

論文の内容の要旨

論文題目：

造血系細胞におけるアポトーシス制御因子による新たな細胞周期制御機構

指導教官：

谷口 維紹 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年進学

医学博士後期課程

病因病理学専攻

大塚 秀文

造血系細胞の増殖は、細胞・細胞間のシグナルやサイトカインと呼ばれる液性因子によって厳密に制御されている。造血系細胞をサイトカイン非存在下で培養すると、そのほとんどが静止期（G1期）にあって増殖しない。この状態から増殖因子である特定のサイトカイン刺激を受けると、細胞周期はG1期からDNA複製期（S期）へと移行し、間期（G2期）を経て分裂期（M期）へと秩序正しく進行する。一方で、これらの細胞をサイトカイン非存在下で培養し続けるとアポトーシスの誘導が認められサイトカインは造血系細胞の生存因子としても機能する。

サイトカイン刺激に伴って造血系細胞の細胞周期が進行する過程で、最初に *c-fos/c-jun*、*c-myc* 等の初期応答遺伝子、及び *cyclin* 等の細胞周期制御遺伝子の発現誘導が起こり、これらの遺伝子発現誘導が細胞周期が進行に重要であることが知られている。*c-Myc* は転写因子として機能し、*cdc25A* や *cyclin E* 等の細胞周期制御遺伝子の発現を誘導することでG1期からS期への移行に関与する事が知られている。細胞周期進行に重要な *cyclin* のうち、*cyclin C*、*D*、*E* の3つ（G1 *cyclin*）はG1期からS期への移行に関与している。*cyclin D* は主に *CDK4* と *CDK6* と複合体を形成し、この複合体は、*Retinoblastoma* 癌抑制遺伝子産物（*Rb*）をリン酸化する。このリン酸化はG1期からS期への移行の際に必要な条件だが、十分ではない。完全にS期への移行を進行させるためには、*cyclin D* 群の発現に引き続いて発現してくる *cyclin E* と *CDK2* との複合体である、*cyclin E/CDK* 複合体による *Rb* の更なるリン酸化が必要である。こ

のように、*cyclin D/E* は G1 期から S 期への移行を制御すると考えられている。

私の所属する研究グループは、これまでマウスの IL-3 依存性造血系細胞株 BAF-B03 細胞 (BAF 細胞) を用いて、IL-2 による細胞増殖誘導に関わるシグナル伝達機構の解析を行ってきた。BAF 細胞は機能的 IL-2 受容体 (IL-2R) を構成する IL-2R α 鎖及び IL-2R γ c鎖を発現しているが、IL-2R β c鎖は発現していない。BAF 細胞に IL-2R β c鎖を恒常的に発現させた F7 細胞は、IL-2 に応答して細胞増殖の誘導が認められ、IL-2R β c鎖の変異体をこの細胞に発現させることで、細胞増殖に重要な IL-2R β c鎖の細胞内ドメインの解析を行ってきた。この解析の流れのなかで、BAF 由来細胞ではサイトカインによる細胞増殖誘導におけるシグナル伝達に、*c-myc* の発現誘導に至る経路が重要であることを見出した。即ち、BAF 細胞にヒト EGF 受容体を発現させた BER2 細胞を樹立したところ、IL-2R の場合と異なり EGF 刺激をしても増殖の進行が認められず、*c-myc* の発現誘導も認められなかった。そこで、BER2 細胞に *c-Myc* を恒常的に発現する BM 細胞を樹立し EGF で刺激すると、EGF に応答して細胞増殖の誘導が認められるようになった。このことから、BAF 細胞では IL-2 や IL-3 による *c-myc* の発現誘導は細胞増殖の誘導に重要であることが推測された。

多くの造血系の細胞はサイトカインを除去することによりアポトーシスが誘導されること、このアポトーシスはアポトーシス抑制因子である *Bcl-2* や *Bcl-xL* によって抑制されることが知られている。しかし一方で、細胞増殖における *Bcl-2* 及びその関連因子の役割及びその分子機構に関しては、全く明らかではない。BER2 細胞では EGF 刺激によって *bcl-2* 及び *bcl-xL* 遺伝子の発現誘導が認めれない。そこで BER2 細胞に *bcl-2* を恒常的に発現する BB 細胞を樹立した結果、上記の *c-myc* の場合と同様に、EGF 依存性に細胞増殖の誘導が認められた。この結果から、*Bcl-2* は BAF 由来細胞の増殖の誘導に関わることが示唆された。更に、BER2 細胞に *c-Myc* と *Bcl-2* を恒常的に発現する細胞株を樹立すると IL-3 非存在下で増殖するようになることから、*bcl-2* の転写誘導に至る経路も IL-2/IL-3 による BAF 由来細胞の増殖誘導に重要であり、*Bcl-2* は *c-Myc* と協調して増殖を促すことが推測された。以上の結果を基に、私は *Bcl-2* による細胞周期の制御を明らかにする目的で、*Bcl-2* 及びその関連因子の *cyclin* の発現における役割を検討した。

