

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Overexpression of TSC-22 suppresses the growth and accelerates the differentiation of leukemia cell lines

TSC-22 の白血病細胞に対する増殖抑制及び分化促進効果

指導教員 北村俊雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 呂 洋

【背景・目的】

Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3) は、クラス III 受容体型チロシンキナーゼファミリーに属し、主に骨髄系とリンパ系の前駆細胞に発現する。一方、そのリガンドである FL は骨髄やその他の臓器に発現し、Flt3 に結合することで造血細胞に増殖や生存のシグナルを伝達する。Flt3 の活性化型変異は急性骨髄性白血病 (AML) において最も高頻度 (約 30%) に認められる遺伝子変異で、膜貫通直下の傍膜領域における internal tandem duplication (Flt3-ITD) とキナーゼ領域の activation loop における点突然変異 (Flt3-D835) に大別される。Flt3-ITD と Flt3-D835 の変異はともにリガンド非依存的な活性化とそれに伴う異常増殖や抗アポトーシス作用を示し、白血病の発生・進展に関与していると考えられる。特に、Flt3-ITD は AML の予後不良因子として知られているが、その機序は十分に解明されていない。我々は、Flt3-ITD および Flt3-D835 を Ba/F3

細胞に強制発現することで誘導される mRNA をマイクロアレイ解析で比較検討した結果、TGF- β の標的遺伝子である TSC-22 に注目した。なぜならば、F1t3-D835 により増加する TSC-22 の発現量が F1t3-ITD により顕著に抑制されていたからである。TSC-22 は様々な細胞の分化や増殖に関与することが示されているが、血球細胞における機能に関しては不明のままである。我々は TSC-22 を白血病細胞に過剰発現させる実験系を利用し、TSC-22 が白血病の発生・進展にどのように関与しているかを分子レベルで解明することを目的として本解析を行った。

【方法と結果】

まず、血球細胞における F1t3 の変異がマウスに及ぼす影響を確認するため、変異 F1t3 を導入した Ba/F3 細胞をマウスの尾静脈から注入し移植した。その結果、F1t3-ITD 発現細胞が移植されたマウスは、8-9 週の平均潜伏期を経て致死性の造血系疾患になった。一方、F1t3-D835 発現細胞が移植されたマウスは、その 60% に観察期間を通して異常が認められず、より長く生存することが示された。我々は、F1t3-ITD または F1t3-D835 によって誘導される遺伝子発現パターンの違いの中に、白血病の表現型の相違を生み出す原因が存在するかもしれないと考え、F1t3-ITD または F1t3-D835 を発現する Ba/F3 細胞の RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、両者で大きく発現量の異なる複数の遺伝子を同定した。F1t3-D835 により発現が増強する遺伝子の中に、TGF- β の標的遺伝子である TSC-22 が認められた。TSC-22 がアポトーシスの誘導に関与する腫瘍抑制遺伝子であることは知られているが、造血細胞における機能は報告されていなかったため、次に TSC-22 の発現量の調節と白血病の発生・進展がどのように関連するかを明らかにすることにした。

最初に、Ba/F3 と 32D 細胞株を使用して、real time RT-PCR とウェスタンブロットを行い、TSC-22 の mRNA および蛋白質の発現量が、F1t3-ITD 発現細胞と比較して F1t3-D835 発現細胞において増強していることを確認した。F1t3 の下流では Ras/ERK と STAT5 が強く活性化されるので、この二つの経路が TSC-22 の発現にどのように関与するかを調べた。Ba/F3 細胞に恒常的活性型 STAT5A (STAT5A1*6) あるいは恒常的活性型 H-Ras (H-RasG12V) を発現し同様の実験を行ったところ、TSC-22 の発現量は STAT5A1*6 により抑制され、H-Ras-G12V により増加することが証明された。さらに、H-Ras あるいは c-Raf の発現を IPTG

あるいは β -エストラジオールにより誘導する系を利用して、TSC-22 の発現量の変化を調べたところ、ERK の活性化に一致して TSC-22 の発現量の増加が誘導された。これらの結果より、TSC-22 の発現は Ras/ERK 経路の活性化により増加し、STAT5 経路の活性化により抑制されることを示唆された。

