

## 論文の内容の要旨

論文題目 Macro-domain containing protein LRP16 augments resistance to DNA damages in hematopoietic progenitors and leukemic cells.  
(LRP16 は造血細胞と白血病細胞において DNA 傷害抵抗性を増強する)

氏名 成川 研介

### 【はじめに】

悪性腫瘍治療において、腫瘍の根絶と治療抵抗性の解除は大きな課題でありまだ克服されていない。その突破口の手がかりとして、腫瘍の予後不良因子は重要な位置を占める。中でも、高発現を特徴とする遺伝子の制御機構の解明は分子標的治療の手がかりとして有用性が高い。LRP16(leukemia related protein 16)は、MacroH2A1.1 を始めとしたマクロドメインファミリーに属し、大腸がん、胃がん、乳がん、前立腺がん、白血病に高発現し、患者予後を規定することが知られている。白血病においては、細胞株で LRP16 過剰発現の増殖促進作用が報告されているだけで、詳細な解析はなされていない。

私はこの研究で、造血細胞および白血病における LRP16 の機能を細胞株により詳細に解析した。レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いて、LRP16 過剰発現及び発現抑制を行い、造血前駆細胞株に対して LRP16 過剰発現が Ara-C 感受性、放射線感受性を減弱させること、LRP16 発現抑制により Ara-C 感受性が増強することを明らかにした。また、リンパ腫/白血病細胞株に対して、LRP16 発現抑制が細胞増殖抑制及び Ara-C 感受性増強を認めた。これより LRP16 発現抑制の白血病への効果が推測される。

### 【材料および方法】

#### LRP16 クローニング

野生型マウス骨髄細胞から、c-kit 陽性細胞（造血前駆細胞）を AUTO MACS にてソートしたのち、RNA 抽出・逆転写反応を行い作製した前駆細胞 cDNA より、PCR にてマウス LRP16 cDNA をクローニングした。

#### レトロウイルスベクターとその感染方法

LRP16 cDNA を pGCDNsam-IRES-GFP レトロウイルスベクターに挿入した。このベクターを PLAT-E パッケージング細胞にトランスフェクションしてレトロウイルスを産生させた。レトロネクチンにより培養皿にレトロウイルスを張り付け、血球細胞株を添加し

てレトロウイルスの感染つまり遺伝子導入を行った。

### **LRP16 ノックダウンベクターの作成と感染方法**

LRP16 を標的としたショートヘアピン RNA(sh RNA)を作製し、pSiren ZsGreen レトロウイルスベクターに挿入、PLAT-E パッケージング細胞にトランスフェクションしてレトロウイルスを産生させた。細胞株への shRNA 導入は上記と同じくレトロネクチンを用いて行い、shLRP16 細胞株を作製した。

### **定量 PCR**

LRP16 もしくは shLRP16 を導入した各種細胞株から RNA 抽出と逆転写反応を行い、各細胞由来 cDNA を作製した。その cDNA より Light Cycler を用いて定量 PCR を行い、各遺伝子発現量を算出した。

### **【結果】**

#### **造血細胞における LRP16 の発現様式**

血球細胞における LRP16 発現様式を明らかにするため、未分化血球から分化血球まで各分化段階での LRP16 遺伝子発現を定量 PCR で解析し、未分化な造血幹/前駆細胞から骨髓球系、リンパ球系と分化した血球まで広く発現が認められた。

#### **LRP16 過剰発現 Ba/F3 の表現型**

マウス B 前駆細胞由来細胞株 Ba/F3 にレトロウイルスを用いて LRP16 遺伝子を導入した。LRP16 過剰発現 Ba/F3 は正常対照 Ba/F3 と同様の IL-3 依存性の細胞増殖を認めた。次に、抗がん剤 (Ara-C、VP-16) 添加や放射線照射を同様の系に行い、LRP16 過剰発現群で Ara-C 抵抗性および放射線抵抗性の細胞増殖を認めた。(図 1A(a)-(c)) この特徴は、Annexin V 陽性細胞の減少から LRP16 高発現による抗アポトーシス作用と考えられた。(図 1B)

#### **LRP16 発現抑制による Ara-C 感受性増強効果**

前述のデータからリンパ球系細胞で LRP16 発現が高いため、Ba/F3 での内因性 LRP16 の抑制効果を検証した。LRP16 発現抑制 Ba/F3 は定常状態において正常対照と同様の細胞増殖を認めたが、Ara-C 添加による明らかな増殖抑制を認めた。(図 2A(a)(b)) これは、Annexin V 陽性細胞の増加、Bcl2 の発現低下、Bclxl、Rad54、Xrcc2 の発現低下傾向で特徴づけられ (図 2B)、LRP16 発現抑制によるアポトーシス亢進作用と考えられた。

