



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Downregulation of an AIM-1 Kinase Couples with Megakaryocytic Polyploidization of Human Hematopoietic Cells                                     |
| Author(s)    | 川崎, 輝   |
| Citation     | 大阪大学, 2002, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43767">https://hdl.handle.net/11094/43767</a>   |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|            |   |
|------------|---|
| 氏 名        | 川崎 輝  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 16862 号   |
| 学位授与年月日    | 平成14年3月25日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科分子病態医学専攻  |
| 学位論文名      | Downregulation of an AIM-1 Kinase Couples with Megakaryocytic Polyploidization of Human Hematopoietic Cells.<br>(ヒト巨核球の多倍体化誘導における AIM-1 キナーゼの発現低下の意義) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 金倉 譲<br><br>(副査)<br>教授 北村 幸彦    教授 木下タロウ   |

## 論文内容の要旨

### 【目的】

生体内において有効に血小板が産生されるためには、巨核球系前駆細胞が増殖する過程と、増殖した前駆細胞が成熟していく過程の両者が必要である。後者の成熟過程では巨核球に特徴的な多倍体化と呼ばれる細胞質分裂を伴わない DNA 合成の繰り返しが行われる。通常の細胞分裂はサイクリン A、B、cdc2 などの細胞周期制御分子の発現や活性の制御によって遂行されることが明らかにされているが、巨核球の多倍体化がどのような細胞周期制御によって行われるのかは現在明らかではない。

AIM-1 と STK15 は Aurora/Ipl1 family に属するセリン・スレオニンキナーゼである。両分子は共に G2/M 期特異的に発現し、紡錘糸の機能を制御するが、AIM-1 は細胞質分裂に、STK15 は分裂後期の染色体分離に関与すると考えられている。ショウジョウバエや酵母における AIM-1 や STK15 のホモログの遺伝子変異体の細胞は、細胞分裂に異常をきたし多倍体化する特徴を有しており、これらの分子が巨核球の多倍体化にも関与する可能性が考えられた。そこで、本研究では、巨核球の多倍体化機構におけるこれらの分子の機能について検討を行った。

### 【方法ならびに成績】

ヒトインターロイキン 3 (IL-3) 依存性赤白血病細胞株 F-36P の細胞周期を同調させ、IL-3 刺激後の細胞周期の推移を FACS にて解析した。また細胞周期制御分子及び AIM-1、STK15 の mRNA の発現変化を Northern blot 法で解析した。その結果、AIM-1、STK15 の発現は G2/M 期に発現するサイクリン A、B の発現時期にはほぼ一致して誘導され、G2/M 期の終了と共にその発現の低下が認められた。これらの結果は、AIM-1、STK15 の mRNA は血液細胞においても G2/M 期特異的に発現すると考えられた。

次に、赤巨核芽球系細胞株である K562 と CMK がフォルボールエステル (TPA) に反応して多倍体化巨核球へと成熟分化していく過程における AIM-1、STK15 mRNA の発現変化を Northern blot 法で解析した。K562、CMK のいずれにおいても多倍体化の過程では AIM-1、STK15 の持続性発現低下が認められた。更に、正常ヒト骨髓細胞より分離した CD34 陽性細胞をトロンボポエチン (TPO) 存在下で培養し、多倍体化巨核球への分化を誘導した際にも、AIM-1、STK15 の発現は持続性に抑制されていた。また、免疫組織化学を用いた解析から、多倍体化のプロセスにある正常巨核球は細胞周期の分裂期に入り、分裂中期から後期までは進行していることが明らかになった。これ

らの結果から、通常の細胞分裂であれば G2/M 期特異的に発現する AIM-1 あるいは STK15 の発現が持続的に低下することが、巨核球の多倍体化に関与する可能性が考えられた。

