

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17367

研究課題名(和文) ヒト赤血球造血におけるホスファチジルイノシトールリン酸の生理機能解明

研究課題名(英文) Physiological function of phosphatidylinositol phosphate in human erythropoiesis.

研究代表者

浅沼 研 (Asanuma, Ken)

秋田大学・医学系研究科・総括技術長

研究者番号：50710125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト赤芽球の成熟に伴い、細胞内ホスファチジルイノシトール3リン酸(以下、PI(3)P)量がその前駆体であるホスファチジルイノシトール(以下、PI)に対し相対的に増加する事を見出した。また種々のホスファチジルイノシトール3キナーゼ(以下、PI3K)たんぱく質の発現を解析し、赤芽球の成熟に伴い多くのPI3Kの発現が減弱し最終的に消失する一方で、PIからPI(3)Pを特異的に産生するとされるクラス のPI3KであるPIK3C3は脱核に至るまでその発現が高いレベルで維持されている事を明らかとした。PIK3C3並びにその産生産物であるPI(3)Pがヒト赤芽球の成熟を正に制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト赤芽球の分化過程にPIK3C3並びにPI3Pが関与する可能性を初めて示した事に学術的意義がある。分化した赤血球は脱核しているが故に自己増殖能がなく、深刻な貧血をもたらす血液疾患罹患者は献血による血液製剤を用いた輸血に頼らざるを得ない。赤血球の分化をPIK3C3並びにPI3Pが正に制御する可能性を見出した事は、赤血球の工業生産への応用へとつながる可能性があり社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The Class phosphoinositide 3-kinase, PIK3C3 is known to contribute to autophagy and regulate intracellular membrane trafficking. However, the role of PIK3C3 in human erythropoiesis is little known. In this study, we elucidate that the amount of intracellular phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) increased relative to its precursor phosphatidylinositol (PI) as human erythroblasts mature, and the PIK3C3 protein expression level is highly maintained until enucleation. These findings suggest that PIK3C3 and its product, PI(3)P, might be positive regulators for human erythropoiesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒト赤芽球 ホスファチジルイノシトール ホスファチジルイノシトール3キナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト赤芽球は、細胞増殖、核の濃縮、核の偏在化(細胞極性化)、核の細胞外排出(脱核)を経て赤血球に終末分化するユニークな細胞である。分化した赤血球は脱核しているが故に自己増殖能がなく、深刻な貧血をもたらす血液疾患罹患者は、献血による血液製剤を用いた輸血に頼らざるを得ない。

本研究では、細胞の増殖のみならず分化においても重要な生理機能を持つことが知られているホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)とその産物であるホスファチジルイノシトールリン酸に着目した。赤血球造血におけるPI3Kの働きは、その活性阻害によって惹起された細胞応答や形態の変化から解析されてきた。しかし、PI3Kの代謝産物であるホスファチジルイノシトールリン酸の解析が殆どなされていないことから、PI3Kの活性阻害により惹起される現象が、どのホスファチジルイノシトールリン酸の生理機能に負うのかは未だに不明な点が多い。

Wangらは脱核に先駆けて起こる細胞極性化にはPI3Kが必要であると報告している(*J Cell Sci*, 125: 347, 2011)が、申請者等はヒト赤芽球にPI3K阻害剤であるLY294002を作用させても後期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)の増殖が抑制されるにとどまり、脱核には影響がないことを確認し報告した(Kobayashi et al. *Exp. Hematol*, 44(4), 247, 2016)。このような結果の相違は、ある特定の分化段階においてPI3Kの酵素活性を阻害した際に観察される細胞応答のみを評価したものであり、厳密な代謝産物の動態を解析していないことに起因すると考えられる。ヒト赤芽球においてPI3Kの代謝産物であるホスファチジルイノシトールリン酸の定量的解析がなされた報告は皆無であり、細胞増殖、核の濃縮、細胞極性化、脱核というヒト赤芽球の分化過程において、どのホスファチジルイノシトールリン酸がどの分化段階でどのような働きをしているのかはこれまで全くの不明であった。

2. 研究の目的

ヒト赤血球造血におけるPI3K並びにその代謝産物であるホスファチジルイノシトールリン酸の生理機能を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)純化したヒト赤芽球の培養7日目、9日目、11日目、13日目の各分化段階(細胞増殖、核の濃縮、核の偏在化、脱核に至るまでの一連の過程)における細胞内でのホスファチジルイノシトールリン酸の量を質量分析計を用いて定量解析する。