まず F7 細胞を用いて G1 *cyclin* mRNA の発現を調べた。IL-2 刺激後早期 (30 分~1 時間で) に *cyclinD3* mRNA の発現が認められ、これに遅れて他の G1

cyclin の誘導が認められた。次に、Bcl-2 や c-Myc の恒常的発現が細胞周期制御因子の発現に影響を及ぼすかを検討するため、BER2 細胞、BB 細胞及び BM 細胞を用いて、IL-3 除去後の cyclin mRNA の発現の変動を調べた。BER2 細胞及び BM 細胞ではすべての G1 cyclin mRNA の発現が認められなくなるのに対して、BB 細胞では cyclin D3 のみが IL-3 除去後 12 時間の段階でも、約 80% 程度にしか発現の低下が認められなかった。更に、この mRNA の発現が、cyclin D3 タンパク質の発現にも影響するかを確認したところ、BB 細胞で同様の条件で実験を行ったところ cyclin D3 の発現の低下が認められなかった。これより、Bcl-2 を介して cyclin D3 mRNA の発現を調節する機構が存在することが推測された。

次に、この現象が BAF 由来細胞にのみ見られる現象かどうかを調べるために別のマウスの IL-3 依存型細胞である FDC 細胞に Bcl-2 を強制発現させた FDC-B 細胞を用いて検討した。その結果、FDC 細胞では、IL-3 除去後 18 時間、21 時間で cyclin C, D2, D3, E mRNA の低下が認められるのに対して、FDC-B 細胞では cyclin D3 mRNA のみ発現の低下が僅かにしか認められなかった。この結果から、BAF 由来細胞で見られた現象は、細胞種特異的なものではないと考えられた。

次に、Bcl-2 による cyclin D3 mRNA の発現維持が、*cyclin D3* 遺伝子の転写誘導によるのか、mRNA の安定性の影響によるのかを検討するために BER2 細胞及び BB 細胞のそれぞれの核を単離し、核ランオンアッセイを行った。その結果、IL-3 除去により BER2 細胞、BB 細胞いずれにおいても *cyclin D2, E* の転写量は著明に減少するのに対して、*cyclin D1, D3* の転写量の減少は両細胞とも僅かであり、Bcl-2 の発現による cyclin D3 mRNA の転写量の変動は認められなかった。このことから、Bcl-2 は cyclin D3 mRNA の転写には関係せず、mRNA の安定性に寄与していることが推測された。

更に BER2 細胞及び BB 細胞の培地から IL-3 除去後 12 時間の細胞を回収し、細胞抽出液での CDK4 及び CDK6 のキナーゼ活性を Rb を基質として測定した結果、IL-3 除去後 12 時間の BER2 細胞では双方の活性が低下したのに対して、BB 細胞では CDK6 のキナーゼ活性が 12 時間後でも維持されていた。このことから Bcl-2 は、cyclin D3 mRNA の安定性を介して cyclin D3/CDK6 の活性を制御することが示された。

Bcl-2 は、cyclin D3 mRNA の安定性を上昇させることで cyclin D3/CDK6

の活性を維持すると考えられることから Bcl-2 の下流に cyclin D3 が機能している可能性がある。そこで cyclin D3 と c-Myc ないし Bcl-2 を BER2 細胞に強制発現させた細胞 (BMD 細胞及び BBD 細胞) を作製して増殖の影響について調べた。興味あることに、IL-3 を除去しても BMD 細胞は増殖を続け、cyclin D3 は、c-Myc と協調して細胞増殖を誘導することが示された。一方で、Bcl-2 と cyclin D3 を恒常的に発現する BBD 細胞ではこの現象が認められないことから、cyclin D3 は Bcl-2 の下流で働く細胞増殖制御の標的因子として機能していることが示唆された。

更に cyclin D3 mRNA 安定化機構が、Bcl-2 固有の現象かどうかを調べるため、Bcl-2 ファミリーの一つであり、IL-2 刺激によって発現誘導される Bcl-xL を強制発現させた BX 細胞を樹立し解析したところ、BX 細胞でも IL-3 非存在下での cyclin D3 mRNA の発現維持が認められた。同時に、c-Myc を BX 細胞に強制発現させた BXM 細胞が IL-3 非存在下で増殖を続けることから、Bcl-2 及び Bcl-xL 共通のメカニズムとして cyclin D3 mRNA の安定性に関与することが示唆された。この機構に関しては、現在のところ完全には説明できないが、bcl-2 ファミリーの下流のアポトーシス実行因子である caspase 阻害因子、Cowpox virus 由来の産物である *crmA* を高発現する BER2 細胞 (BC 細胞) では、IL-3 除去後の cyclin D3 mRNA の発現の低下が部分的にしか認められなかった。この結果から、その機構の一つとして、IL-3 除去による caspase の活性化を Bcl-2 や Bcl-xL がミトコンドリア上で抑制することにより、caspase 感受性の mRNA 安定化機構が (その機構の一部として) 働いていることが推測された。

今回の研究で、造血系細胞のサイトカインによる細胞増殖誘導において、Bcl-2 や Bcl-xL が cyclin D3 を介して制御をしているという新しい機構を見出した。この結果は、今後の Bcl-2 ファミリー因子による細胞周期の制御機構において新しい方向性を示す情報を提供するものと考えられる。