#### **L5178Y 細胞における LRP16 発現抑制の細胞増殖抑制効果**

LRP16 発現抑制の白血病に対する効果を検証するため、複数マウス白血病細胞株におけ

る LRP16 発現を測定し、マウスリンパ腫/白血病細胞株 L5178Y が LRP16 高発現株であることを明らかにした。そこで、LRP16 発現抑制 L5178Y を作製し、定常状態での増殖抑制を認めた。Ara-C 添加においても増殖抑制効果は明らかであった。(図 3)

### 【考察】

今回、私は LRP16 遺伝子が造血細胞増殖に及ぼす影響を造血前駆細胞株、白血病細胞株で検証した。LRP16 高発現が Ara-C、放射線抵抗性を付与し、発現抑制が細胞増殖抑制と Ara-C 感受性増強に作用することを明らかにし、アポトーシス経路及び DNA 修復経路の関与が示唆された。特にリンパ腫/白血病細胞株 L5178Y においては、細胞増殖と Ara-C 感受性双方に LRP16 が関与することを明らかにした。

この結果より、LRP16 高発現腫瘍に対して、既存の抗がん剤治療と LRP16 発現抑制の組み合わせが奏功することが考えられる。また、白血病や固形腫瘍での LRP16 発現が正常血球より明らかに高いことから、その発現抑制による血液毒性も低いことが予想される。マクロドメインはポリ ADP リボースと協調して DNA 傷害の修復、転写制御に関与するとされているが、未解明な部分が多い。LRP16 では、前立腺がんにおけるアントロゲン受容体、乳がんにおけるエストロゲン受容体の転写制御でのコファクターであり、発現細胞特異的なパートナーとの協調が重要である可能性が高い。白血病（特にリンパ球系）におけるパートナーを同定することは LRP16 高発現の解除につながると考えられる。

図1A

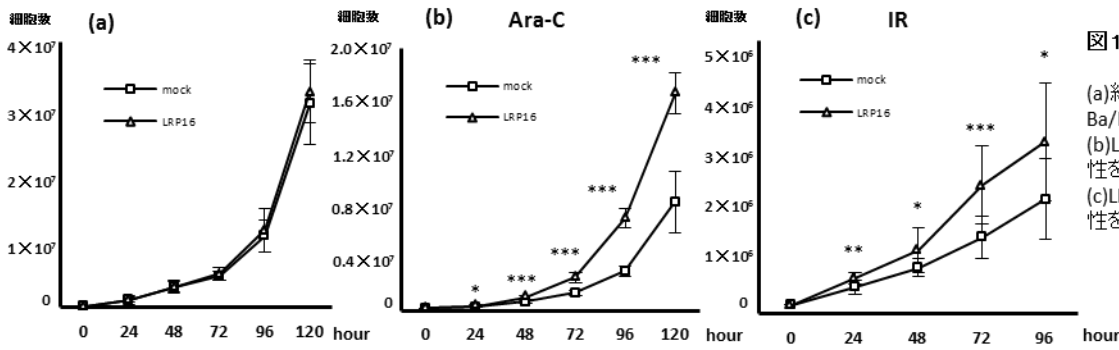


図1A LRP16過剰発現Ba/F3の細胞数

(a)細胞数はmockとLRP16過剰発現Ba/F3との間で差を認めない(n=3)。  
 (b)LRP16過剰発現Ba/F3はAra-C抵抗性を示す(n=3)。  
 (c)LRP16過剰発現Ba/F3は放射線抵抗性を示す(n=3)。

\*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001  
 Ara-C:シタラビン  
 IR: Ionizing radiation

