

論文内容の要旨

論文題目：活性酸素による血球分化の制御

指導教員： 黒川 峰夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

篠原 明仁

【序文】

活性酸素（ROS : reactive oxygen species）に関しては、酸化ストレスによる生体分子の酸化的損傷といった負の側面が歴史的に長く論じられてきた。しかし近年は ROS が重要なシグナル伝達物質の一つであることが認知され血液領域においてもその正常の生理的機能に関する研究が多く発表されるようになった。造血幹細胞から血球前駆細胞レベルでは ROS は低く保たれていえると考えられ、造血幹細胞での細胞内 ROS の上昇は造血幹細胞の枯渇を招くとされている。しかし、細胞内における活性酸素の発生源として重要な NOX 遺伝子は造血幹細胞・前駆細胞にも発現しており造血前駆細胞の維持・分化においても ROS が生理学的に重要な役割を担っていると推察された。そこで本論文では血球分化における ROS の役割を検証することとした。

【方法】

C57/BL6 マウスの骨髄細胞を用いた。各種細胞を液体培地培養し FACS を用いて解析、もしくは各種サイトカインを添加したメチルセルロース半固形培地で colony assay を行い CMP から MEP への分化を解析した。また培養細胞もしくは primary のマウス骨髄細胞を FACS で細胞分離し RNA を回収して qRT-PCR を行った。

【結果】

はじめに造血幹細胞（KSL 細胞:c-kit/Sca-1 陽性、lineage 抗原陰性細胞）および common myeloid progenitor / CMP、granulocyte-monocyte progenitor / GMP、megakaryocyte-erythrocyte progenitor / MEP の各造血前駆細胞の細胞内 ROS を H2-DCFDA を用いて FACS により測定した。KSL から CMP、GMP へと細胞内 ROS が高くなる点は既報と同様に示され、MEP では KSL 細胞以上に細胞内 ROS が低く保たれている点が新たな知見として示された。

次に各造血幹細胞・前駆細胞を FACS で sort し total RNA を回収して細胞内 ROS の制御に関わる遺伝子の発現を qRT-PCR 法で解析した。MEP では *NOX2/NOXA2* が最も低く且つ *Nrf2* が高く制御されていた。また GMP では *NOX2/NOXA2* が最も高い発現を示していた。この結果から遺伝子の発現パターンからも MEP が最も細胞内 ROS が低く制御されていることが示唆された。

マウスの骨髄細胞から c-kit 陽性細胞を分離し TPO/EPO/SCF 存在下で 24 時間培養し、そこに過酸化水素もしくは catalase を添加して CMP から GMP/MEP への分化傾向の差を FACS で解析した。過酸化水素を負荷した群では MEP の割合が濃度依存性に減少し、catalase を添加した群では MEP が増加した。GMP の割合については、増加する場合も減少する場合も観察され傾向は一定しなかった。同様の実験を CMP もしくは KSL 細胞の培養で行い同様の傾向を確認した。この際に MEP の apoptosis を起こしている細胞は GMP/CMP に比して少なく、比較的強い過酸化水素を負荷した場合にのみ apoptosis 細胞の増加が見られたことから、ROS による MEP の減少はおもに CMP から MEP の分化の抑制によると考えられた。

ROS による CMP から MEP 分化への影響を別系で確認するため半固形培地 colony assay を行った。FACS で CMP を sort し半固形培地に過酸化水素もしくは catalase の添加を行って colony assay を行った。過酸化水素を負荷した群では BFU-E/CFU-Meg/E-Meg の数が減少し、catalase を添加した群ではこれらが増加した。CFU-G/M/GM の数はあまり増減が見られなかった。次に、内因性の細胞内 ROS による CMP から MEP への分化の影響を検証するために、H2-DCFDA 染色を用いて FACS により細胞内 ROS の濃度別に CMP を sort し colony assay を行った。細胞内 ROS の低い CMP は BFU-E/CFU-Meg/E-Meg の数が多く CFU-G/M/GM の数は少なかった。細胞内 ROS の高い CMP では全く逆の傾向を示し、細胞内 ROS が中程度の CMP ではこれらの中間の傾向を示した。そして細胞内 ROS の低い CMP には過酸化水素を負荷し、細胞内 ROS の高い CMP には catalase で ROS を除去して colony assay を行ったところ、細胞内 ROS の低い CMP に過酸化水素を負荷し培養したものでは BFU-E/CFU-Meg/E-Meg の数が減少し、CFU-G/M/GM の数は増加した。逆に細胞内 ROS の高い CMP に catalase を添加して培養したものでは BFU-E/CFU-Meg/E-Meg の数が増加した。これらの結果から細胞内 ROS は CMP から MEP 分画への分化を調節していると考えられた。

