学位論文審査結果の報告書

氏　　名	賴　晋也
生 年 月 日	昭和　55年　10月　31日
本 籍（国籍）	日本
学位の種類	博　　士　（医　学）
学位記番号	医　第　1174号
学位授与の条件 （博士の学位）	学位規程第５条該当

論 文 題 目

Clathrin assembly protein CALM Plays a Critical Role in KIT Signaling by Regulating Its Cellular Transport from Early to Late Endosomes in Hematopoietic Cells.

（クラスリン集合蛋白CALMの造血因子受容体の細胞内輸送制御における機能解析）

審 査 委 員

（主　査）	松村 到	印
（副主査）	義江 修	印
（副主査）	宮澤正顯	印
（副　査）		印
（副　査）		印

論文内容の要旨

【目的】

クラスリン集合蛋白CALMは、受容体などの膜分子の細胞内への取り込みや、細胞内輸送に重要な“被覆小胞”の形成に関わる。我々は、CALM欠損（KO）マウスを作製し、CALMが赤芽球において、トランスフェリン受容体を介した鉄の取り込みに機能していることを見出した。一方、未分化な造血細胞におけるCALMの機能は明らかにされていない。本研究では、造血幹/前駆細胞に発現するKITの活性制御におけるCALMの機能を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法】

野生型（WT）、およびKOの胎仔肝より造血幹/前駆細胞（LSK細胞）を分離し、コロニー形成能、および増殖能を検討した。WT、KOマウス由来の胎仔線維芽細胞（MEF）にKITを遺伝子導入し、リガンドであるSCF刺激後のKITの細胞内への取り込み、細胞内輸送をフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。SCF刺激後のKITの活性化、細胞内シグナル伝達を、ウェスタンブロット法およびフローサイトメトリー法で解析した。

【結果】

CALM KO胎仔肝のLSK細胞数は、WTと比較して1/2以下に減少していた。また、KO由来LSK細胞のコロニー形成能は、その種類に関わらず有意に減少していた。LSK細胞を、SCF, FL, TPO添加培地で7日間培養した結果、WTでは約20倍の増幅が得られたのに対し、KOではほとんど増幅が得られなかった。KITを導入したMEFをSCFで刺激した結果、WT, KOいずれにおいても約20分間細胞内へのKITの取り込みが観察された。WTでは、取り込まれたKITは早期エンドソーム(EE)から後期エンドソーム（LE）へ速やかに輸送され、刺激30分以後分解された。一方、KOでは、EEからLEへのKITの輸送が阻害され、30分以後もEEに残存していた。また、WTではSCF刺激後一過性に細胞表面のKITのチロシンリン酸化、下流分子であるERK, Aktのリン酸化を認めたのに対し、KOではKITのリン酸化の遷延、Aktの持続的な活性化を認めた。SCF刺激後のAktの持続的な活性化は、KOマウスの未分化な造血細胞においても認められた。

【考察】

CALMは、未分化な造血細胞においてKITの細胞内輸送、特にEEからLEへの輸送を制御することで、KITのシグナル伝達を調節していると考えられた。CALM欠損によりFL, TPOによる増殖が抑制されていたことから、Flt3やMplの活性制御にもCALMが機能している可能性が示唆された。また、これら受容体の活性化変異が造血器悪性腫瘍でしばしば認められることから、CALMによる小胞輸送を標的とした新たな分子療法の可能性が示唆された。

【結論】

CALMは、KITの細胞内輸送を制御することで、造血細胞におけるKITからのシグナル伝達に重要な役割を担うことが明らかとなった。

博士論文の印刷公表	公　表　年　月　日	出版物の種類及び名称
	2014年 10 月　日　公　表	出版物名 PLoS One 3;9(10):e109441. 2014年 10 月　日　発　行
	公　表　内　容	
	全　　文	

