

学位論文題名

ヒト赤白血病細胞株 (K562) の赤芽球系分化誘導過程に
おける鉄関連蛋白の動態に関する研究

学位論文内容の要旨

緒言

鉄は細胞の増殖、分化に必須の要素であるが、過剰の鉄は致命的細胞障害をもたらすことも事実である。そのために細胞内鉄濃度は鉄貯蔵蛋白であるフェリチン(Ft)と鉄搬送蛋白であるトランスフェリンとによって厳格に規定されている。さらに、近年になってFt mRNAの5' untranslated region (UTR)、トランスフェリン受容体 (TfR) mRNAの3'UTRにIron Responsive Elements (IRE) と呼ばれるステムループ構造の存在が明らかとなり、このIREに細胞質内蛋白であるIRE-binding protein (IRE-BP) が結合または解離することによって両mRNAの翻訳が調節され、細胞内鉄濃度が一定に保たれていることが解明されている。しかし、このIRE/IRE-BP相互作用の細胞分化における役割については、現在のところ、明らかではない。そこで本研究においてはヒト赤白血病細胞株であるK562の赤芽球系分化誘導過程におけるFt、TfR、IRE-BPのmRNAの発現量およびIRE-BPのIREに対する結合親和性の経時的変化を比較検討した。さらに培養液中に過剰の鉄、あるいは鉄キレート剤を加えた状態で同様の解析を行って検討した。

方法

1)細胞培養および分化誘導

K562を10%FBS含有RPMI1640培地中で培養し、対数増殖期に酪酸ナトリウムを終濃度1mMになるように加えて、さらに4日間培養した。分化誘導の判定のためにBenzidine染色と、Oxyhemoglobin法による細胞内ヘモグロビン濃度の測定を行った。

2)細胞表面抗原の解析

酪酸ナトリウム添加後のK562を経時的に回収し、Flow cytometry法によって細胞表面のGlycophorinA抗原、TfR抗原の陽性率の変動を解析した。

3)mRNAの発現量の解析

酪酸ナトリウム添加後、経時的に細胞を回収し、RT-PCR法を用いてTfR、Ft、IRE-BPのmRNAの発現量を半定量的に比較検討し

た。同時に β -Actinを増幅し、内部標準とした。

4) Gel Retardation Assay

IRE-BPのIREに対する結合親和性を検討するためにGel Retardation Assayを行った。すなわち、 ^{32}P で標識したIRE transcriptを合成し、経時的に回収したK562から抽出したcytoplasmic lysateと混合して室温で30分間反応させた後、4% polyacrylamide gelにて電気泳動を行い、オートラジオグラフィーで解析した。

5) 鉄または鉄キレート剤の添加

培養液中の鉄濃度の影響を検討するために酪酸ナトリウム添加と同時に鉄としてHolo Transferrin(Tf)を終濃度 $100\mu\text{g/ml}$ になるように添加した細胞と鉄キレート剤であるメシル酸デフェロキサミン(DFX)を終濃度 $60\mu\text{M}$ になるように添加した細胞について同様の解析を行った。

結果および考案

本研究ではK562に酪酸ナトリウムを添加することによりヘモグロビン合成の亢進と増殖抑制がおこることを確認した。Flow cytometryによる検討では細胞表面Glycophorin A抗原陽性率の増加が認められ、K562の赤芽球への分化を示唆する結果であった。一方、TfR抗原陽性率の変動は認められなかった。この点については、K562は強い増殖能を有しており、最初からTfR抗原陽性率が高く、そのために分化を誘導してもFlow cytometryによる測定上、その陽性率に変動が認められ難かったと考えられた。

RT-PCR法での検討ではTfR mRNAの発現量は初期にいったん低下し、再度上昇を認めるものの酪酸ナトリウム添加前の発現量に比較して亢進は認められなかった。TfR mRNAの発現が亢進しなかった理由として、K562は増殖能が強いために当初より鉄要求性が高く、本実験における条件下ではTfRの生合成を高める必要がなかったのではないかと推測された。Gel retardation assayでは12時間後をピークとしたIRE-BPの結合親和性増強が認められた。この増強はTfR mRNAの安定性を高めることにより、24時間以降の細胞でTfR mRNAの発現を回復させたものと考えられた。

次に、酪酸ナトリウムと同時にTfを添加したK562で検討を行った。分化に関しては酪酸ナトリウムを単独で添加した細胞と同程度のBenzidine陽性率が認められたが増殖については鉄自体の細胞毒性に基づくと考えられる、より強い抑制が認められた。RT-PCRではTfR mRNAの発現が3~48時間の細胞で抑制されていることが認められた。この細胞では多量の鉄の供給が得られており、同時に増殖抑制がより強くかかっているために鉄の要求性が、さらに低くなってこの抑制が生じたと推測された。一方、IRE-BPの結合親和性は48~96時間後に著明な増強を認めた。この増強は96時間後のTfR mRNAの発現の回復に関与した変化であると考えられた。

さらに酪酸ナトリウムと同時にDFXを添加したK562で検討したが、DFXの添加によって鉄の供給が低下したためにK562の増殖、分化はともに抑制された。RT-PCRではTfR mRNAの発現は12～48時間後の細胞で著明に亢進していることが認められた。この場合は供給される鉄量が不足しているために細胞の鉄要求性が高まり、この亢進が生じたものと考えられた。一方、IRE-BPの結合親和性は12時間後より弱い増強を示し、48時間後には強いピークをもって増強することが示された。すなわち、結合親和性もTfR mRNAの発現と同様に12～48時間の細胞で増強しており、特に48時間後の細胞では結合親和性もmRNAの発現も著しく亢進していた。しかし、12～24時間の細胞におけるTfR mRNAの発現の亢進に対しては結合親和性の増強は弱く、この発現の亢進を生理的なIRE/IRE-BP相互作用による調節機構だけで説明することは困難であると考えられた。このようなdysregulationが生じてきた機序や、IRE-BPの結合親和性の増強の意義について今回の実験結果からは明らかにし得なかったが、K562の赤芽球系分化誘導に関連した変化である可能性やK562の腫瘍細胞としての特性によるものである可能性が考えられた。