図1B

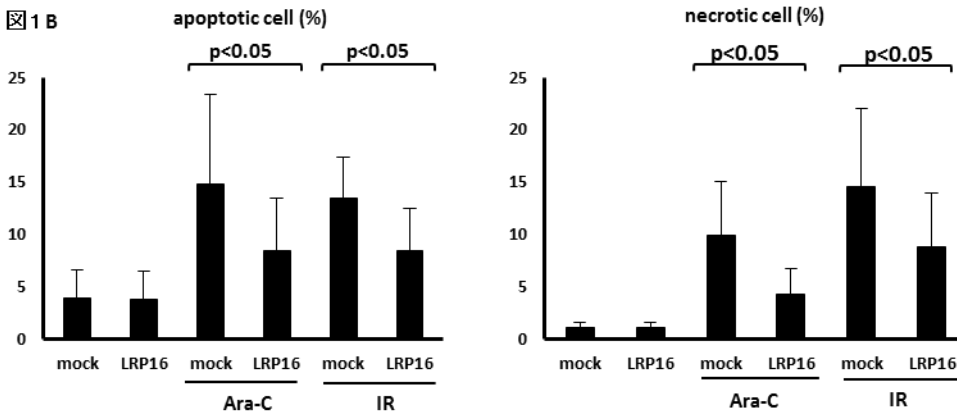


図1B Ara-C添加、放射線照射時のLRP16過剰発現Ba/F3における死細胞の比率

Ara-C添加、放射線照射後のアポトーシス、ネクローシスした細胞の比率はLRP16過剰発現Ba/F3で有意に少ない(n=3)。

図2A

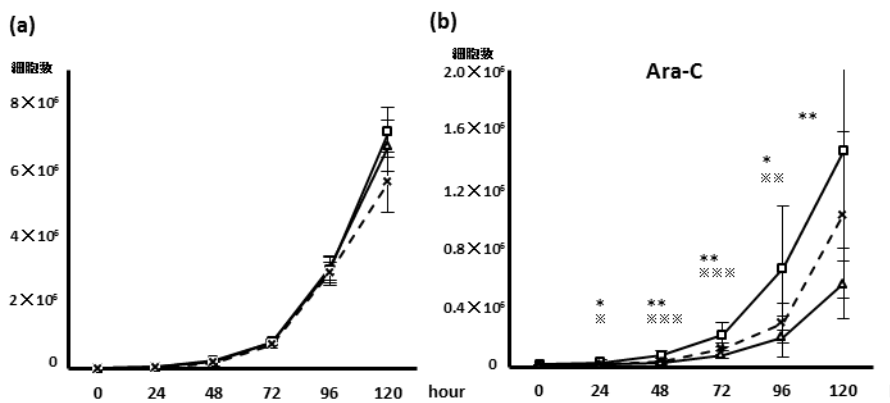


図2A LRP16発現抑制Ba/F3の細胞数

(a)細胞数はcontrolとLRP16発現抑制Ba/F3との間で差を認めない(n=3)。  
 (b)LRP16発現抑制Ba/F3のAra-Cに対する感受性が有意に上昇する(n=3)。

control  
 sh1 \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001  
 sh2 \*p<0.05 \*\*p<0.01

図2B

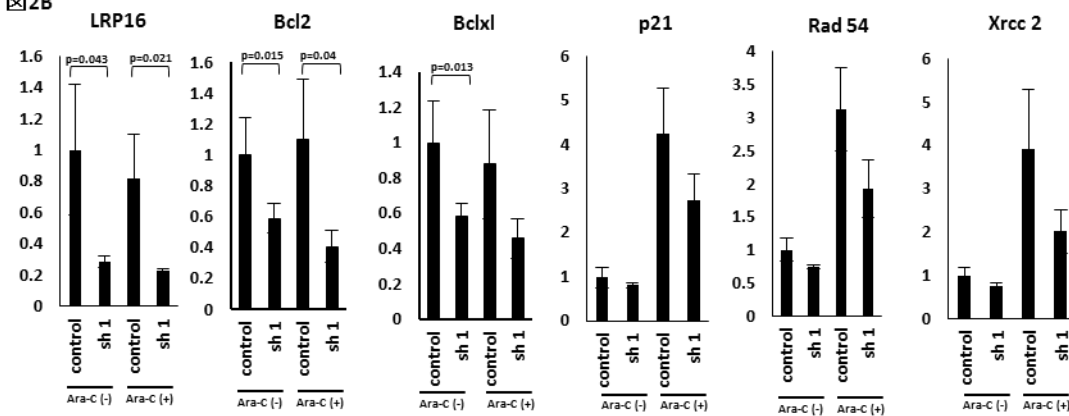


図2B LRP16発現抑制Ba/F3の遺伝子発現

LRP16発現抑制Ba/F3ではBcl2の発現が有意に低下し、DNA修復遺伝子の発現が抑制される傾向にある(n=3)。

図3

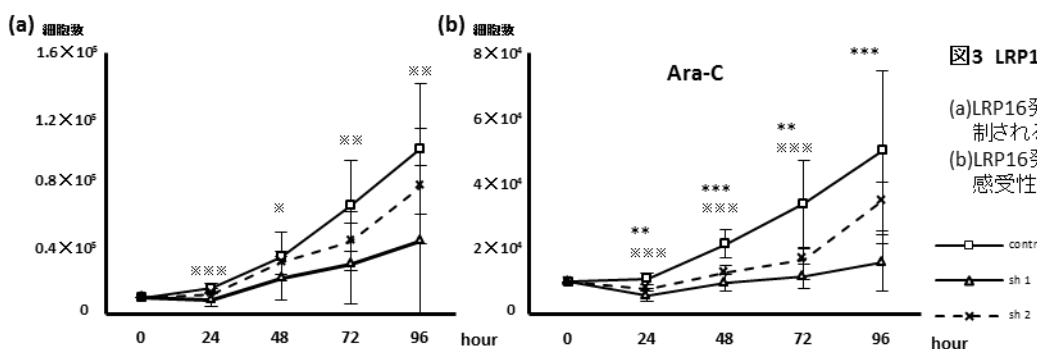


図3 LRP16発現抑制L5178Yの細胞数

(a)LRP16発現抑制L5178Yでは細胞増殖が抑制される傾向がある(n=3)。  
 (b)LRP16発現抑制L5178YのAra-Cに対する感受性が有意に上昇する(n=3)。

sh1 \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001  
 sh2 \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001