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

申請者の学位論文は、クラスリン集合蛋白CALMの造血因子受容体の細胞内輸送制御における機能を明らかにしようとしたものである。
クラスリン集合蛋白CALMは、受容体などの膜分子の細胞内への取り込みや、細胞内輸送に重要な“被覆小胞”の形成に関わることが知られていたが、その生理的機能は明らかではなかった。申請者らは、CALM欠損（KO）マウスを作製し、CALMが生体内で赤芽球のトランスフェリン受容体を介した鉄の取り込みに機能することで、赤血球造血を制御していることを見出し報告した。しかしながら、未分化な造血細胞におけるCALMの機能は未だ明らかではなかったことから、造血幹/前駆細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼKITの活性制御におけるCALMの機能を明らかにすることを目的として本研究を行った。
解析方法としては、野生型（WT）、および CALM KOの胎仔肝より造血幹/前駆細胞を含む分画としてLSK細胞を分離し、コロニー形成能、および増殖能を検討した。WT、KOマウス由来の胎仔線維芽細胞（MEF）にKITを遺伝子導入し、リガンドであるSCF刺激後のKITの細胞内への取り込み、細胞内輸送をフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。SCF刺激後のKITの活性化、細胞内シグナル伝達を、ウェスタンブロット法およびフローサイトメトリー法で解析した。
結果として、CALM KO胎仔肝のLSK細胞数は、WTと比較して1/2以下に減少していた。また、KO由来LSK細胞のコロニー形成能は、その種類に関わらず有意に減少していた。LSK細胞を、SCF, FL, TPO添加培地で7日間培養した結果、WTでは約20倍の増幅が得られたのに対し、KOではほとんど増幅が得られなかった。KITを導入したMEFをSCFで刺激した結果、WT, KOいずれにおいても約20分間細胞内へのKITの取り込みが観察された。WTでは、取り込まれたKITは早期エンドソーム（EE）から後期エンドソーム（LE）へ速やかに輸送され、刺激30分以後分解された。一方、KOでは、EE からLEへのKITの輸送が阻害され、30分以後もEEに残存していた。また、WTではSCF刺激後一過性に細胞表面のKITのチロシンリン酸化、下流分子であるERK, Aktの一過性のリン酸化を認めたのに対し、KOではKITのリン酸化の遷延、Aktの持続的な活性化を認めた。SCF刺激後のAktの持続的な活性化は、KOマウスの未分化な造血細胞においても認められた。以上の結果から、CALMは、未分化な造血細胞においてKITの細胞内輸送、特にEEからLEへの輸送を制御することで、KITのシグナル伝達を調節していると考えられた。また、CALM欠損によりFLによる増殖が抑制されていたことから、Flt3など他の受容体型チロシンキナーゼの活性制御にもCALMが機能している可能性が示唆された。
本研究は、造血因子受容体の活性制御機構におけるCALMの新たな機能を見出したものであり、独創性に富んだ、学術的意義の高い内容である。KITやFlt3の活性化変異は、造血器悪性腫瘍でしばしば認められ、このような例では既存の治療に対して抵抗性を示すことが知られている。本研究の成果は、CALMによる受容体の小胞輸送を標的とした新たな分子標的療法の開発基盤となると考えられ、発展性の高い研究と考えられる。
以上、本論文は学位に値する研究内容であると判断される。

課博・論博

博士学位論文最終試験結果の報告書

平成　27年　　2月　　3日

審査委員	主査	松村到 ㊞
	副主査	義江修 ㊞
	副主査	宮澤正顯 ㊞
	副査	㊞
学位申請者氏名	賴　晋也	
論文題目	Clathrin assembly protein CALM Plays a Critical Role in KIT Signaling by Regulating Its Cellular Transport from Early to Late Endosomes in Hematopoietic Cells. (クラスリン集合蛋白CALMの造血因子受容体の細胞内輸送制御における機能解析)	

要　旨

本研究において申請者が着目した分子CALMは、クラスリン依存性エンドサイトーシス経路の被覆小胞形成に重要な分子として、主にin vitroの解析結果から報告されていたが、生体内における機能については不明な点が多く残されていた。申請者らは、CALM 欠損（KO）マウスを作製し、CALMがトランスフェリン受容体を介した鉄の取り込みに機能することで、赤血球造血を制御していることを見出した。さらに本研究において、KOマウス造血幹/前駆細胞（HSC/HPC）では、造血因子SCF、FL、TPO依存的な増殖が強く障害されており、胎仔肝中のHSC/HPC 数が野生型と比較して有意に減少していることを見出した。この機序として、CALM欠損により、造血因子受容体、特に HSC/HPC の増殖に必須な受容体型チロシンキナーゼKITの細胞内輸送が障害され、異所性のKITからのシグナルが細胞内に伝達されることで、 HSC/HPC に増殖抑制がもたらされていることを明らかにした。

申請者の学位最終試験は義江教授、宮澤教授を副主査として2月3日に実施された。

公聴会では、①CALM欠損によりKITからの増殖シグナルが持続的に活性化しているにも関わらず、in vitroでの造血細胞の増殖が抑制されている矛盾、②CALM欠損がより未分化な赤芽球系細胞の発生、分化に及ぼす影響、③CALM欠損がBリンパ球の分化に及ぼす影響、④CALM欠損造血細胞の造血因子に対する反応性（増殖）の差異、⑤CALM変異、もしくは欠損とヒト疾患との関連について指摘および質問があった。

申請者は、これらの指摘や質問に対して副査の先生方と議論する形で、①CALM欠損により生じた異所性のKITの活性化は、通常の増殖シグナルとは異なり、不適切なシグナルとして細胞内に伝達されることで、造血細胞の増殖抑制さらには細胞老化を誘導している可能性があること、②CALM KOマウスにおける赤芽球の発生過程についての解析は行っていないが、CALMがEPO受容体の細胞内輸送を制御することで、EPO依存性の強いBFU-E, CFU-Eの発生、分化を制御している可能性が考えられること、③CALM KOマウスにおけるBリンパ球の成熟、分化障害を確認しており、継続して解析を行っていること、④造血因子ごとに細胞増殖をもたらす主要なシグナル伝達経路が異なっており、受容体やその経路を担う下流分子の活性化にCALM欠損が及ぼす影響の大きさに応じて、造血因子に対する反応性が異なっている可能性が考えられること、⑤一部の造血器悪性腫瘍においてCALMと転写制御因子AF10との融合蛋白が認められ、CALMによるAF10の細胞内局在変化が腫瘍の発症に深く関わっていることなど論理的、かつ科学的に適切な回答を行った。よって最終試験に合格したと判断する。