

審査の結果の要旨

氏名 日下智聖

ガン細胞に対する分化誘導療法は急性前骨髄球性白血病 (APL) に対するレチノイド投与をはじめとして、高い治療効果を上げつつあるが、分化誘導療法開発には細胞分化を制御する分子機構の解明は重要な課題である。ヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 の古典的な分化誘導剤としてはヘミンが知られており、K562 にヘミンを投薬することにより、当該の白血病細胞は赤血球へと分化誘導するが、赤血球分化は、造血幹細胞から赤血球系への運命決定がなされる初期分化と、鉄を細胞内へ取り込みながらヘモグロビンを産生して赤血球として機能成熟する後期分化の2段階に分けられる。ヘミン投薬による K562 の赤血球分化誘導は、赤血球分化の後期過程を反映しており、後期分化におけるヘムの作用は赤血球分化の機能成熟を促進させる方向に働くと考えられる。一方で、初期分化に対するヘムの影響は、過去において検討が十分になされていない。

1. ヘムの赤血球型初期分化への影響

赤血球初期分化に対するヘムの影響を解析するために、マウス骨髄細胞を用いたコロニーアッセイを行っている。その結果、細胞内に取り込まれるとヘムに変換され、細胞内ヘム濃度を上昇させると考えられる、ヘム生合成前駆体の5-アミノレブリン酸 (ALA) ならびにプロトポルフィリンIX (PPIX) 処理により、骨髄細胞中に含まれる赤血球型前駆細胞であるBFU-EおよびCFU-Eのコロニー形成能が、濃度依存的に抑制されたことを見出している。特に、CFU-Eと比較して幼弱な赤血球型前駆細胞であるBFU-Eコロニー形成に対して、より強い抑制作用を示している。しかし、ALAはCFU-Eコロニー形成に対しては、ほとんど影響を与えなかった。PPIXとALAとの作用の違いは、PPIXがヘム生合成経路の最後の生合成中間体であるのに対し、ALAがヘム生合成経路の最初の前駆体であることから、取り込みから細胞内でのヘムへの変換に要する時間の差が影響している可能性を指摘している。

一方、細胞内のヘム濃度を低下させる薬剤として、ヘム合成に鉄が利用されることから、細胞内の鉄キレート剤である desferrioxamine (DFO) とヘム合成阻害剤 succinylacetone (SA) の作用を検討している。DFO には、BFU-E/CFU-E のコロニー形成能に対する促進作用が認められ、特に CFU-E コロニー形成に対して、強い作用を示した。一方、SA は BFU-E コロニー形成を強く低下させるのに対し、CFU-E コロニー形成能には、僅かに促進的に作用するのを観察している。

以上の結果から、幼弱な程、過剰なヘムによる増殖抑制効果が強くなる傾向があり、赤血球分化後期とは異なり赤血球分化初期におけるヘム過剰は赤血球増殖障害となる一方、鉄依存的なヘム合成能の低下によっても、赤血球初期分化が促進される、と結論している。また、SA 3 μ M 処理で、CFU-E コロニー数が微増し、PPIX が濃度依存的に減少させることから、赤血球前駆細胞では分化の進行にとって細胞内ヘムの至適濃度が存在する可能性を推測している。

2. 生体内における赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子鉄応答性配列の赤血球分化初期での役割

本研究では、1の結果から、赤血球分化の初期と後期では、ヘモグロビン合成の有無により細胞内鉄濃度が大きく違いがあると推定し、鉄代謝による分化関連遺伝子調節機構がヘム産生をコントロールしている可能性を想定している。そこで、ヘム合成経路の初発酵素としてヘム産生調節を行い、5' -UTR に鉄応答性配列 (IRE) が存在する赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS-E) 遺伝子に注目し、細胞内鉄濃度による赤血球分化段階に応じたヘム合成量の適切なコントロールが、ALAS-E IRE による ALAS-E 遺伝子発現調節が担っていることを検証している。赤血球分化初期および後期に対する役割を同時に解析することを可能にするため、赤血球系組織での発現を誘起する転写因子 GATA-1 遺伝子プロモーターを用い、その下流に野生型または IRE が欠失した ALAS-E cDNA を連結させたトランスジーンを用いて、2種の遺伝子導入マウス (WT Tg, Δ IRE Tg) を確立した。WT Tg, Δ IRE Tg の各骨髓細胞の赤血球系コロニーアッセイの結果、通常培地中では、WT Tg, Δ IRE Tg とも、BFU-E コロニーがほとんど形成されず、CFU-E コロニーでも野生型 (Non Tg) と比較して、半減することが見出したことから、赤血球初期分化に対する ALAS-E 過剰発現は ALA や PPIX 同様に抑制的に作用することを明らかに

した。一方、DFOを添加すると、WT Tgでは、Non Tgと同様に無添加時よりもCFU-E数が3.2倍まで増加したのに対し、 Δ IRE Tgではその変化が認められないことから、ALAS-E IREが赤血球初期分化において、細胞内鉄代謝に応じてヘム産生を抑制することで赤血球初期分化をコントロールしていることを示唆した。

3. 生体内における赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子鉄応答性配列の赤血球分化後期での役割

通常の飼育下で成体の Δ IRE TgおよびWT Tg間で軽度な貧血が認められたものの、両者に顕著な差がないことから、2週間にわたる断続的な瀉血を行い、IREが機能的であると推定される鉄欠乏状態を誘導での表現型を検討した結果、 Δ IRE Tgにおいてのみ、末梢赤血球でPPIXが異常蓄積しているのを確認した。この結果により、赤血球後期分化において、ALAS-E IREは鉄の生物学的利用度に応じてポルフィリン合成をコントロールし、特に鉄欠乏状態において、ポルフィリン合成を抑制して赤血球での異常なPPIXの蓄積を回避する役割を担っていることを示唆している。

また、瀉血された Δ IRE TgおよびWT Tgでの赤血球のポルフィリン量とALAS-Eタンパク質発現量とが正の相関を示すこと、また、Non Tg、 Δ IRE TgおよびWT Tgすべての赤血球で、IRP1のIRE結合能が瀉血により亢進していることを確認し、瀉血時の Δ IRE Tgにおけるポルフィリンの異常蓄積が、ALAS-E IREの脱制御によるALAS-E過剰発現が原因であることを明らかにしている。

以上、日下智聖の研究業績は、赤血球分化機構の研究から、ヘム合成系酵素遺伝子であるALAS-EのIREの生理機能研究に発展させ、特に、赤血球初期分化で、細胞内の低い鉄濃度を感知することでALAS-E発現の抑制を介して、ヘム合成量を適正量まで低下させることで、ヘムによる分化阻害作用発揮を阻止する機能をもつことを示唆した。この知見は、これまでのALAS-E IREの機能研究に新たな視点を与えるものであり、また、ALAS-E IREが進化上、高い保存性を有することに合理的な説明を与える結果であると認められる。以上から、本研究は、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと考えられた。