



Title	Different Roles of Glycosylphosphatidylinositol in Various Hematopoietic Cells as Revealed by Mouse Model of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria
Author(s)	村上, 良子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42901
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	むら かし よし 子 村 上 良 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 8 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年 2 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Different Roles of Glycosylphosphatidylinositol in Various Hematopoietic Cells as Revealed by Mouse Model of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. (発作性夜間血色素尿症のモデルマウスの解析により明らかになった血球系における GPI アンカー型蛋白質の役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 木下タロウ (副査) 教 授 岡田伸太郎 教 授 竹田 潤二

論 文 内 容 の 要 旨

目的

GPI アンカー欠損症である発作性夜間血色素尿症 (PNH) の発症には、造血幹細胞における X 染色体遺伝子 *PIG-A* の体細胞突然変異とその異常幹細胞クローンの拡大が伴っている。川越らは *PIG-A* のマウスホモログである *Piga* 遺伝子をノックアウトした ES 細胞でキメラマウスを作製したが、出生したのはキメラ率の低いマウスのみであった。これらを解析した結果、*Piga* の変異のみでは直ちに異常クローンの拡大は起こらないことがわかった。この手法で作製したキメラマウスでは造血系以外にも *Piga* 欠損細胞が存在する難点があった。我々はさらに異常クローン拡大のメカニズムを解明するために、血液系においてのみ *Piga* 欠損細胞を持つキメラマウスを多数作製し解析した。

方法

- 1) Cre-loxP system を使って得られた *Piga* 欠損胎児の肝細胞を放射線照射をしたマウスに移植することにより、目的のマウスを作製した。まず loxP 配列で *Piga* のエクソン 6 をはさんだマウスと、hCMV プロモーターで Cre 蛋白を発現するトランスジェニックマウスを交配させて受精卵の着床前から Cre 蛋白を発現させた。loxP 配列ではさまれた *Piga* をヘテロにもち、かつ Cre を受け取った雌の胎児の全身の細胞は GPI アンカー型蛋白質欠損細胞と正常細胞とのモザイクとなる。これは loxP 配列ではさまれた一方の染色体上の *Piga* が Cre 蛋白によって欠損し、さらにこれらの細胞において *Piga* は X 染色体上にあるために染色体の一方のランダムな不活化を受けることによる。これらの胎児は、頭部及び顔面の大きな異常を伴い、出生前後に致死となるが造血幹細胞が形成される時期を充分越えている。
- 2) 胎児肝細胞には多数の造血幹細胞が含まれておりこれを移植することにより致死量の放射線照射をしたマウスの造血系の再構成ができることが知られている。そこでこれらの *Piga* 欠損胎児の発生14日目の肝細胞を得、放射線照射をしたマウスに移植することにより血液系において *Piga* 欠損細胞を持つキメラマウスを作製した。肝細胞移植後 6 週から最長44週までその末梢血を時間経過を追って解析した。さらにリンパ球においては末梢リンパ組織、および胸腺の解析も行った。

結果

- 1) すべてのマウスにおいて肝細胞移植より 6 週後には末梢血中に移植細胞由来の GPI アンカー型蛋白質欠損細胞が全血球系においてみられ、移植後44週にいたるまでほぼ同じ割合で存在した。即ち *Piga* 欠損多能性造血幹細胞

胞が骨髓に生着したが、クローンの拡大はみとめられず PNH の発症には *PIG-A* の変異に加えて第 2 の因子が必要であることがこの系を用いても確かめられた。

- 2) 各血球系で GPI アンカー欠損細胞の占める割合が異なっていた。特に B リンパ球では低率、T リンパ球では CD4、CD8 細胞とも高率で 90% を占めるものがあり、この傾向はすべてのマウスにおいてみられた。
- 3) 胸腺の解析では、T cell の最も未熟な分画において GPI アンカー欠損細胞が優位であった。また脾及びリンパ節の結果では、T cell については末梢血と差がなかったが B cell においては末梢血にくらべて GPI アンカー欠損細胞の割合が有意に低かった。

総括

PNH の発症には *PIG-A* の変異に加えて第 2 の因子が必要であることが確かめられた。一方、キメラマウスでは T リンパ球において GPI アンカー欠損細胞の割合が他より高率である現象が明らかになり、ある GPI アンカー型蛋白質が T リンパ球の分化初期段階での増殖を負に制御している可能性が示唆された。また B リンパ球については、ある GPI アンカー型たんぱく質が血流から末梢リンパ組織へのホーミングに関与している可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

GPI アンカー欠損症である発作性夜間血色素尿症 (PNH) の発症には、造血幹細胞における X 染色体遺伝子 *PIG-A* の体細胞突然変異とその異常幹細胞クローンの拡大が伴っている。本研究では異常クローン拡大のメカニズムを解明する事をめざし、患者同様血液系にのみ GPI アンカー欠損細胞を持つモデルマウスを作製し、*PIG-A* の変異だけで造血幹細胞の拡大が起こるかを検証した。そのために、血液系においてのみ *Piga* 欠損細胞を持つキメラマウスを多数作製し解析した。Cre-loxP system を使って得られた *Piga* 欠損モザイク胎児の胎生 14 日目の肝細胞を造血幹細胞源とし、放射線照射をしたマウスに移植することにより、目的のマウスを作製した。肝細胞移植後 6 週から最長 44 週までその末梢血を時間経過を追って解析した。さらにリンパ球においては末梢リンパ組織、および胸腺の解析も行った。

その結果、すべてのマウスにおいて肝細胞移植より 6 週後には末梢血中に移植細胞由来の GPI アンカー型蛋白質欠損細胞が全血球系においてみられ、移植後 44 週にいたるまではほぼ同じ割合で存在した。即ち *Piga* 欠損多能性造血幹細胞が骨髓に生着したが、クローンの拡大はみとめられず PNH の発症には *PIG-A* の変異に加えて第 2 の因子が必要であることを強く示唆する結果であった。

一方、GPI アンカー型蛋白質が T リンパ球の分化初期段階での増殖を負に制御している事が示唆された。また GPI アンカー欠損 B 細胞は血流から末梢リンパ組織へのホーミングに異常がある事が示された。

これらの成果は、PNH の発症メカニズムを理解する上で重要であり、また GPI アンカーの新しい生理機能を見出したものであり、学位に値する。