The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	NF-κB Family Proteins Participate in Multiple Steps of Hematopoiesis through Elimination of Reactive Oxygen Species
Author(s)	中田, 壮一
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45424
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　中田壮一（なかた そういち）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　19300　号

学位授与年月日　平成17年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学位論文名　NF-κB Family Proteins Participate in Multiple Steps of Hematopoiesis through Elimination of Reactive Oxygen Species
（血液細胞の発生過程におけるNF-κBファミリー分子の機能解析）

論文審査委員　（主査）
教　授　金倉　譲

（副査）
教　授　金田　安史　　教　授　仲野　徹

論文内容の要旨

［目的］

NF-κBファミリー分子は、各種の刺激に反応して抗アポトーシス分子（Bcl-XL、cIAP1、cIAP2、A1）や細胞増殖に関与する分子（cyclin D2など）の発現を誘導することが*in vitro*の実験系で証明されている。また、NF-κBのサブユニットp65のノックアウトマウスが肝細胞のアポトーシスのため胎生致死となることから、NF-κBは*in vivo*においても抗アポトーシス分子として機能すると推測されている。造血系では、NF-κBが造血幹細胞や赤芽球系前駆細胞に発現されていることが報告されているが、その機能の詳細は不明である。本研究では正常造血細胞の増殖、分化、生存におけるNF-κBの機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

［方法ならびに成績］

マウスIL-3依存性細胞株Ba/F3に各種造血因子受容体を発現させ、更に優性阻害型NF-κB（IκBSR）を恒常的あるいは誘導的に発現させると、低濃度のIL-3、EPO依存性増殖が抑制された。更に、IκBSRは、IL-3除去によるBa/F3細胞のアポトーシスを増強した。この際、ミトコンドリア膜電位（Δφm）をFACSにて解析したところ、IκBSR導入クローンではMockクローンに比べてΔφmが低下していた。しかし、IκBSRは、Δφmを制御する抗アポトーシス分子Bcl-2、Bcl-XLの発現には影響を及ぼさなかった。Δφmは活性酸素種（ROS）によっても制御されることから、IκBSRがIL-3除去後のROSの蓄積に及ぼす影響をFACSで検討した。その結果、MockクローンではIL-3除去後12時間でROSが軽度蓄積したが、IκBSR導入クローンではIL-3除去前からROSが著明に蓄積し、IL-3除去後はそれ以上増加しないことが明らかになった。次に、ROSを消去するMnSOD、thioredoxin X（TRX）をIκBSR導入クローンに過剰発現させたところ、IκBSRによるアポトーシスの増強はほぼ完全に回避された。以上の結果より、Ba/F3細胞におけるIκBSRによるIL-3除去時のアポトーシスの亢進にはROSが関与していることが示唆された。

次に、マウス正常造血幹/前駆細胞（$Lin^{-}Scal^{+}$ 細胞）にレトロウイルスを用いてIκBSRを発現させたところ、各種サイトカイン存在下でもアポトーシスが誘導された。また、IκBSRは、コロニーアッセイにおいてCFU-Mix、BFU-E、CFU-GMなどすべての系統のコロニー形成を抑制した。IκBSR導入細胞では、Mock細胞と比較してΔφm

が低下しており、ROS の蓄積も認められた。ROS 蓄積の原因としては、IκBSR 導入細胞では、ROS のスカベンジャーである細胞内グルタチオン濃度が減少し、MnSOD、glutathione peroxidase（GPX）、TRX の発現が抑制されていた。また、IκBSR によるアポトーシスは、H_2O_2 代謝剤である 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one（MCI）、N-acetyl L-cysteine（NAC）、TRX の添加により回避されたが、$O2^+$ 代謝剤である Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride（MnTBAP）はほとんど効果を示さなかった。以上の結果から、IκBSR は正常造血幹/前駆細胞において、ROS（特に H2O2）の蓄積を介してアポトーシスを誘導すると考えられた。