次に、TSC-22 が細胞増殖に及ぼす影響を評価するために、TSC-22 を白血病細胞株 (32D、WEHI、U937) に導入し、コントロール細胞との比較を行った。その結果、TSC-22 を過剰発現させると細胞増殖が有意に抑制されることが Luminescent Cell Viability 分析により示された。また、TSC-22 の発現量が抑制されている Flt3-ITD 発現細胞に TSC-22 を強制発現させるとその増殖が抑えられることも示された。

また、細胞分化の停止は細胞増殖を促進させる白血病細胞の特徴の 1 つであるので、TSC-22 が血球分化に及ぼす影響について調べた。G-CSF は骨髓系前駆細胞 32D の好中球への分化促進作用をもつことが知られているので、この実験系を最初に利用した。TSC-22 の過剰発現は、好中球への分化に影響を及ぼしたが、32D 細胞及び Flt3-ITD を発現する 32D 細胞は、TSC-22 の強制発現によってプラスチックプレートに接着し、単球/マクロファージのような spreading を示した。FACS で検討した結果では、CD11b の発現レベルがわずかに増加した以外、その他の好中球または単球/マクロファージ表面マーカーやいくつかのインテグリンの発現レベルに変化は認められなかった。これらの結果は、TSC-22 が好中球への分化には大きな影響を及ぼさないが、単球系への分化に関与している可能性を示唆していた。

そこで、白血病細胞の単球への分化に、TSC-22 が果たす役割を明確にするために、分化誘導試薬を使用した実験を試みた。PMA により 4 日間の分化誘導処理を行うと U937 細胞は単球系へ分化誘導するが、TSC-22 を発現する U937 細胞ではより著明な分化の促進とそれに伴う増殖の抑制が認められた。顕微鏡を用いたギムザ染色で、広い細胞質、低い N/C 比、空胞形成を成熟単球の指標として評価したところ、TSC-22 を発現する U937 細胞はより早い成熟単球への分化を示し、FACS 解析ではそれに呼応して、CD11b, CD14, CD80, HLA-DR の発現増強が認められた。また、PMA あるいは Vit. D3 による HL-60 細胞の単球様細胞への分化誘導に関しても、TSC-22 は同様の分化促進効果を及ぼした。これらの結果は、TSC-22 の強制発現が分化促進薬と協調して白血病細胞を単球系へ分化させることを示している。

【考察】

我々は現時点で TSC-22 をノックダウンさせる siRNA を作り出すことができなかったため、TSC-22 の発現量低下が白血病細胞の増殖を促進させるかどうかには答えることが難しい。しかし、今回の実験結果から TSC-22 の強制発現が比較的発現量の低い白血病細胞の増殖を抑えることは確かであり、その機序としては成熟単球への分化促進が一定の役割を演じていると考えられる。白血病の発生に対する TSC-22 の影響を真に評価するためには、TSC-22 ノックアウトマウスを作製し、その骨髄細胞に Flt3 変異体を発現させ移植する実験が不可欠であると考えられる。今後、白血病患者の臨床検体を利用して、どのような種類の白血病で TSC-22 の発現量が高いか、予後との相関はどうかを調べる必要がある。分化誘導療法は APL に対する ATRA のように白血病治療の重要な一角を担っている。近年の研究は、ATRA と G-CSF の併用がさらに白血病細胞の分化誘導を促進することを報告しているため、血球分化を促進する分子の同定と、さらにその分子の発現を誘導する薬の開発は、新しい白血病治療法を生み出すと考えられる。TSC-22 は、新規の白血病抑制分子あるいは分化誘導分子である可能性を秘めており、さらなる研究が期待される。

【結論】

TSC-22 の発現は、Flt3-D835 の下流、特に Ras/ERK の活性化によって増強し、一方、STAT5A の活性化により抑制される。TSC-22 の強制発現は白血病細胞の増殖を抑える。特に、分化誘導試薬との組合せによって白血病細胞の単球系への分化が促進される。今後、TSC-22 は白血病治療の新たな標的分子となる可能性を秘めている。