

氏 名 (本籍) ^{てら}寺 ^{さわ}沢 ^{たかし}崇

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 4 2 9 号

学位授与年月日 昭 和 5 7 年 9 月 8 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 4 7 年 3 月
 北里大学衛生学部衛生技術学科卒業

学位論文題目 Hemoglobin Biosynthesis in Individual
 Bursts from Adult Peripheral and Umbilical
 Cord Blood; Analysis of the Relative Rates
 of Synthesis of *Gr* and *Ar* Globin Chains.
 (成人末梢血及び臍帯血中に由来する赤芽球
 前駆細胞 (バースト) 個々のヘモグロビン生
 合成: *Gr*・*Ar* グロビン鎖合成の分析について)

(主 査)

論文審査委員 教授 鈴木 泰三 教授 西山 明德

教授 菊地 吾郎

論 文 内 容 要 旨

目 的

胎児型ヘモグロビン (HbF) は $\alpha_2 \gamma_2$ のグロビン鎖より構成され、特に γ グロビン鎖はそのアミノ酸組成の第 136 番目が glycine のもの (Gr) と alanine のもの (Ar) が存在し、この 2 種類のグロビン鎖の構成比率から胎児型と成人型に区別されている。すなわち、胎児血 HbF の Gr:Ar の割合は 3:1 (胎児型) であり、成人末梢血 HbF では 2:3 (成人型) である。本研究は in vitro の条件下で赤芽球系前駆細胞 (BFU-E; burst forming unit-erythroid) の γ 鎖合成が増加することを利用し臍帯血、成人血中の個々の burst (BFU-E コロニー) 中の Gr, Ar, 鎖合成比率の分析を行ない BFU-E レベルでの hemoglobin switching の様態を検討した。

方 法

1. BFU-E の培養

臍帯血あるいは成人末梢血をヘパリン加採血し Ficoll-Isopaque により有核細胞を分離し、 α -medium, 0.8% methylcellulose, 30% 牛胎児血清, 1% 脱イオン化牛血清アルブミン, 1.0 U/ml 羊血漿エリスロポエチンに細胞を混ぜ (臍帯血の場合 1×10^5 cells/ml, 成人末梢血の場合 3×10^5 cells/ml) 1 ml とし 35 mm ペトリ皿に入れ、37°C, 5% CO₂, 100% 湿度で 14 日間培養した。

2. 個々の burst 中のグロビン鎖分析

培養終了 2 日前に 2 μ Ci の 14 C-アミノ酸を培養皿に添加しさらに 48 時間培養を続け、この間に burst 中で生合成されてくるグロビン鎖を標識した。培養 14 日目に burst を培養皿よりつり上げ microcentrifuge tube に移し、PBS を用いて burst を洗浄し、上清を除き -70°C に凍結保存した。グロビン分析に際しサンプルを融解し 5 μ l の detergent solution (8 M-尿素, 10% 2-mercaptoethanol, 3% Nonidet P-40) を入れ 30 分間室温に放置した。グロビン鎖の分離は 8 M-尿素, 3% Nonidet P-40, ampholine (pH 6-8 と pH 3.5-10) の含まれた polyacrylamide slab gel を用いた等電点電気泳動法により行った。次いで fluorogram を作製し densitometric tracing を行ない個々の burst における各グロビン鎖の生合成比率を測定した。

3. 統計学的処理

個々の burst 中の γ 鎖生合成比率 $\{r/(r+\beta)\}$ および Gr 鎖生合成比率 $\{Gr/(Gr+Ar)\}$

について統計学分析を行った。すなわち、少数のサンプルデータからその分布の正規性を推定するため probit 変換 (図形解析) と D'Agostino 検定 (有意性の検定) を行った。

結果および考察

臍帯血 4 例 135 個の burst と成人血 3 例 102 個の burst について個々の burst における各グロビン鎖生成比率を分析した。

(1) すべての burst は r 鎖と β 鎖の両グロビン鎖を含んでいた。また r 鎖対 β 鎖, Gr 鎖対 Ar 鎖の生成比率は burst 間で異なっていた。

