

Title	Induction of Programmed Cell Death in Human Hematopoietic Cell Lines by Fibronectin via Its Interaction with Very Late Antigen 5
Author(s)	菅原, 浩之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38992
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	菅原 浩之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11785 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Induction of Programmed Cell Death in Human Hematopoietic Cell Lines by Fibronectin via Its Interaction with Very Late Antigen 5 (フィブロネクチン/VLA 5相互作用によるヒト白血病細胞のアポトーシス誘導に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 松沢 佑次 (副査) 教授 木谷 照夫 教授 北村 幸彦

論文内容の要旨

【目的】

造血幹細胞の周囲には、線維芽細胞、内皮細胞、脂肪細胞、マクロファージなどのストローマ細胞やコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、トロンボスポンジン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス分子が存在している。ストローマ細胞は、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor : GM-CSF) などの液性造血因子や幹細胞増殖因子 (stem cell factor : SCF) などの膜結合因子を介して造血幹細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、細胞外マトリックス分子は造血幹細胞や幼若血球の組織への定着に関与していると考えられているが、造血幹細胞の増殖・分化における役割についてはほとんど解明されていない。本研究では、造血幹(前駆)細胞のクローナルなモデルとしてヒト GM-CSF/SCF 依存性巨核球性白血病細胞株 (M07E細胞) ならびに各種白血病細胞株を用いて、細胞外マトリックス分子(特にフィブロネクチン [FN]) による造血調節機構について検討した。

【方法ならびに成績】

(1) M07E細胞の GM-CSF/SCF 依存性増殖における各種細胞外マトリックス分子の影響について³H-thymidine 取り込み法にて検討した。コラーゲン type I, IV は M07E細胞の GM-CSF/SCF 依存性増殖には有意の影響を示さなかったのに対し、FN は濃度依存的に GM-CSF および SCF による M07E細胞の増殖を抑制した。(2) GM-CSF 刺激による細胞内蛋白 p93 のチロシンリン酸化や SCF 刺激による *c-kit* レセプター・チロシンキナーゼ (KIT) のチロシンリン酸化に FN が及ぼす影響をウエスタンブロット法にて解析した。FN 添加後も、SCF による KIT および GM-CSF による p93 のチロシンリン酸化に変化が認められず、FN は SCF や GM-CSF の受容体への結合や初期シグナル伝達系を阻害しないと考えられた。(3) 造血因子 (GM-CSF/SCF) 存在下で M07E細胞を培養し FN 添加による生細胞数ならびに生存率の時間経過を検討した。FN により M07E細胞の生細胞数の増加が抑制され、死細胞の割合が増加した。また、FN で処理した細胞では GM-CSF や SCF 存在下でも DNA の 1% アガロースゲル電気泳動にてクロマチン DNA のオリゴヌクレオソーム単位での断片化が認められた。さらに、形態学的にも核クロマチンの凝縮が認められたので、FN は M07E細胞のアポトーシスを誘導しその結果、M07E細胞の造血因子依存性増殖を抑制したと考えられた。(4) フィブロネクチンの受容体としてはインテグリン VLA 4 と VLA 5 が知られている。M07E細胞における VLA 4 と VLA 5 の発現を検討すると、両受容体とも高度に発現されていた。そこで、FN によるアポトー

シス誘導における両受容体の関与について検討した。FN による M07E 細胞のアポトーシスは抗 VLA 5 抗体や GRGDSP ペプチドにより回避されたのに対し、抗 VLA 4 抗体やコントロールペプチドである GRGESP ペプチドでは回避されなかった。(5)骨髄球系細胞株 (HL60, KG1, THP1, KU812F), 赤芽球系細胞株 (K562, HEL), T 細胞系細胞株 (CCRF-CEM, MOLT-3, OTL-1), B 細胞系細胞株 (BALL, RPMI1788) について VLA 4, VLA 5 の発現および FN の効果を検討した。VLA 4 はすべての細胞株で高度に発現されていた。VLA 5 陽性細胞株では程度の差は認められたものの FN によりアポトーシスが誘導され増殖も抑制された。一方, VLA 5 陰性細胞株 (OTL-1, BALL, RPMI1788) では FN により軽度増殖が促進されアポトーシスは認められなかった。

【総括】

FN は M07E 細胞のアポトーシスを誘導することにより GM-CSF や SCF による増殖を抑制した。FN による M07E 細胞のアポトーシスは抗 VLA 5 抗体や GRGDSP により回避された。さらに, FN によるアポトーシスは VLA 5 陽性細胞株のみに認められ, VLA 5 陰性細胞株には認められなかった。以上のことより, FN はインテグリン VLA 5 を介してヒト白血病細胞にアポトーシスのシグナルを伝達すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では, 造血幹 (前駆) 細胞のクローナルなモデルとしてヒト GM-CSF/SCF 依存性巨核芽球性白血病細胞株 (M07E細胞) ならびに各種白血病細胞株を用いて, 細胞外マトリックス分子, 特にフィブロネクチンによる造血調節機構について検討した。

フィブロネクチンは M07E 細胞のアポトーシスを誘導し, M07E 細胞の造血因子依存性増殖を抑制した。フィブロネクチンによる M07E 細胞のアポトーシスは抗 VLA 5 抗体や GRGDSP ペプチドにより回避されるのに対し, 抗 VLA 4 抗体やコントロールペプチドである GRGESP ペプチドでは回避されなかった。さらに, フィブロネクチンによるアポトーシスは各種白血病細胞株の中でも VLA 5 陽性細胞株のみに認められ, VLA 5 陰性細胞株は認められなかった。以上のように, フィブロネクチンがインテグリン VLA 5 を介してヒト白血病細胞にアポトーシスのシグナルを伝達することが初めて明らかになった。

本研究はフィブロネクチンが現在まで知られていたように造血幹細胞の接着に関与するだけでなく, 造血幹細胞の増殖を負に制御している可能性を示唆する重要な研究であり, 学位授与に値すると考えられる。