

学位論文題名

白血病性造血幹細胞の増殖におけるチロシンリン酸化の研究

—チロシン脱リン酸化酵素阻害剤による解析—

学位論文内容の要旨

緒言

慢性骨髄性白血病(CML)の造血幹細胞は、正常造血幹細胞と同様に各種のサイトカインによって増殖と分化が制御されている。一方CMLではbcr-abl蛋白が形成され、この蛋白が恒常的に高いチロシンリン酸化酵素活性を保っていることが報告されている。Caraccioloらは、c-abl癌原遺伝子によってコードされたチロシンリン酸化酵素の機能は顆粒球系細胞に系統特異的であると報告し、CML症例の白血球の選択的増多を説明しえることを示唆している。

今回著者はチロシンリン酸化酵素とチロシン脱リン酸化酵素の正常および白血病の造血前駆細胞の増殖に対する作用を明らかにするため、健常人およびCML症例より分離された新鮮造血幹細胞を用いて、CFU-GMおよびBFU-Eコロニー形成に対するチロシン脱リン酸化酵素阻害剤であるバナデイトの効果を検討した。

材料と方法

細胞調製

造血前駆細胞は健常人腸骨稜より採取した骨髓液、CML症例慢性期の末梢血から回収した。遠心分離により回収した骨髓液および末梢血の単核細胞より付着細胞を除去し、さらにCD 2、CD 1 4、CD 1 9陽性細胞を除去してLineage negative cell (Lin (-) cells)を得た。得られたLin(-) cellsを抗HPCA-1(CD34)抗体とIgGコート免疫ビーズによってCD34陽性細胞を回収して試料とした。

コロニー形成法

コロニー形成法は、健常人では 2×10^4 、CML症例では 1×10^4 個の細胞を白血球遊走プレート(Sterilin)の各well中にいれた軟寒天培養液(IMDM, 30% FCS, 1% BSA, 1×10^{-4} M 2-ME, 0.3% agar)上に静置して14日間培養し、倒立顕微鏡下にコロニー数を直接算定した。CD34陽性細胞を用いた場合は、500個の細胞を静置した。IL-3、GM-CSF、G-CSFもしくはEPOをそれぞれ100単位/ml、100ng/ml、100ng/ml、10単位/ml添加し、バナデイト濃度は、0、1、5、および $10 \mu\text{M}$ を添加して検討した。一方短時間添加培養実験では、0、0.1、0.5、1.0mMのバナデイトで2時間培養し、洗浄後コロニー形成法を

行った。更に一部の実験では細胞を抗CD45抗体であらかじめ処理してから洗浄後、コロニー形成法を行った。

無血清培養

無血清培養では、FCSのかわりに1% deionized BSA、 1×10^{-6} M insulin、400 μ M sodium selenate、8.0 μ g/ml BSA-absorbed L-a-phosphatidylcholine、7.8 μ g/ml BSA-absorbed cholesterolを用い、上記と同様にコロニー形成法を行った。

ウエスタンブロット法

10 μ MのOVを加えて37°Cで3時間培養後、EPO 10U/mlまたはIL-3 100U/mlを添加して培養したCMLのLin(-) cellsを、lysis bufferに浮遊後ホモジナイザーにて破碎し、105,000G、4°C、60分間超遠心にて不溶物を除去して試料とした。試料を7.5-10% SDS-PAGEで泳動し、clearblot-PTM膜に転写後、抗フォスフォチロシン抗体、ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗体、Konica immunostain KitTMを用いて染色発光させた。