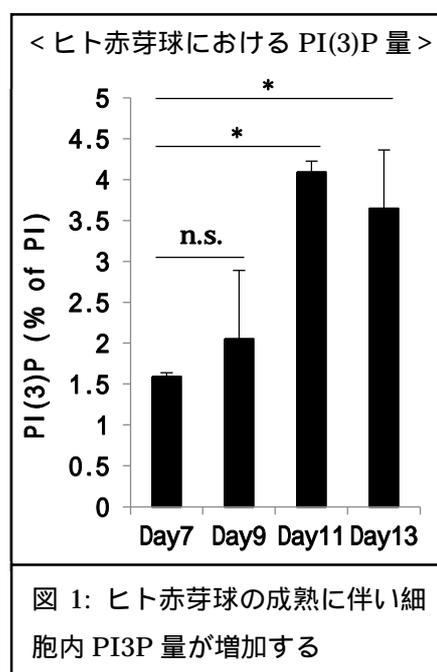
(2)同じく純化したヒト赤芽球の各分化段階における細胞内での種々のPI3Kたんぱく質の発現レベルをWestern Blotting法により定量解析する。

(3)ヒト赤芽球の各分化段階でその発現量に変動が見られたホスファチジルイノシトールリン酸に着目し、その代謝酵素の過剰発現あるいは発現抑制がヒト赤芽球の分化に与える影響を解析する。

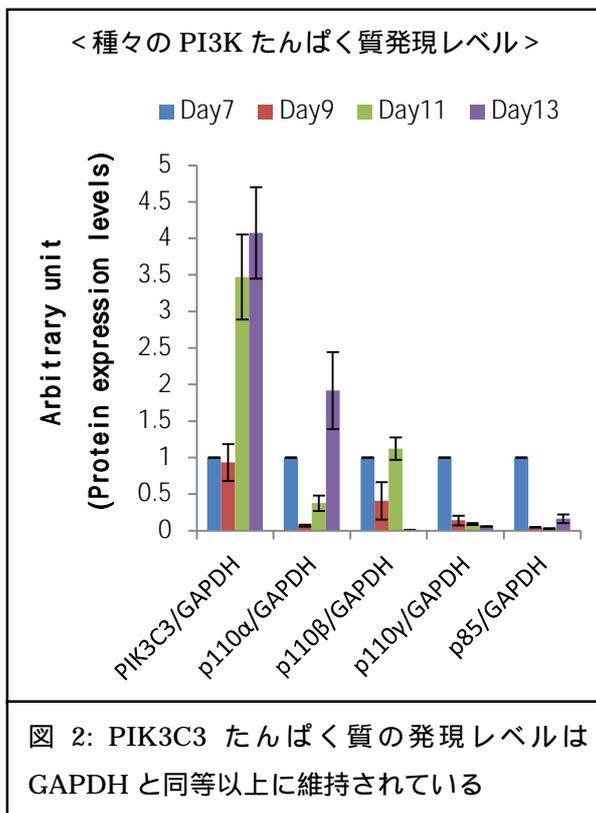
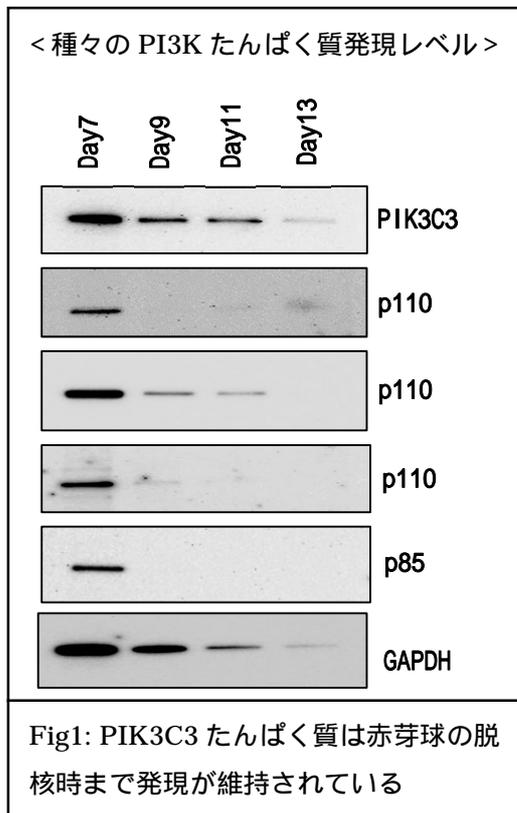
4. 研究成果

(1)質量分析計を用いた解析により、ヒト赤芽球の成熟に伴いPI(3)P量がその前駆体であるホスファチジルイノシトール(PI)と比較して相対的に増加する事を見出した(図1)。ホスファチジルイノシトール-3,4-ビスリン酸、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-トリスリン酸は検出限界未満であった。