巨核球の多倍体化における AIM-1、STK15 の発現低下の意義を検討するために、K562 において Lac-inducible System を用いて野生型 (WT) あるいは優性阻害型 (K/R) の AIM-1、STK15 を誘導的に発現する系を確立した。まず、WT-AIM-1、WT-STK15 の発現により TPA による多倍体化誘導を回避できるかどうか検討を行った。WT-AIM-1 を発現させたところ、TPA によって誘導される多核巨核球の比率は 16.3% から 5.7% にまで減少した。一方、WT-STK15 を発現させても、TPA による多核巨核球の誘導には明らかな影響は認められなかった。WT-AIM-1 による多倍体化阻害の機構をより詳細に解析するため、TPA 存在下で培養中の K562 を免疫組織化学的に解析した。その結果、染色体分離が起こっている分裂後期の細胞では、誘導的に発現させた WT-AIM-1 が赤道面に局在するのが認められた。この結果から、TPA 処理により分裂後期まで進行した K562 細胞は発現誘導された WT-AIM-1 により細胞質分裂が遂行され多倍体化が抑制された可能性が示唆された。また、K562 に K/R-AIM-1 を発現させ内因性の AIM-1 の機能を阻害したところ、通常の培養条件下において 24.6% の細胞が 8 倍体以上となり、これらの多倍体化細胞は正常巨核球に類似した形態を示した。また誘導的に発現させた K/R-AIM-1 は、染色体が 2 方向に分離する分裂には、その赤道面に局在していた。これらの結果から、誘導的に発現させた K/R-AIM-1 は、内因性の AIM-1 と同一部位に局在し、AIM-1 による細胞質分裂のプロセスを阻害することにより、多倍体化を誘導する可能性が示唆された。一方、K/R-STK15 を発現させた K562 細胞では多倍体化や巨核球様細胞への形態学的な変化は認められなかった。

#### 【総括】

増殖期にある巨核芽球性細胞株では、AIM-1、STK15 の発現は共に G2/M 期特異的に認められた。一方、多倍体化過程にある巨核球では、G2/M 期に入っても両分子の発現が持続的に低下していた。野生型 AIM-1、STK15 を誘導的に発現させた結果から、STK15 は単独では多倍体化には影響を及ぼさなかったが、AIM-1 の発現により多倍体化が阻害された。次いで優性阻害型 AIM-1、STK15 を誘導的に発現させると STK15 では著明な変化は認められなかったが、AIM-1 の発現により多倍体化が誘導された。以上の結果から AIM-1 の持続的な発現低下は巨核球の多倍体化誘導に必要かつ十分であることが明らかになった。

### 論文審査の結果の要旨

近年、細胞周期制御の研究が進展し細胞分裂に関与する多数の分子が同定された。一方、巨核球の多倍体化における細胞周期制御機構については不明であった。Aurora/Ipl1 family 分子は G2/M 期特異的に発現するセリンスレオニンキナーゼであり、ショウジョウバエや酵母においてその遺伝子変異が多倍体化を引き起こすことが報告されている。本研究ではヒトホモログである AIM-1、STK15 が巨核球の多倍体化に対し果たす役割について検討が行われた。

白血病細胞株が対数的に増殖する時には AIM-1、STK15 は細胞周期依存的に G2/M 期に発現するが、白血病細胞株並びにヒト骨髓細胞が多倍体化する際には AIM-1、STK15 の発現は低下した。次に白血病細胞株に野生型 AIM-1、STK15 を過剰発現させ、多倍体化する際に AIM-1、STK15 の発現が低下するのを阻害した。STK15 は多倍体化に明らかな影響は与えなかったが、AIM-1 では多倍体化が抑制された。さらに同様に優性阻害型 AIM-1、STK15 を発現させ、通常の培養条件において AIM-1、STK15 のキナーゼ活性を持続的に低下させると、STK15 は明らかな変化を与えなかったが、AIM-1 では多倍体化が誘導された。以上のことから巨核球の多倍体化には、細胞質分裂を制御する AIM-1 の発現が持続的に低下することが必要かつ十分であることが明らかにされた。

本研究は、生体内において有効な血小板産生を行うにあたって必須とされる巨核球の多倍体化機構を細胞周期制御の観点から分子レベルで明確にしたものであり、学位に値する研究であると考えられる。