次に、ES 細胞から血液細胞を発生させる OP9 システムにおいて、分化過程の様々な段階で IκBSR を発現させた。hemangioblast の段階で IκBSR を発現させると、造血幹細胞の発生が ROS 蓄積によるアポトーシスのため阻害された。また、造血幹細胞の発生後に IκBSR を発現させると、赤芽球系、巨核球系、好中球系それぞれの最終分化過程で ROS 蓄積によるアポトーシスが誘導された。

［総括］

IκBSR はマウス IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 において、低濃度での IL-3、EPO 依存性増殖を阻害し、IL-3 除去によるアポトーシスを ROS の蓄積を介して増強した。また、正常造血幹/前駆細胞において、サイトカイン存在下においても ROS 蓄積によるアポトーシスを誘導した。更に、OP9 システムにおいて、ROS を介するアポトーシスによりヘマンジオブラストからの造血幹/前駆細胞の発生と造血 3 系統（顆粒球系、赤芽球系、巨核球系）の細胞の最終成熟過程を共に阻害した。

以上の結果から、NF-κB ファミリー分子は血液細胞の様々な発生段階で ROS を消去し、アポトーシス回避に必須の役割を担うと考えられた。

［総評］

本研究では、造血細胞の発生過程における NF-κB ファミリー分子の機能について優勢阻害型の NF-κB である IκB を用いて解析が行われた。その結果、造血幹細胞の発生過程、その後のすべての系統の血球の最終分化過程において、NF-κB ファミリー分子が活性酸素種（ROS）を消去することにより、これらの細胞をアポトーシスから回避させていることが明らかとなった。また、ROS の消去機構として、NF-κB ファミリー分子が、正常造血幹/前駆細胞においては細胞内グルタチオン濃度や MnSOD、GPX、TRX の発現を制御していることも明らかとなった。これらの知見は従来のノックアウトマウスでは得られなかった NF-κB ファミリー分子の新たな機能であり、正常造血細胞の増殖・生存機構を考える上で極めて重要な知見である。

また、NF-κB ファミリー分子は、ATL、ホジキン病、AML、多発性骨髄腫などの多くの造血器腫瘍において恒常的に活性化され、腫瘍化の原因になっていることが報告されている。本研究結果は正常造血細胞に焦点を絞った解析であるが、本研究により明らかになった NF-κB ファミリー分子による造血細胞の生存機構は、NF-κB ファミリー分子を分子標的として造血器腫瘍を治療する際に、より有効な治療法を確立するために有用な情報を提供すると考えられる。

以上の点より、本研究結果は、学術的、臨床的にも極めて価値ある研究であり、学位に値すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、造血細胞の発生過程における NF-κB ファミリー分子の機能について優勢阻害型の NF-κB である IκB を用いて解析が行われた。その結果、造血幹細胞の発生過程、その後のすべての系統の血球の最終分化過程において、NF-κB ファミリー分子が活性酸素種（ROS）を消去することにより、これらの細胞をアポトーシスから回避させていることが明らかとなった。また、ROS の消去機構として、NF-κB ファミリー分子が、正常造血幹/前駆細胞においては細胞内グルタチオン濃度や MnSOD、GPX、TRX の発現を制御していることも明らかとなった。これらの知見は従来のノックアウトマウスでは得られなかった NF-κB ファミリー分子の新たな機能であり、正常造血細胞の増殖・生存機構を考える上で極めて重要な知見である。

また、NF-κBファミリー分子は、ATL、ホジキン病、AML、多発性骨髄腫などの多くの造血器腫瘍において恒常的に活性化され、腫瘍化の原因になっていることが報告されている。本研究結果は正常造血細胞に焦点を絞った解析であるが、本研究により明らかになったNF-κBファミリー分子による造血細胞の生存機構は、NF-κBファミリー分子を分子標的として造血器腫瘍を治療する際に、より有効な治療法を確立するために有用な情報を提供すると考えられる。

以上の点より、本研究結果は、学術的、臨床的にも極めて価値ある研究であり、学位に値すると考えられる。