

|           |  |
|-----------|--|
| 氏 名       | 船 戸 興 自                                  |
| 学 位 の 種 類 | 博士（医学）                                   |
| 学 位 記 番 号 | 甲第 663 号                                 |
| 学位授与年月日   | 令和 4 年 3 月 23 日                          |
| 学位授与の要件   | 自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当                   |
| 学 位 論 文 名 | 赤血球の分化・成熟化に関わる因子の探索と機能解析                 |
| 論文審査委員    | （委員長）教授 大 森 司<br>（委 員）教授 奥 田 浩 准教授 大 嶺 謙 |

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

近年、若年層を中心とした献血者人口の減少に伴い将来的な血液不足が懸念されている。このことから、献血に拠らない赤血球製剤の人工生産に関する研究が進められている。赤血球生産ソースの候補として生体由来の造血幹細胞や無限増殖可能な多能性幹細胞が汎用されている。分化誘導法の改良が進んだこともあり赤血球への分化効率も高いが、未熟な細胞が産生されやすい、安定性や再現性にやや欠けるといった課題もある。近年、それらの幹細胞から分化誘導を行った赤血球前駆細胞を株化した赤血球前駆細胞株が樹立されたことで、赤芽球のみを大量生産する新たな方法が示された。一方で赤血球の生産効率は不十分であり、これを改善するためには赤血球分化関連因子のさらなる研究が必要となる。特に脱核に関しては不明な点が多く、直接的に脱核を促す方法も開発されていない。その一方で、例えば MYH10（非筋ミオシン IIB）の機能を阻害することで脱核が阻害されることが報告されており、こうした因子に関しては赤血球分化因子の候補になりうると考えられる。

そこで本研究では赤血球の分化/成熟化に関わる因子を改めてタンパク質レベルで探索すること、既報の分化関連因子 MYH10 も含めて遺伝子導入実験を行い赤血球分化時における機能を解析することの2つを目的として研究を行った。

### 2 研究方法

(1) 臍帯血ならびに骨髓由来 CD34 陽性細胞を各 2 ロットずつ使用し 20 日間の赤血球分化誘導を行った。細胞は分化誘導中に経時的にサンプリングし形態観察を行った。この中から分化段階ごとに 3 点のサンプルを用いて質量分析を行い、タンパク質量の増減について比較を行った。これを 4 ロット全ての細胞で実施し、分化の進行に伴ってタンパク質レベルで発現が再現よく変動する因子をスクリーニングした。

(2) 既報の赤血球分化関連因子 MYH10 遺伝子/タンパク質の機能を調べるため、赤血球前駆細胞株 BMDEP-1-22（以降 BMDEP 細胞）への MYH10 の導入と分化誘導を行った。分化誘導中あるいは分化誘導後にイムノブロッティング、免疫染色、形態観察を行い赤血球分化の評価を行った。また、抗 MYH10 抗体を用いて分化 0 日目と分化 8 日目の BMDEP 細胞、分化 9 日目と分化 15 日目の骨髓由

来 CD34 陽性細胞からそれぞれ免疫沈降を行い、質量分析によって MYH10 と結合しているタンパク質を同定した。

### 3 研究成果

(1) 赤血球分化関連因子の探索のため、CD34 陽性細胞を用いて赤血球分化誘導を行い質量分析によって分化時にタンパク質量が再現性良く 2 倍以上上昇するタンパク質をスクリーニングした。その結果、臍帯血・骨髓由来の CD34 陽性細胞 2 ロットずつを用いた計 4 ロットの解析において 7 因子 (alpha-synuclein, bisphosphoglycerate mutase, hemoglobin subunit alpha, hemoglobin subunit beta, hemoglobin subunit delta, selenium-binding protein 1 (SELENBP1), transmembrane and coiled-coil domain family 2) が候補として同定された。

(2) BMDEP 細胞に MYH10 遺伝子を強制発現させ、BMDEP-MYH10 細胞を取得し赤血球分化誘導を行った。その結果、BMDEP 細胞の脱核率が平均 19.3%であったのに対し、BMDEP-MYH10 細胞では平均 29.2%と脱核効率が向上した。この際、MYH10 の発現量は遺伝子導入によって増えていたものの、細胞の形態や MYH10 の局在については BMDEP 細胞との間に差異は無かった。また、MYH10 と協調的に機能するタンパク質の存在も予想されたため、BMDEP 細胞と培養 CD34 陽性細胞において抗 MYH10 抗体を用いた免疫沈降を行い、質量分析により MYH10 と結合しているタンパク質を同定した。その結果、MYH9 や複数のミオシン軽鎖 (MYL4, MYL6, MYL12A) と MYH10 の結合が確認された。中でも、心筋・赤芽球・血管内皮細胞特異的に発現している MYL4 に着目し、BMDEP 細胞に対し強制発現実験と遺伝子発現抑制実験を行った。その結果、MYL4 の強制発現あるいは発現抑制は赤血球分化や脱核に関して影響を与えなかった。

