

[総説]

巨核球造血におけるアポトーシス関連タンパクの役割

上 妻 行 則^{1*} 登 尾 一 平¹

The role of apoptosis-related proteins during megakaryopoiesis.

Yukinori KOZUMA, Ippei NOBORUO

要旨

血小板の母細胞である巨核球は、造血幹細胞から巨核球系特異的サイトカインである thrombopoietin (TPO) の制御を受け、分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成する。この胞体の先端が断裂することにより血小板が産生される。以前より、培養巨核球が TPO 存在下においてもアポトーシスに陥りやすいことから、血小板産生過程にアポトーシスが関与するという仮説が提唱されてきた。そこで本稿では、巨核球造血におけるアポトーシスの関与について概説する。

キーワード：巨核球, アポトーシス

1. はじめに

血小板の母細胞である巨核球は、造血幹細胞から巨核球系特異的サイトカインである thrombopoietin (TPO) や GATA-1, nuclear factor-erythroid2 (NF-E2) p45 などの転写因子の制御を受け、核の多倍化と胞体の成熟を伴いながら分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成する。この胞体突起の先端が断裂することにより血小板が産生される^{1,2)}。TPO のクロニングにより巨核球研究は飛躍的に進歩し、巨核球胞体突起形成という独特な形態変化の分子メカニズムについて多くの研究がなされた。特に、培養巨核球から血小板が産生される様子が、アポトーシスにより細胞質が崩壊し、apoptotic body が産生されるときに形態学的特徴に類似することなどから血小板産生へのアポトーシスの関与が提唱され、巨核球造血におけるアポトーシスの調節機構に関して詳細な検討が行われてきた。

アポトーシスとは「遺伝子にプログラムされた細

胞死」であり、炎症の誘導や組織の破壊が起こらない。アポトーシスには内因性と外因性の経路があるが、アポトーシスにおいて最も重要な役割を担うタンパク質は caspase と呼ばれる。特に caspase-3 は effector タンパク質として中心的な役割を担い、Fas や TNF レセプターからのシグナルにより活性化された caspase-8, またはミトコンドリアから放出された cytochrome c により活性化された caspase-9 を介して活性化される (図 1)。一方、アポトーシスシグナルを制御するタンパク質として BCL-2 ファミリータンパク質が知られており、機能と構造から、①アポトーシスを抑制する BCL-2 サブファミリー (BCL-XL, BCL-2 など)、②アポトーシスを促進する BAX サブファミリー (BAK や BAX など)、③アポトーシスを促進する BH3-only タンパク質 (BIM や BID など) の 3 つのグループに分けられる。これら antiapoptotic protein と proapoptotic protein のバランスが造血という複雑なシステムを制御するために重要である。本総論で

所属

¹熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

*責任著者: kozuma18@kumamoto-hsu.ac.jp

は、巨核球造血におけるアポトーシス関連タンパク質の役割、さらには近年注目されている血小板老化メカニズムについて過去の知見と筆者らが見出したデータに基づき概説する。

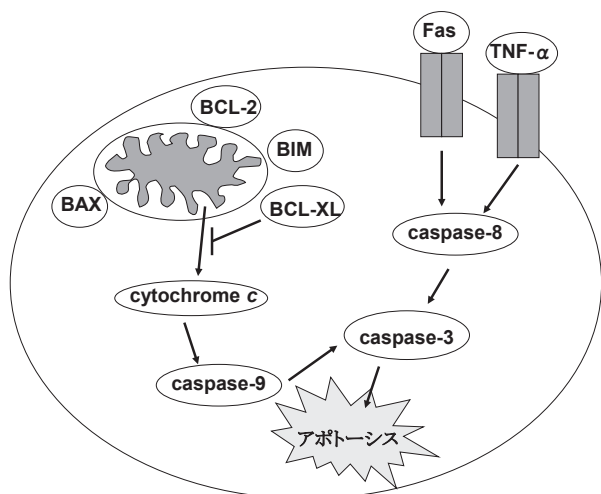


図1 アポトーシス経路

細胞において生存シグナルが枯渇するとミトコンドリアから放出された cytochrome c によって caspase-9 が活性化され、あるいは Fas や TNF レセプターなどデスレセプターへの Fas Ligand や TNF- α の結合により、その下流で caspase-8 が活性化され、caspase-3 の活性化が起こり、アポトーシスをきたす。