結果

- 1) バナデイトはIL-3、GM-CSF刺激による正常人のCFU-GMコロニー数を濃度依存的に抑制した。EPOによるBFU-Eコロニー形成は影響を全く受けなかった。短時間添加培養実験においても同様な結果を示した。
- 2) IL-3またはGM-CSF刺激による正常CD34陽性細胞のCFU-GMコロニーもバナデイトによって著明に抑制された。
- 3) IL-3、GM-CSFおよびG-CSF刺激によるCML患者よりのCFU-GMコロニー形成はバナデイトによって殆ど影響されなかった。一方、EPO刺激によるBFU-Eコロニー形成は5 μ M以上のバナデイト添加によって有意に増加した。短時間添加培養実験においてもCFU-GMコロニー形成には影響を与えなかったが、BFU-Eコロニー形成を増強した。
- 4) 無血清培養条件下でのCML症例よりのCFU-GMコロニー形成に対しては、バナデイトは5 μ M以下では有意な影響を示さなかったが、EPO刺激によるBFU-Eコロニー形成を著明に増加させた。
- 5) 抗CD45抗体は、CML患者のCFU-GMコロニー形成を明らかに抑制したが、BFU-Eコロニー形成には明らかな影響を示さなかった。
- 6) IL-3刺激によるCML細胞のチロシンリン酸化蛋白質は、5分から30分まではバナデイトの有無いかんにかかわらず有意な変動は認められなかった。一方EPO刺激で出現するMW 65 K dのリン酸化蛋白質が、バナデイト存在下で5分後で明らかに増強し15分後まで認められた。

考察

最近になって、c-abl癌原遺伝子によってコードされたチロシンリン酸化酵素の機能は顆粒球系細胞に系統特異的であると報告されており、CMLで形成されるbcr-abl遺伝

子産物であり、高い活性を持ったチロシンリン酸化酵素がCMLにおける選択的白血球増多に関係すると示唆されている。この報告と今回の成績を勘案すると、1) 正常人のCFU-GMコロニーとBFU-Eコロニーを刺激するサイトカインのシグナル伝達系におけるチロシン脱リン酸化酵素の役割に相違があること、2) CMLのCFU-GMコロニーを刺激するサイトカインのシグナル伝達系において、bcr-abl遺伝子産物である高い活性を持ったチロシンリン酸化酵素の存在のためにサイトカイン刺激後の一過性のチロシンリン酸化と脱リン酸化が不必要であること、3) bcr-abl遺伝子産物はCMLのEPOレセプターを介するシグナル伝達への関与の可能性は低く、バナデイトはチロシン脱リン酸化酵素阻害作用を通してCMLにおけるEPOのシグナル伝達を修飾し得ることなどを示唆している。抗リン酸化チロシン抗体を用いたCML細胞のウエスタンブロット法の結果はこの可能性を支持した。抗CD45抗体はCMLのBFU-Eコロニー形成に有意に影響しないことより、CD45がCML細胞のBFU-Eコロニー形成増加に関与しているチロシン脱リン酸化酵素である可能性は少ないと考えられる。今回の検討ではCML細胞の赤芽球コロニーの増強に関与しているチロシン脱リン酸化酵素は特定しえなかったが、細胞内には多種類のチロシン脱リン酸化酵素の存在が報告されており、Yiらが最近報告した、新しい脱リン酸化酵素等も考慮しなければならないと考えられる。

結語

CML症例における顆粒球系および赤芽球系前駆細胞のシグナル伝達システムには、健常人とは大きな相違のあることを報告した。今後これらの点をより明らかにするためにはさらに詳細な検討が必要であろう。

学位論文審査の要旨

主査 教授 川上 義和
副査 教授 葛巻 暹
副査 教授 細川 真澄男

学位論文題名

白血病性造血幹細胞の増殖におけるチロシンリン酸化の研究

—チロシン脱リン酸化酵素阻害剤による解析—

研究目的

本研究では、チロシンリン酸化酵素とチロシン脱リン酸化酵素の正常および白血病の造血前駆細胞の増殖に対する作用を明らかにするため、健常人およびCML症例より分離された新鮮造血幹細胞を用いて、CFU-GMおよびBFU-Eコロニー形成に対するチロシン脱リン酸化酵素阻害剤であるオルソバナジン酸（バナジン酸）の効果を検討した。