(2) 個々の burst 中の r 鎖合成比率 (mean \pm SD) は成人血 3 例の BFU-E の場合, 0.23 ± 0.08 (36; 分析した burst 数), 0.17 ± 0.06 (38), 0.20 ± 0.05 (28) であり, 臍帯血 4 例の場合, 0.56 ± 0.15 (32), 0.47 ± 0.13 (38), 0.56 ± 0.16 (28), 0.71 ± 0.14 (37) であった。

(3) 個々の burst の全 r 鎖中の Gr 鎖合成比率 (mean \pm SD) は成人血 BFU-E では, 0.35 ± 0.08 (36), 0.39 ± 0.06 (38), 0.37 ± 0.05 (28) と成人型を呈したが, 臍帯血 BFU-E では, 0.57 ± 0.07 (32), 0.52 ± 0.05 (38), 0.52 ± 0.05 (28), 0.59 ± 0.07 (37) と成人型と胎児型の間値を示した。従ってこれらのことは臍帯血中 BFU-E は Hb F が Gr 鎖合成優位から Ar 鎖合成優位へと変換する switching の移行の段階にあることを示唆した所見である。

(4) 成人血および臍帯血中の個々の burst の $[r/(r+\beta)]$ と $[Gr/(Gr+Ar)]$ について probit 変換による分析の結果, 各データが直線的分布傾向を示した。これは各データの分布が正規性を有する所見である。さらに D'Agostino 検定より結果の有意性について検討した結果これらのサンプルデータの分布は有意に正規型分布を示していることを認めた ($\alpha < 0.05$)。

(5) 成人血および臍帯血の分析したすべての BFU-E において r 鎖と Gr 鎖合成比率との間に有意 ($p < 0.02 \sim p < 0.001$) な正の相関関係が認められた。

結 論

成人末梢血および臍帯血由来 BFU-E コロニー個々について Gr 鎖, Ar 鎖合成比率の分析を行ない BFU-E レベルでの hemoglobin switching の様態について検討した。

(1) Hemoglobin switching あるいは出生後の Hb F reactivation における Hb F の調節は F-cell clone の増減によるものではなく BFU-E 内での r 鎖合成の gene expression の優位に依存している

(2) 胎児型あるいは成人型 r 鎖を合成する BFU-E は個々に存在するのではなく同一の BFU-E 内での連続的かつ質的变化 (gene expression の変化) に基づいて switching が進行する。

(3) r 鎖から β 鎖および Gr 鎖から Ar 鎖への合成率優位の変換は BFU-E レベルにおいて共通の調節機序が関与していると思われる。

審査結果の要旨

寺 沢 崇

胎児ヘモグロビン(HbF)のグロビンは $\alpha_2\gamma_2$ といわれるように、 r 鎖をもつのが特徴であり、 r 鎖にも第136番目のアミノ酸がglycineのもの(Gr)とalanineのもの(Ar)がある。GrとArとは同一人のなかでも混在しているが、その割合(GrとArとの比)は、胎生期にはGrが多く、成人になるとArの方が多い。これは、胎児から出生後にかけてHbFがHbA(成人ヘモグロビン)に変換されると同時に、HbFの r 鎖もGrからArに変換されていく、と考えられる。本研究では、その2つの変換がどのように関連しているかを明らかにしている。研究方法としては、 r 鎖合成の盛んな赤芽球前駆細胞(BFU-E; burst forming unit-erythroid)を培養し、各burstにおけるグロビン鎖の合成をみている。胎児血としては臍帯血を用い、成人血としては成人末梢血を用いている。

その結果をまとめると、つぎの点が明らかとなる。

- (1) 個々のburst内の r 鎖合成率は臍帯血の方が成人血より大である。すなわち、出生に伴って r 鎖から β 鎖へと合成の変換が進行する。
- (2) 個々のburst内では、 r 鎖内でのGr鎖の合成比(Gr/全 r)は出生に伴って減少していく。すなわち、全 r はGrとArの和であるから、出生と共にGrからArへと合成の変換が進行することが明らかである。
- (3) r 鎖から β 鎖への変換と、GrからArへの変換とはほぼ平行して進行することから、これらに共通している調節機序があるものと推定される。
- (4) この共通した変換は、同一のBFU-E内での連続的かつ質的な変化(gene expressionの変化)であって、特定のcell cloneの増減によるものではない、であろうと推定できる。以上の成績から本論文は学位授与に値するものと考えらる。