2. 巨核球における BCL-XL 発現調節機構

造血細胞が正常に分化・成熟するためには、アポトーシスから恒常的に保護される必要がある。巨核球造血においては、antiapoptotic protein である BCL-XL に関する研究が多くなされてきた。赤芽球系細胞株 K562 を巨核球へ分化誘導すると BCL-XL 発現が亢進すること、TPO は *BCL-XL* 遺伝子のプロモーター部分への Stat5 の結合により BCL-XL 発現を誘導する役割を有することなどが報告されている^{3,4)}。筆者らは、TPO 存在下でマウス造血前駆細胞 (c-kit+/Lin-) を培養すると、BCL-XL mRNA およびタンパク発現は巨核球へと分化するに従い増加し、胞体突起形成巨核球において将来血小板となる部分 (platelet bud) や血小板においても BCL-XL タンパクの発現が認められること (図2A)、また抗血小板抗体投与による血小板減少モデルマウスにおいても、血小板回復期に至るまで BCL-XL

の発現が維持されることを報告した (図2B)⁵⁾。この結果は、BCL-XL 発現が巨核球に分化・成熟するに従い増加し、巨核球が成熟すると BCL-XL 発現が急激に低下することを見出した Sanz らの報告とは異なる⁶⁾。しかし、Mason らは、Bcl-x^{Plt20/Plt20} マウスを用いた実験により、BCL-XL は血小板のアポトーシスを抑制し、血小板寿命に関与することを報告していることから⁷⁾、胞体突起の platelet bud 及び血小板で観察された BCL-XL 発現は、胞体突起から断裂した後の血小板寿命を制御する上で極めて重要であると考えられる。

このように BCL-XL が巨核球の生存に重要な役割を果たすことが想定されていたが、BCL-XL の発現調節機構については不明であった。そこで、筆者らは、巨核球造血における BCL-XL タンパクの恒常的な発現メカニズムを解析するために、TPO 依存性細胞株 UT-7/TPO における BCL-XL mRNA 及びタンパクの発現を検討したところ、培養上清からの TPO 枯渇により BCL-XL mRNA の発現量は

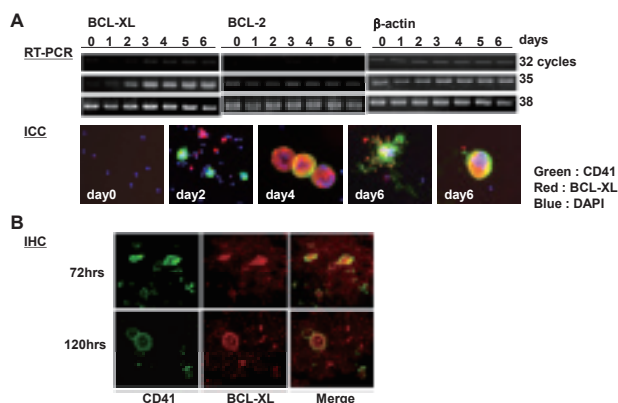


図2 巨核球造血における BCL-XL mRNA 及びタンパク発現の変化

A) c-kit+/Lin- 細胞を TPO 存在下で培養したところ、BCL-XL mRNA 発現は巨核球へと分化するに従い増加した。また、c-kit+/Lin- 細胞を TPO 存在下で培養し、抗 CD41 抗体 (緑)、抗 BCL-XL 抗体 (赤)、DAPI (青) で免疫染色を行った。BCL-XL タンパクの発現は巨核球へと分化するに従い増加し、胞体突起形成巨核球の platelet bud においても発現が認められた。B) 抗血小板抗体をマウス腹腔内に投与後、血小板回復期の骨髓を採取し、抗 CD41 抗体 (緑)、抗 BCL-XL 抗体 (赤)、DAPI (青) で免疫染色を行った。抗血小板抗体投与後 72 時間 (血小板回復期) に至るまで BCL-XL タンパクの発現が認められた。(文献5より引用改変)

変化しないものの、完全長 BCL-XL タンパク発現の低下が認められた (図 3 A, B)。また、BCL-XL タンパクの発現レベルの低下する時期に一致して caspase-3 活性化が認められた (図 3 A)。さらに完全長 BCL-XL タンパクの発現低下が、TPO 枯渇による BCL-XL タンパクの切断によるものか明らかにするために抗 BCL-XL 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、図 3 C に示すように完全長の BCL-XL タンパクは約 30kDa であるが、TPO 枯渇により約 12kDa の BCL-XL タンパクの断片が検出された。また、caspase-3 特異的阻害剤 (z-DQMD-fmk) 添加により BCL-XL タンパクの断片が消失したことから (data not shown), TPO 枯渇に伴い活性化した caspase-3 により BCL-XL が切断される可能性が

