Osaka University Knowledge Archive

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	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38992
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【33】

氏　　名	菅原浩之（すがはらひろゆき）
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^{3}H－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，KG 1，THP 1，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。