

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 錦 井 秀 和

本研究は、胚性幹細胞（ES 細胞）から試験管内で巨核球・血小板を誘導する系を樹立しそのシステムを用いる事により、代替血液としての臨床応用を目指した機能評価及び血小板造血の制御メカニズムを解明する目的で行なわれた。具体的には①血小板特異的膜蛋白 GPIb $\alpha$  の発現及び機能制御機構、②ウイスコット・アルドリッチ症候群（WAS）関連蛋白である WAVE ファミリー蛋白の血小板及び巨核球における機能に焦点を当てて、実験を行ない、下記の結果を得ている。

①-1. 血小板特異的膜蛋白である GPIb のプロモーター制御下で GFP を発現する ES 細胞で巨核球・血小板を誘導したところ、ES 細胞から分化した胚様体の中で、GFP を発現する、すなわち巨核球・血小板分化能を保持する細胞は c-Kit 陽性 CD41 陽性細胞に高率に濃縮されている事が示された。

①-2. 分化誘導した ES 細胞由来血小板は電子顕微鏡上、成体マウス由来血小板と同様の超微細構造をとっていたが、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析の結果、血小板膜表面上の GPIb $\alpha$  の発現が低下していた。GPIb $\alpha$  の発現はメタロプロテイナーゼ阻害薬である GM6001 を培養後期より添加する事により著明な改善を認め、この現象はメタロプロテイナーゼ活性依存性に血小板膜表面上の GPIb $\alpha$  の細胞外ドメインが切断される為に起きる事が示された。

①-3. GM6001 添加により GPIb $\alpha$  の発現が保持された ES 細胞由来血小板の機能解析を行なったところ、①インテグリン活性化能及びそれに伴う血小板進展反応の改善、②ずり応力下での ES 細胞由来血小板の血栓形成能の改善、③血小板減少モデルマウスに対する輸注実験における体内クリアランスの改善を認め、ES 細胞由来血小板におけるメタロプロテイナーゼ活性及び GPIb $\alpha$  の発現及び機能制御が臨床応用に必須である事が示された。

②-1. 胎児肝由来造血前駆細胞移植により作成した血液系の WAVE 1 が欠損したマウスにおいて、血小板数の変化及びインテグリン活性化に伴う葉状仮足形成反応において変化を認めず、WAVE1 は血小板造血及び血小板進展反応において必須の分子でない事が示された。

②-2. 試験管内で WAVE2 ホモノックアウト ES 細胞から巨核球・血小板を分化誘導したところ、培養後期における細胞質成熟の障害及び、GPIb $\alpha$  陽性成熟巨核球数及び産生される血小板数の減少を認めた。また WAVE2 ホモノックアウト ES 細胞由来巨核球は葉状仮足形成が著明に障害されていた。また WAVE 2 と複合体を形成する Abi1 をレンチウイルスを用いた RNA 干渉によりノックダウンした場合でも同様の表現系を認め、WAVE2・Abi1 複合体が巨核球後期の成熟及び血小板放出機構、血小板進展時のアクチン重合反応に伴う葉状仮足形成に必須である事が示された。

以上、本論文は胚性幹細胞由来血小板分化誘導システムを用いて、①GPIb $\alpha$  の発現及び機能制御機構、②巨核球・血小板造血における WAVE ファミリー蛋白の機能を明らかにした。本研究は胚性幹細胞を用いた再生医療のみならず、血小板造血及び血小板機能制御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。