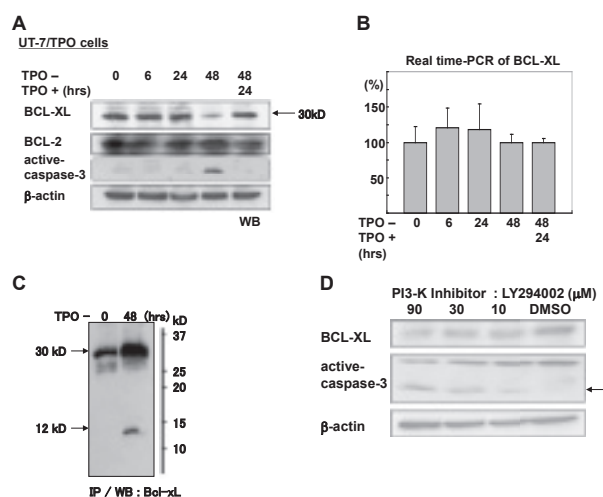


図 3 TPO 枯渇時における BCL-XL 発現レベルの変化と PI3 K の役割

A, B) UT-7/TPO 細胞株の培養上清から TPO を枯渇すると、BCL-XL mRNA の発現量は変化しなかったが、BCL-XL タンパク発現の低下及び caspase-3 活性化が認められた。さらに、TPO 枯渇後 48 時間後に TPO (100ng/mL) を再添加したところ、完全長の BCL-XL タンパク発現が回復し、caspase-3 活性化は認められなかった。C) UT-7/TPO 細胞株を TPO (100ng/mL) 存在・非存在下で培養し、抗 BCL-XL 抗体にて免疫沈降を行ったところ、完全長の BCL-XL は 30kDa であるが、TPO の枯渇により約 12kDa の BCL-XL の断片が検出された。D) UT-7/TPO 細胞株を PI3 K inhibitor, LY294002 (50uM) 存在下で培養したところ、TPO 存在下においても BCL-XL タンパク切断及び caspase-3 活性化及びが認められた。(文献 5 より引用改変)

示唆された⁵⁾。過去 Fujita らは、BCL-XL の切断部位が HLAD⁶¹ S と SSLD⁷⁶ A の 2 箇所存在し、BCL-XL の切断された C 末端の断片自身によってアポトーシスが誘導されることも証明していることから⁸⁾、筆者らの検出した切断された BCL-XL タンパクが、巨核球造血において proapoptotic protein として作用する可能性もあるのかもしれない。一方、TPO シグナルの下流で活性化される phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 K) 阻害剤、LY294002 を添加したところ、TPO 存在下においても BCL-XL タンパクの発現低下 (切断された BCL-XL の増加) が認められたことから (図 3 D)、TPO シグナルがオンの状態では、TPO シグナル下流で活性化 PI3 K が caspase-3 の活性化を阻害し、さらには BCL-XL タンパク切断を阻害している可能性が考えられた。そこで、constitutively active Akt-1 導入 UT-7/TPO 細胞株から TPO を枯渇させたところ、BCL-XL タンパクの切断は認められず (data not shown)、活性化 caspase-3 陽性細胞の割合は少なかったことから (図 4 A)、巨核球造血における BCL-XL タンパク発現を制御する主なメカニズムとして、Akt を中心とした転写後調節が存在する可能性が示唆された。巨核球における細胞周期制御のための Akt 活性化の重要性は、Geddis らにより論証されているが、筆者らの結果や Geddis らの報告のように Akt 単独での活性化は細胞増殖に十分ではない^{5, 6, 9)}。一方、active-Akt-1 導入 UT-7/TPO 細胞株に BCL-XL siRNA を導入すると、TPO 存在下であっても活性化 caspase-3 陽性細胞の割合は増加したことから (図 4 B)、PI3 K-Akt axis の下流で BCL-XL タンパクの発現が維持されることが、巨核球の生存に重要であると考えられる。

3. 初期巨核球造血における caspase-3 活性化の関与

巨核球造血へのアポトーシスの関与を示した研究として、Zauli らは、巨核球の分化・成熟及び老化の過程においてその培養上清に血小板状粒子が増加し、その数は巨核球がアポトーシスに陥るに従って増加することを見出した¹⁰⁾。また、de Botton らは、cytochrome c の放出や caspase-3 活性化後に胞体突起形成が認められること、caspase 阻害剤添加により胞体突起形成巨核球の割合が低下することを報告した¹¹⁾。一方、Houwerzijl らは、myelodysplastic