さらに、IRE-BP mRNAの発現は0～12時間で軽度増強し24時間以後に減弱する傾向を示したが、TfあるいはDFXを添加したことによる影響は顕著ではなかった。

Ft mRNAの発現の変動は、ほとんど認められなかった。

結語

K562の赤芽球系分化誘導過程における鉄関連蛋白の動態を解析した結果、IRE/IRE-BP相互作用が生理的な鉄濃度の調節において重要な機能を果たしていると考えられた。さらに、その作用以外にも何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 川 上 義 和

学位論文題名

ヒト赤白血病細胞株 (K562) の赤芽球系分化誘導過程に おける鉄関連蛋白の動態に関する研究

I. 目的

細胞内鉄濃度はフェリチン(Ft)とトランスフェリンとによって厳格に規定されていることが知られているが、近年になってFt mRNAの5'末端、トランスフェリン受容体 (TfR) mRNAの3'末端にIron Responsive Elements (IRE) と呼ばれる構造の存在が明らかとなり、このIREに細胞質内蛋白であるIRE-binding protein (IRE-BP) が作用することによって両mRNAの翻訳が調節され、細胞内鉄濃度が一定に保たれている機構が解明されてきた。しかし、このIRE/IRE-BP相互作用の細胞分化における役割については現在ところ明らかではない。そこで本研究においてはヒト赤白血病細胞株K562の赤芽球系分化誘導過程における、鉄関連蛋白の動態について検討した。

II. 方法

1. 細胞培養および分化誘導

K562を10%FBS含有RPMI1640培地中で培養し、対数増殖期に酪酸ナトリウム1mMを加えて、さらに4日間培養した。分化誘導の判定はベンチジン染色とオキシヘモグロビン法による細胞内ヘモグロビン濃度の測定によって行った。

2. 細胞表面抗原の解析

酪酸ナトリウム添加後のK562を経時的に回収し、Flow cytometry法によって細胞表面のGlycophorinA抗原、TfR抗原の陽性率の変動を解析した。

3. mRNAの発現量の解析

酪酸ナトリウム添加後、経時的に細胞を回収し、RT-PCR法を用いてTfR、Ft、IRE-BPのmRNAの発現量を半定量的に比較検討した。同時に β -Actinを増幅し内部標準とした。

4. Gel Retardation Assay

IRE-BPのIREに対する結合親和性(IRE-BP活性)を検討するためにGel Retardation Assayを行った。

5. 鉄または鉄キレート剤の添加

培養液中の鉄濃度の影響を検討するために酪酸ナトリウム添加と同時に

鉄としてHolo Transferrin(Tf)100 μ g/mlを添加した細胞と鉄キレート剤であるメシル酸デフェロキサミン(DFX)60 μ Mを添加した細胞について同様の解析を行った。

III. 結果および考案

K562は酪酸ナトリウム添加後、ベンチジン陽性率、細胞内ヘモグロビン値が著増しており、酪酸ナトリウム添加によるK562の赤芽球系細胞への分化を確認した。

Flow cytometry法による解析では細胞表面Glycophorin抗原陽性率は増加しており赤芽球系分化を支持する結果であった。TfR抗原陽性率は添加前より高率であり、添加後も明らかな変動を認めなかった。これはK562の増殖力が強いために当初よりTfR抗原陽性率が高く、Flow cytometry法での解析では変動が認められ難かったためと考えられた。

RT-PCR法による解析ではTfR mRNAの発現量はいったん低下し再度上昇してくるが亢進は認められなかった。Gel Retardation Assay法によってIRE-BP活性を検討したところ酪酸ナトリウム添加12時間後にIRE-BP活性の上昇が認められた。この活性の上昇はTfR mRNAの安定性を高めると考えられ、TfR mRNAの発現の回復と矛盾しない結果と考えられた。

次に酪酸ナトリウムと同時にTfまたはDFXを添加したK562で検討を行った。

Tf添加細胞においてはTfR mRNAの発現は長時間にわたり抑制されており、IRE-BP活性は48時間後に増強が認められた。この活性の上昇もTfR mRNAの安定性を高めるものと考えられ、TfR mRNAの96時間後からの発現の回復と矛盾しない結果であった。

DFX添加細胞ではTfR mRNAの発現は12~48時間後には発現が亢進しており、IRE-BP活性は48時間後に増強していた。この活性の上昇は48時間後のTfR mRNAの発現の亢進と矛盾しない結果ではあったが、12~24時間におけるTfR mRNAの発現の亢進に対する活性は弱く、生理的なIRE/IRE-BP相互作用による調節機構だけで説明することは困難であると考えられた。この理由についてはK562の赤芽球系分化誘導に関連した変化である可能性やK562の腫瘍細胞としての特性によるものである可能性が考えられた。

また、IRE-BP mRNAの発現は分化誘導早期に軽度の上昇を認めたが鉄濃度の変化による影響は明らかではなかった。

これらの検討結果からK562の赤芽球系への分化過程においてIRE/IRE-BP相互作用は生理的な鉄濃度の調節において重要な機能を果たしていると考えられた。しかし、その作用以外にも分化誘導あるいは腫瘍細胞の特性に基づくと考えられる何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

以上より本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。