(2)種々のPI3Kたんぱく質の発現をWestern Blotting法により解析した。多くのPI3Kたんぱく質が赤芽球の成熟と

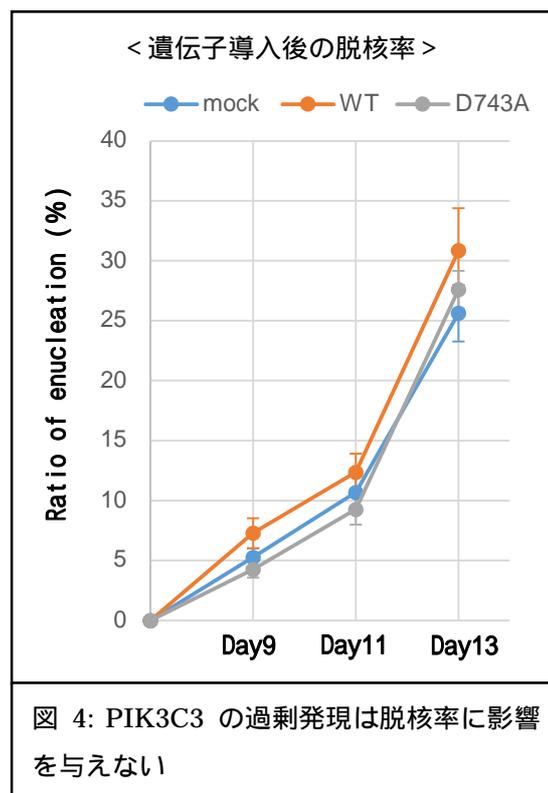
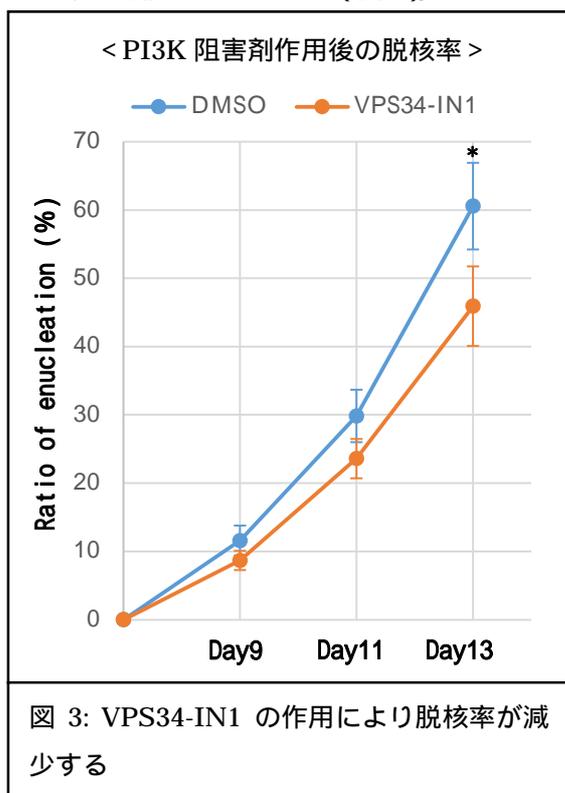


共に発現が減弱し最終的に消失する一方で、PI から PI(3)P を特異的に産生するクラス の PI3K である PIK3C3 は脱核に至るまで発現が維持され、発現レベルはハウスキーピング遺伝子である GAPDH と同等以上である事が確認された (Fig1, 図2)。



(3)種々の PI3K 阻害剤を用いた解析を行った。VPS34-IN1 で処理した細胞において、脱核率の減少が確認された (図3)。

(4)PIK3C3 の野生型(WT)及び D743A 活性欠失変異体の発現ベクターを構築し、ヒト赤芽球に遺伝子導入し解析を行った。わずかながら PIK3C3 野生型の過剰発現により脱核率が増加したが優位差は確認されなかった(図4)。D743A 活性欠失変異体の過剰発現によるドミナントネガティブな効果も確認されなかった(図4)。



(1) ~ (3)より、PIK3C3 並びにその産生物である PI(3)P が、ヒト赤芽球における脱核を正に制御している可能性が示唆された。(4)については遺伝子導入の影響によりそもそも脱核率の減少が確認されているため過剰発現の結果を正しく観察できていない可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Yumi, Guo Yong-Mei, Goto Tatsufumi, Ubukawa Kumi, Asanuma Ken, Kobayashi Isuzu, Sawada Kenichi, Wakui Hideki, Takahashi Naoto	4. 巻 207
2. 論文標題 IL-6 Generated from Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells through TLR4 Signaling Promotes Emergency Granulopoiesis by Regulating Transcription Factor Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1078 ~ 1086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------