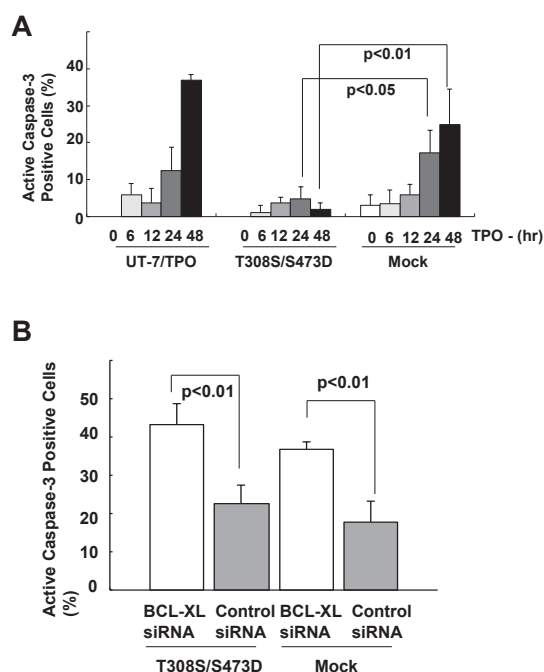


図4 AktによるBCL-XLタンパク発現レベルの制御及び巨核球生存におけるBCL-XLの役割

A) constitutively active Akt-1 (T308D/S473D) または Mock を遺伝子導入した UT-7/TPO 細胞株の培養上清から TPO を枯渇したところ、constitutively active Akt-1 導入 UT-7/TPO 細胞株では caspase-3 活性化が UT-7/TPO 細胞株及び Mock 導入 UT-7/TPO 細胞株と比較して有意に低下していた。**B)** BCL-XL siRNA またはコントロール siRNA を constitutively active Akt-1 または Mock 導入 UT-7/TPO 細胞株に遺伝子導入後、TPO 存在下で培養し、抗 active-caspase-3 抗体による免疫染色を行ったところ、いずれの細胞株においてアポトーシスに陥る細胞が有意に増加した。(文献5より引用改変)

syndrome (MDS) 患者の一部巨核球では caspase-3 活性化が認められるものの、caspase-3 活性化は MDS 患者及び健常人巨核球で認められないことを示した¹²⁾。この研究成果は、MDS 患者の巨核球造血障害に caspase-3 非依存性アポトーシスが関与することを報告したものであるが、MDS 患者及び健常人巨核球で caspase-3 活性化が起らないという点が過去の報告と異なる。このように caspase-3 活性化が巨核球からの血小板産生に関与するのではないかとこの点において検討されてきたが、結論は見出されていなかった。

そこで筆者らは、巨核球造血、特に血小板産生へ

の caspase 活性化の関与を明らかにすることを目的として、アポトーシスに強い抵抗性を示す *vav-bcl-2* transgenic (Tg) マウスの解析を行った。*in vivo* における巨核球造血能を評価するために、マウス腹腔内に 5-FU を投与したところ、野生型 (wild type: WT) では投与後 8 日目以降に血小板数の回復及び overshoot が認められたが、Tg マウスではみられず (図 5 A)、血小板回復期における骨髓内巨核球数も Tg で低下していた (図 5 B)。一方、造血幹細胞 (CD34⁻/ckit⁺/Sca-1⁺/Lineage⁻; CD34⁻/KSL) から巨核球への分化は Tg で有意に低下したものの、巨核球・赤血球前駆細胞 (megakaryo-erythroid progenitor; MEP) 細胞からの分化においては差を認めなかった (図 6 A)。これらの結果から、Tg マウスでは、造血幹細胞から巨核球への初期分化段階、特に MEP 細胞に分化する前までの段階が障害されている可能性が示唆された。また、caspase 阻害剤添加により c-kit⁺/Lin⁻ 細胞からの分化も阻害されること (data not shown)、さらに c-kit⁺/Lin⁻ 細胞を培養すると、TPO 添加後 6 時間に一過性の caspase-3 活性化が認められた (図 6 B)。近年、caspase 活性化が赤血