細胞内 ROS が MEP への分化を制御する際に何らかの遺伝子の発現の変化が起こっていると推測した。そこで c-kit 陽性細胞を TPO/EPO/SCF 下で過酸化水素を負荷して培養、分

化した MEP を FACS で sort した。Sort した MEP で細胞周期に関わる遺伝子群に関して qRT-PCR を行ったところ ROS の濃度依存性に *PU.1* の発現が上昇し *GATA1* の発現が低下していた。

【考察】

始めに造血幹細胞・前駆細胞の中で MEP の細胞内 ROS が最も低いことを示した。血液細胞において ROS 生成に強く関わる遺伝子である、*NOX2/NOXA2* の発現が低いだけでなくストレス反応性に細胞内の ROS を低下させる *Nrf2* の発現が上昇していることから、MEP は ROS が低く制御されるように program されていることが推測された。H2-DCFDA を用いた FACS による細胞内 ROS 測定は骨髓内環境による細胞内 ROS の変化は検出が困難であるため、分化の進行とともに相対的に酸素濃度の高い骨髓血管周囲に移動する血球の性質を考慮すると、実際の骨髓内の KSL 細胞と MEP の細胞内 ROS の差はそれほど大きくない可能性も考えられた。

c-kit 陽性細胞、CMP、KSL 細胞などを用いて液体培地による培養系で外因性に細胞内 ROS を上昇させると MEP への分化が阻害され、*catalase* により細胞内 ROS を低下させると MEP の割合が増加した。液体培地での実験系は細胞増殖の変化の影響を受けやすく、この結果で ROS が MEP 分化を制御すると結論づけることは困難と考えられ、CMP から MEP への分化経路を解析するために半固形培地 colony assay を行った。

Colony assay では CMP の ROS を外因性に低下させることにより BFU-E/CFU-Meg/E-Meg が増加し、逆に ROS 増加させることで BFU-E/CFU-Meg/E-Meg が低下することを示した。またマウス骨髓から採取した直後の CMP を細胞内 ROS 濃度に応じて分離し同様の実験を行っても、同様に BFU-E/CFU-Meg/E-Meg が増減したことから細胞内 ROS の変化に応じて CMP から MEP の分化が調節されていると推測された。

細胞内 ROS の高低により MEP の分化が調節されることは疾患と造血障害の観点からも重要である。細胞内 ROS の上昇が観察され且つ造血障害が見られる疾患として、慢性炎症性疾患、MDS、Fanconi anemia などが知られている。これらは全て症状として貧血を呈し、一部の疾患に血小板減少がみられる。赤血球と血小板は MEP を経て生成されることを考えると、これらの疾患で細胞内 ROS の上昇による MEP の分化障害が起こっている可能性は高い。例えば NAC (N-Acetyl-Cysteine) を投与し細胞内 ROS を低下させることで貧血や血小板減少を改善させることが可能かもしれない。

Catalase などを用いて細胞内 ROS を低下させ、培養条件によっては MEP を効果的に増幅できる可能性もある。例えば iPS を用いて血小板と赤血球を作成する培養系に *catalase* を加え細胞内 ROS 低下させることにより、効率よく iPS 細胞から MEP を分化させ、赤血球/血小板を大量に作製することも考えられる。

また、細胞内 ROS による MEP 分化の制御の key factor として qRT-PCR により *PU.1/GATA-1* の変化を同定した。*PU.1* と *GATA-1* は造血幹細胞から前駆細胞への分化段階

において *reciprocal* に発現が変化し分化を制御することが知られ、*PU.1* を高く発現する造血前駆細胞前駆細胞（*MPP*）は巨核球／赤芽球系への分化能を失っていることが報告されている。この報告は今回の実験結果を支持するものであるが、逆に *PU.1* は *NOX2* や *NOXA2* を標的遺伝子として発現を上昇させ好中球分化において細胞内 *ROS* を上昇させることも知られている。したがって、*ROS* と *PU.1* は互いに細胞内濃度・発現を上昇させる *positive feedback* 経路を持っていると推測される。*CMP* から *GMP* の分化の過程で細胞内 *ROS* と *PU.1* が *positive feedback* 経路を使って互いに上昇し *MEP* への分化能、造血前駆細胞としての可塑性を急激に失うのかもしれない。

まとめると *MEP* の細胞内 *ROS* が低く制御されていることを示し、細胞内 *ROS* を増減させることにより *CMP* から *MEP* への分化能が変化することを示した。同時に細胞内 *ROS* 増加により *PU.1* の上昇と *GATA-1* の低下という *reciprocal* な発現変化が起こっていることを示した。この知見は細胞内 *ROS* が造血系において生体内シグナルとして機能し、*MEP* の分化を制御する可能性を示している。