50%有効量を定量化することにより比較検討した。その結果、SCFの50%有効量はWTとLnk<sup>-/-</sup>間で差を認めなかった。一方、TPOの50%有効量はWTに比べてLnk<sup>-/-</sup>では有意に低く、Lnk<sup>-/-</sup>造血幹細胞はTPOに対する感受性亢進していることが示された。
3. SCFおよびTPO刺激による細胞分裂後の造血幹細胞数の変化を、repopulating unitを用いて定量化した。その結果、SCF単独刺激では、WT, Lnk<sup>-/-</sup>とも造血幹細胞数の有意な増減は認めなかった。一方、TPO単独刺激では、WTでは有意な増減を認めなかったが、Lnk<sup>-/-</sup>では有意な増加を認めた。また、SCFおよびTPOの同時刺激においても、WTでは有意な増減

を認めなかったが、Lnk<sup>-/-</sup>では有意な増加を認めた。これにより、Lnkは造血幹細胞においてTPOシグナルを負に制御し、その結果、造血幹細胞の自己複製能が負に制御されていることが示された。

4. 極めて少ない数の細胞の個々の細胞におけるシグナル伝達分子のリン酸化レベルを定量的に解析する手法 single cell phosphorylation imaging assay (SCPIA) を開発した。その精度をcell lineを用いて検討し、SCPIA法を用いて50個の細胞から得られたデータは用量依存性、刺激後の時間経過ともにウエスタンブロット法と同等の検出能を持つことが示された。
5. Lnk<sup>-/-</sup>造血幹細胞のTPOシグナルの下流には対称性自己複製を惹起するシグナル伝達経路が存在することが予測されるためSCPIA法を用いて解析した。その結果、STAT5およびAktのリン酸化の亢進、およびp38 MAPKの脱リン酸化の亢進を認めた。

以上、本論文は自己複製能が亢進しているアダプタータンパク質Lnk欠損造血幹細胞の解析から、この自己複製能の亢進が、TPOに対する感受性の亢進が原因であることを明らかにし、また極めて少ない数の細胞の個々の細胞におけるシグナル伝達分子のリン酸化レベルを定量的に解析する手法を開発することにより、自己複製分裂を行う造血幹細胞においてSTAT5およびAktのリン酸化の亢進、およびp38 MAPKの脱リン酸化の亢進が起こっていることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、造血幹細胞の自己複製能を制御する分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。