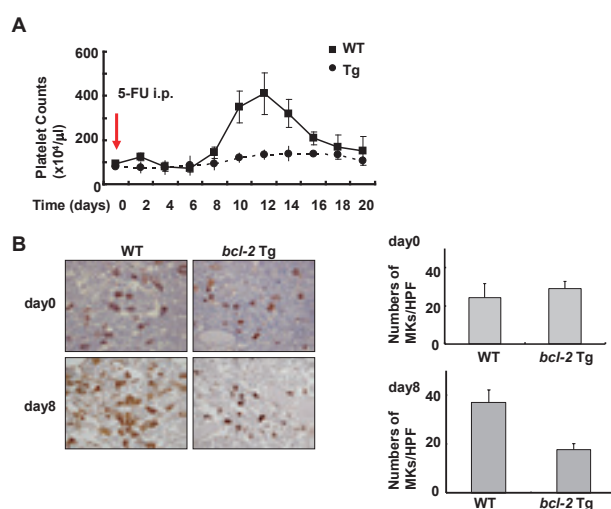


図5 5-FU 投与後 *vav-bcl-2* Tg マウスの血小板数と巨核球数の推移

A) WT 及び Tg マウス腹腔内に 5-FU (150mg/kg) を投与すると血小板数は、WT では投与後 8 日目以降に回復し、overshoot が認められたが、Tg マウスではみられなかった。**B)** 5-FU 投与後血小板回復期の骨髓を採取し、抗 vWF 抗体で染色したところ、骨髓内巨核球数は Tg で有意に低下していた。(文献14より引用改変)

球造血に必要であることなども報告されており¹³⁾, caspase-3活性化は、造血幹細胞から巨核球への初期分化、特に巨核球と赤芽球の共通の前駆細胞である MEP 細胞までの分化に重要であると考えられる。一方、WT と Tg で巨核球胞体突起形成能に差は認められず、caspase 阻害剤も胞体突起形成に影響を与えなかった (data not shown)。筆者らの研究結果は、初期巨核球造血における caspase 活性化の関与を初めて明らかにしたものであるが¹⁴⁾, caspase の下流のシグナル経路がどのようになっているかなど不明な点も多くあり、今後更なる検討が必要であると思われる。

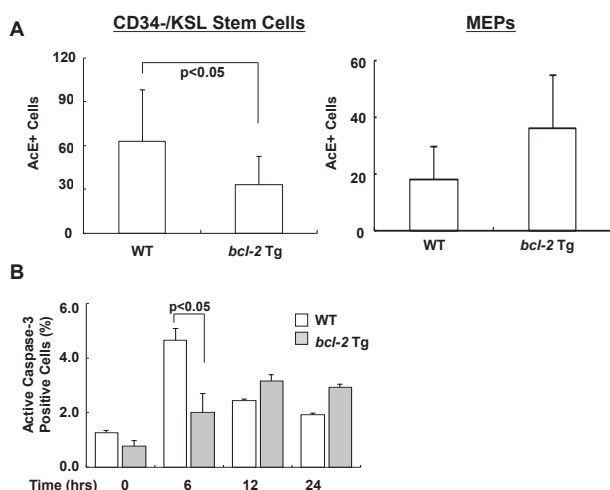


図6 *vav-bcl-2* Tg マウスにおける巨核球への分化能と caspase-3 活性化の関与

A) WT 及び Tg マウス CD34/KSL 細胞または MEP 細胞を IL-3, IL-6, TPO 存在下で培養した後、acetylcholine esterase (AcE) 染色を行い、AcE 陽性細胞 (巨核球) 数を測定した。CD34/KSL 細胞から巨核球への分化は Tg で有意に低下したが、MEP 細胞からの分化では差を認めなかった。**B)** WT 及び Tg マウス c-kit⁺/Lin⁻ 細胞を TPO 存在下で培養した後、経時的に細胞を回収し、抗 cleaved-caspase-3 抗体で染色した。WT では、TPO 添加後 6 時間で caspase-3 活性化が認められた。(文献14より引用改変)

4. 巨核球造血における BIM の役割

巨核球造血における BCL-XL などの antiapoptotic protein の重要性は筆者らの報告も含めいくつかの研究結果により示されているが、proapoptotic protein の役割については明らかでなかった。なか