### 4 考察

(1) 臍帯血/骨髓由来の CD34 陽性細胞 2 ロットずつを用いた解析により、再現性良く発現量が上昇していたタンパク質を同定した。この中には実際に赤血球分化関連因子として報告された transmembrane and coiled-coil domain family 2 や alpha-synuclein も含まれていた。さらに、SELENBP1 のような機能未知の遺伝子もあることから、詳細な機能解析によって赤血球分化の新たな知見が得られる可能性がある。

(2) MYH10 遺伝子の強制発現によって脱核率の向上が確認された。遺伝子発現によって脱核を促進させた報告は無く、赤血球分化あるいは赤血球生産研究において非常に意義深い結果が得られた。MYH10 遺伝子の強制発現が脱核を促進するメカニズムに関しては本研究では明らかにならなかったが、赤血球分化時に MYH10 と結合するタンパク質を複数同定しており、詳細な解析が進むことでこれらのタンパク質と赤血球分化の関連性についても明らかになると期待される。

### 5 結論

複数の異なるロットを用いた解析により造血幹細胞が赤血球へと分化する際に発現量が大きく上昇するタンパク質を明確に示す事が出来た。この中には、SELENBP1 のような赤血球分化への機能が明らかでないタンパク質も含まれており、今回同定された候補因子が赤血球分化関連因子として重要である可能性が示唆された。さらに赤血球前駆細胞株において MYH10 遺伝子/タンパク質の強制発現によって脱核率が向上したこと、免疫沈降、質量分析、イムノブロット法を用いた解

析により、既報の分化関連因子 MYH10 と MYL4 を含むミオシン軽鎖が赤血球分化の過程で結合していることを示した。MYH10 の発現量の増加は脱核を促進させるが、MYL4 の発現量の増加は、脱核に直接的には影響しない可能性を示唆した。本研究で得られたこれらの研究結果は赤血球分化に関する未知の知見を含んでおり、今後の研究を進める上での新たな着眼点を提供しうるものであると考える。

## 論文審査の結果の要旨

学位論文は赤血球分化の最終過程である脱核に焦点をあて、将来的に *in vitro* での効率的な赤血球製剤の作製に結びつけようとするものである。論文の骨子は以下の通りである。

論文は2つのパートに分けられており、前半部分では質量解析によって、赤血球分化の過程で SELENBP1 の発現が高まることを明らかにした。実際に赤血球分化の過程で SELENBP1 の発現が高まり、細胞内では核、および各周囲に存在した。後半部分では、脱核への関与が報告されている MYH10 を赤血球前駆細胞株に強制発現する実験を行った。MYH10 の強制発現によって、脱核比率が上昇した。質量解析によって MYH10 と結合するタンパク質として MYL4 を同定した。MYL4 を BMDEP 細胞に遺伝子導入を行ったが、脱核率に差を認めなかった。RNA 干渉による MYL4 の抑制は、脱核に対して一貫した結果が得られなかった。

赤血球分化の過程として重要である脱核については、未知の部分も多く、深遠なテーマであり、申請者にとっては研究をすすめることに多くに苦労があったと推察される。赤血球の脱核が原則的に哺乳類に限られるという事実と脱核の過程が、不完全な体細胞分裂を彷彿させることから、進化学的にも細胞分裂の仕組みにおいても非常に興味深い研究テーマである。申請者の研究目的は、将来の赤血球輸血など臨床医学に資するためのものであり、少しでも早期に臨床応用をしたいという熱意が感じられた。今回、得られた MYH10 遺伝子の強制発現によって脱核が促進されるという知見を今後どのように展開をさせるかが課題となってくると考える(脱核効率を上げるためには、先に述べた進化学的側面と細胞分裂のメカニズムの解明を目指す必要がでてくるかもしれない)。

本学位論文の前半部分は英文原著論文として掲載され、学位論文として十分な質を有しており、若干の文章の修正や追記をもって合格とした。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は学位論文の順にそって研究内容を発表した。これまでの基礎研究の背景から、臨床における本研究の必要性、その目的を述べ、得られた研究成果を評価委員に十分に理解できるように説明し、結果から得られる考察を適切に述べた。発表の具体的な内容は論文審査の結果に述べた通りである。審査委員からは以下のような質問やコメント、学位論文に対する修正点が指摘された。

1. 赤血球分化に関わる遺伝子として同定した SELENBP が赤血球のどのような機能に関与しているかと推測されるか。推測でもよいので、予測される機能を教えてほしい。

2. 今後、SELENBP1 の機能解析をすすめていくことも興味深い。RNA を干渉の 1 回の検討においては表現系に差を認めなかったが、今後、別の細胞株を用いたり、赤芽球系以外の細胞における分化には関わっていないかなど、多角的な検討を進めることで新たな知見が得られるかも知れない。
3. RNA 干渉による MYL4 の発現抑制実験においては、脱核が誘導されている実験結果も得られている。更に検討を進めることで新たな知見が得られる可能性がある。
4. 統計学的有意差の有無を評価し、有意差がない場合は傾向を認めた、などの表現に留めた方がよい。
5. 指摘された部分の誤字や図の修正を行うこと。

申請者は上記についての的確に返答することができ、かつ指摘された点に対して、適切に論文を修正した。

以上より、発表、質疑応答の内容、及び修正された学位論文から研究者として十分な資質を有しており、医学博士号に値すると判断し、最終試験に合格とした。