でも BH3-only タンパク質に属する BIM はサイトカイン除去などの刺激により誘導されるアポトーシスの中心制御因子であることが知られている。さらに、BIM は血液細胞に強く発現することが知られているが、巨核球・血小板における発現やその役割についてはこれまでに報告はない。そこで筆者らは、巨核球造血における BIM の役割を検証することを目的として *bim* knockout (KO) マウスの解析を行った。5-FU を投与し、生体内における巨核球造血を評価したところ、WT マウスと比較して KO マウスでは血小板回復が遅延した¹⁵⁾。また血小板回復期の骨髓内巨核球数は KO で有意に低下していたにもかかわらず、巨核球 ploidy 及び巨核球胞体突起形成能は両者で差は認めなかった (図7A)¹⁵⁾。過去、後期巨核球造血は TPO 非依存性であることが報告されていることから¹⁶⁾, BIM は巨核球からの血小板産生に関与していないと考えられた。一方、TPO 存在下における c-kit⁺/Lin⁻ 細胞の増殖能が、WT より KO で有意に低下しており (図7B), KO マウスの骨髓中では造血幹細胞の増殖または造血幹細胞からの巨核球分化が正常でないことが類推された。この原因を明らかにするために、KSL 細胞または CFU-MK 細胞の細胞周期を解析した結果、WT と比較して KO の KSL 細胞の BrdU 取り込み率は有意に低下していたが、CFU-MK 細胞においては両者で差はみられなかった (図8)。また、TPO 存在下での c-kit⁺/Lin⁻ 細胞の BrdU 取り込み率も KO で有意に低下していた¹⁵⁾。さらに、KO マウス骨髓内 CD34/KSL 細胞及び CFU-MK 細胞の割合が有意に増加していたにもかかわらず、巨核球の割合に差はみられなかった (data not shown)。このように KO マウスでは造血幹細胞の細胞周期の G1期から S 期への移行が遅延していることから、BIM は巨核球造血において造血前駆細胞レベルでの細胞周期エンタリーを制御する分子であると考えられた¹⁵⁾。過去には、B 細胞において B cell antigen receptor (BCR) により誘導された p27^{kip1} の degradation が WT と比較して *bim* KO で減少していたことから、BIM が p27^{kip1} の degradation を通して細胞周期エンタリーを制御する分子であるという報告もある¹⁷⁾。一方、Nakao らは、PI3 K 阻害剤添加 UT-7/TPO 細胞株及びマウス巨核球で p27^{kip1} の発現が増加することなどを明らかにし、PI3 K/Akt/Foxo3a 経路とその下流の標的分子である

p27^{kip1}が TPO 依存性の巨核球増殖において重要な役割を担っていることを報告している¹⁸⁾。しかしながら、巨核球造血における PI3 K/Akt/Foxo3a 経路と BIM の発現および p27^{kip1} の degradation の分子間相互作用や制御メカニズムについてまだ十分に解明されておらず、大変興味が引かれるところである。

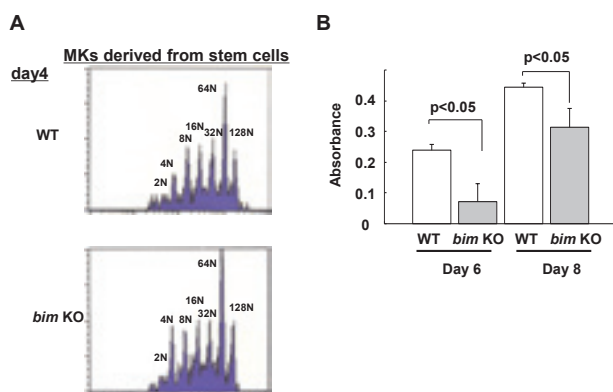


図7 *bim* KO マウスにおける分化・成熟能

A) 5-FU (150mg/kg) を WT 及び *bim* KO マウス腹腔内に投与後、巨核球 ploidy を測定したところ、WT 及び KO マウスで差はみられなかった。

B) WT 及び *bim* KO c-kit⁺/Lin⁻ 細胞の TPO 存在下での増殖能は、KO で有意に低下していた。(文献15より引用改変)

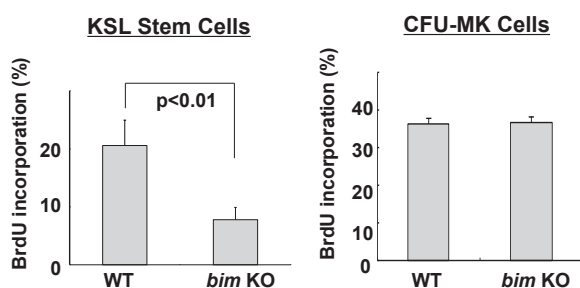


図8 *bim* KO 造血細胞における細胞周期

WT 及び *bim* KO マウス腹腔内に BrdU 1mg を投与後、KSL 細胞または CFU-MK 細胞の細胞周期を測定したところ、KO の KSL 細胞の BrdU 取り込み率は、WT と比較して有意に低下していたが、CFU-MK 細胞においては両者で差は認められなかった。(文献15より引用改変)

5. 血小板の老化とアポトーシス

血小板は、何らかの原因により血管内皮細胞が障害されると、露出したコラーゲンへの接着、

thromboxane A₂などの放出、fibrinogen 受容体である glycoprotein (GP) IIb/IIIa の活性化、microparticle (MP) の放出などに関与する。さらに MP 放出と同時に、scramblase の活性化により細胞膜脂質二重層の非対称性が消失し、内層に局在する phosphatidylserine (PS) が細胞膜表面に暴露 (PS exposure) される¹⁹⁾。この PS 暴露は、血小板による凝固促進活性において重要な役割を担っている。また、アポトーシスに陥った細胞においてもアポトーシスの進行に伴いアポトーシス小体という MP に類似した膜小胞体が放出されること、細胞表面に PS が暴露されていることも知られており¹⁹⁾、血小板活性化または血小板寿命とアポトーシスとの関係に関して多くの研究がなされてきた。一方、血小板の細胞質には BCL-XL, BCL-2などの他に BAK, BAX などの proapoptotic protein があり²⁰⁾、BAK, BAX 欠損では血小板寿命が延長する⁷⁾。また最近、BCL-XL 阻害薬、ABT-737, BCL-2や Bcl-x 阻害薬、ABT-263などが開発され、ある種の造血管腫瘍に対する効果が報告されているものの、血小板減少・血小板寿命の短縮も示されている^{7, 21)}。このように血小板寿命には BCL-XL はじめ BCL-2 ファミリータンパクの存在、さらにはアポトーシス関連タンパクの関与が示されている。

以前より、老化血小板は脾臓で処理され、血小板産生は血中 TPO 濃度の増減により制御されていると考えられてきた。しかし、2015年 Grozovsky らは、TPO 産生臓器である肝臓がシアル酸を喪失した老化血小板のクリアランス機能を有すること、さらには膜貫通型糖蛋白質複合体、Ashwell-Morell 受容体 (AMR) を介した新たな TPO 発現制御機構を報告した²²⁾。肝臓表面には ASGPR1と ASGPR2サブユニットからなる AMR が存在し、脱シアル酸化された糖蛋白質を認識・結合し、その糖蛋白質を除去する役割を担う (図9)²³⁾。血小板においては膜表面の GPIb/IX/V 複合体に N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), galactose, シアル酸がこの順序で結合した状態で存在する²³⁾。また血小板はシアル酸分解酵素 Neu1, Neu3を含有し、循環血液中の血小板が老化した際に血小板表面のシアル酸の分解を行う。その結果、galactose が露出した血小板 (老化血小板) は肝臓の AMR と結合し、処理される²³⁾。さらに老化血小板が AMR に結合すると、肝細胞の JAK2-STAT3がリン酸化され、TPO

mRNA の発現が促進される²²⁾。これらの知見は、新たな血小板クリアランスと血小板産生メカニズムを提唱するものであり、大変意義深いものである。一方、筑波大学消化器外科大河内教授らのグループと筆者は、以前より肝再生における血小板の役割について検討してきた。その結果、血小板と Kupffer 細胞の相互作用が肝再生に重要である可能性を見出した²⁴⁾。さらに Maruyama らは血小板輸血製剤を用いた肝不全患者における臨床研究において肝機能改善効果を報告したが²⁵⁾、TPO 受容体作動薬投与による臨床研究では肝機能改善効果は確認できなかった。この結果は、血小板輸血製剤と TPO 受容体作動薬により増加した血小板には構造または機能に何らかの違いがあることを意味する。また筆者らは保管血小板製剤が脱シアル化されていることも見出している (図10)。AMR を介した老化血小板のクリアランス機構は血小板造血のみならず、肝再生に参与する可能性もあり大変興味深い。

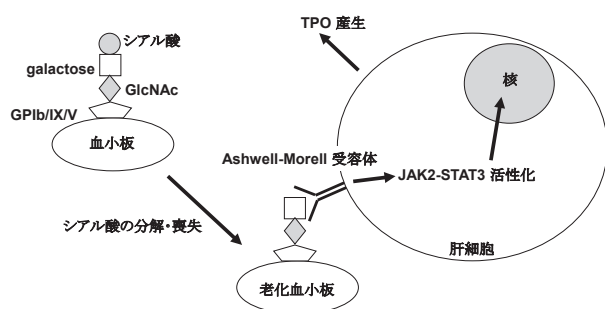


図9 Ashwell-Morell 受容体 (AMR) を介した血小板クリアランス機構

血小板表面のシアル酸の分解・喪失が起こった老化血小板は、肝臓の AMR と結合し、処理される。

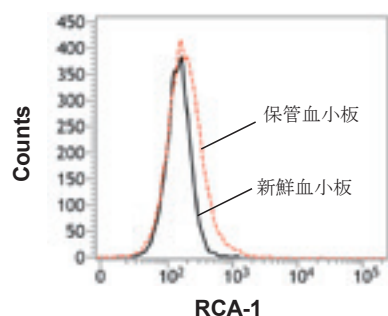


図10 血小板における脱シアル化

新鮮血小板および保管血小板を *Ricinus communis* Agglutinin I (RCA-1) で染色すると、保管血小板で脱シアル化されていることがわかる。

6. おわりに

本総説では、巨核球造血へのアポトーシス関連タンパクの役割について概説した。最近の研究により、caspase がアポトーシスの effector タンパク質であるのみならず、細胞増殖や複製、細胞周期など non-apoptotic function を有していることが明らかになってきたが²⁶⁾、活性化 caspase の基質や caspase 下流のシグナル経路、BCL-XL や BIM 以外のアポトーシス関連タンパクと巨核球造血の関係については未だ十分には解明されていない。また、血小板クリアランスにおける AMR と BCL-2ファミリータンパクの相互作用など不明な点も多く、今後の研究に期待したい。

文献

- 1) Italiano JE Jr, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond : the birth of platelet [review]. J Thromb Haemost 1: 1174-1182, 2003.
- 2) Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis [review]. J Clin Invest 115: 3339-3347, 2005.
- 3) Terui Y, Furukawa Y, Kiuchi J, et al. Bcl-x is a regulatory factor of apoptosis and differentiation in megakaryocytic lineage cells. Exp Hematol 26: 236-244, 1998.
- 4) Kirito K, Watanabe T, Sawada K, et al. Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways. J Biol Chem 277: 8329-8337, 2002.
- 5) Kozuma Y, Kojima H, Yuki S, et al. Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. J Thromb Haemost 5: 1274-1282, 2007.
- 6) Sanz C, Benet I, Richard C, et al. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. Exp Hematol 29: 728-735, 2001.
- 7) Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al.

- Programmed anuclear cell death delimits platelets life span. *Cell* 128: 1173-1186, 2007.
- 8) Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, et al. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like protease. *Oncogene* 17: 1295-1304, 1998.
 - 9) Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J Biol Chem* 276: 34473-34479, 2001.
 - 10) Zauli G, Vitale M, Falcieri E, et al. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 90: 2234-2243, 1997.
 - 11) de Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 100: 1310-1317, 2002.
 - 12) Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, et al. Increased peripheral platelet destruction and caspase-3-independent programmed cell death of bone marrow megakaryocytes in myelodysplastic patients. *Blood* 105: 3472-3479, 2005.
 - 13) Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193: 247-254, 2001.
 - 14) Kozuma Y, Yuki S, Ninomiya H, et al. Caspase activation is involved in early megakaryocyte differentiation but not in platelet production from megakaryocytes. *Leukemia* 23: 1080-1086, 2009.
 - 15) Kozuma Y, Nonomiya H, Murata S, et al. The pro-apoptotic BH3-only protein Bim regulates cell cycle progression of hematopoietic progenitors during megakaryopoiesis. *J Thromb Haemost* 8: 1088-1097, 2010.
 - 16) Li J, Kuter DJ. The end is just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release. *Int J Hematol* 74: 365-374, 2001.
 - 17) Craxton A, Draves KE, Clark EA. Bim regulates BCR-induced entry of B cells into the cell cycle. *Eur J Immunol* 37: 2715-2722, 2007.
 - 18) Nakao T, Geddis AE, Fox NE, et al. PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27^{Kip1}. *Cell Cycle* 15: 257-266, 2008.
 - 19) Kojima H, Newton-Nash D, Weiss HJ, et al. Production and characterization by impaired transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome. *J Clin Invest* 94: 2237-2244, 1994.
 - 20) Kile BT. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol* 165: 217-226, 2014.
 - 21) Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK, et al. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death Differ* 14: 943-951, 2007.
 - 22) Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med* 21: 47-54, 2015.
 - 23) Grozovsky R, Giannini S, Falet H, et al. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood* 126: 1877-1884, 2015.
 - 24) Takahashi K, Kozuma Y, Suzuki H, et al. Human platelets promote liver regeneration with Kupffer cells in SCID mice. *J Surg Res* 180: 62-72, 2013.
 - 25) Maruyama T, Murata S, Takahashi K, et al. Platelet transfusion improves liver function in patients with chronic liver disease and cirrhosis. *Tohoku J Exp Med* 229: 213-220, 2013.
 - 26) Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, et al. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14: 44-55, 2007.

(令和元年11月28日受理)

The role of apoptosis-related proteins during megakaryopoiesis.

Yukinori KOZUMA, Ippei NOBORUO

Abstract

Megakaryocytes differentiate from hematopoietic stem cells under the control of a lineage-specific cytokine, thrombopoietin(TPO). Final stage of the differentiation is characterized by platelet release from the ends of long thin cytoplasmic processes called proplatelets. Previous reports have suggested that cellular apoptosis is involved in the process of platelet production because cultured mature megakaryocytes in comparison with immature cells are prone to apoptosis even in the presence of TPO. Here, we overview how an apoptotic process is involved in megakaryopoiesis.