材料と方法

細胞調製

造血前駆細胞は健常人腸骨稜より採取した骨髓液、CML症例慢性期の末梢血から回収した。遠心分離により回収した骨髓液および末梢血の単核細胞より付着細胞を除去し、さらにCD2、CD14、CD19陽性細胞を除去してLineage negative cell (Lin⁻ cells)を得た。

コロニー形成法

コロニー形成法は、健常人では 2×10^4 、CML症例では 1×10^4 個の細胞を白血球遊走プレート上の各well中にいれた軟寒天培養液 (IMDM, 30% FCS, 1% BSA, 1×10^{-4} M 2-ME, 0.3% agar)上に静置して14日間培養し、倒立顕微鏡下にコロニー数を直接算定した。CD34陽性細胞を用いた場合は、500個の細胞を静置した。IL-3、GM-CSF、G-CSFもしくはEPOを添加し、バナジン酸は、0から $10 \mu\text{M}$ を添加して検討した。短時間添加培養実験では、0、0.1、0.5、1.0mMのバナジン酸で2時間培養し、洗浄後コロニー形成法を行った。

無血清培養

無血清培養では、FCSのかわりに1% deionized BSA、 1×10^{-6} M insulin、400 μM sodium selenate、8.0 $\mu\text{g/ml}$ BSA-absorbed L- α -phosphatidylcholine、7.8 $\mu\text{g/ml}$ BSA-absorbed cholesterolを用い、上記と同様にコロニー形成法を行った。

ウェスタンブロット法

$10 \mu\text{M}$ のバナジン酸を加えて 37°C で3時間培養後、EPOまたはIL-3を添加して培養したCMLのLin⁻ cellsを、lysis bufferに浮遊後破碎し、超遠心して試料とした。試料をSDS-PAGEで泳動し、clearblot-PTM膜に転写後、抗フォスチロシン抗体、ペルオキシダー

ゼ結合抗マウスIgG抗体、Konica immunostain Kit™を用いて染色発光させた。

結果

1) バナジン酸はIL-3、GM-CSF刺激による正常人のCFU-GMコロニー数を濃度依存的に抑制したが、EPOによるBFU-Eコロニー形成は影響を全く受けなかった。

2) IL-3またはGM-CSF刺激による正常CD34陽性細胞のCFU-GMコロニーもバナジン酸によって著明に抑制された。

3) IL-3、GM-CSFおよびG-CSF刺激によるCML患者よりのCFU-GMコロニー形成はバナジン酸によって殆ど影響されなかった。一方、EPO刺激によるBFU-Eコロニー形成は5 μ M以上のバナジン酸添加によって有意に増加した。

4) 無血清培養条件下でのCML症例よりのCFU-GMコロニー形成に対しては、バナジン酸は有意な影響を示さなかったが、EPO刺激によるBFU-Eコロニー形成を増加させた。

5) 抗CD45抗体は、CML患者のCFU-GMコロニー形成を抑制したが、BFU-Eコロニー形成には影響を示さなかった。

6) IL-3刺激によるCML細胞のチロシンリン酸化蛋白質は、5分から30分まではバナジン酸の有無にかかわらず有意な変動は認められなかった。一方、EPO刺激で出現するMW65KDaのリン酸化蛋白質が、バナジン酸存在下では5分後に明らかに増強し15分でもその増強が認められた。

考察および結語

今回得られた結果から1) 正常人のCFU-GMコロニーとBFU-Eコロニーを刺激するサイトカインのシグナル伝達系におけるチロシン脱リン酸化酵素の役割に相違のあることが示唆された。2) CMLのCFU-GMコロニーを刺激するサイトカインのシグナル伝達系においては、正常細胞と異なりbcr-abl遺伝子産物である高い活性を持ったチロシンリン酸化酵素の存在のためにチロシン脱リン酸化酵素による調節機構から逸脱している可能性が示唆された。3) bcr-abl遺伝子産物はCML細胞のEPOレセプターを介するシグナル伝達への関与の可能性は低く、バナジン酸はチロシン脱リン酸化酵素阻害作用を介してCML細胞におけるEPOのシグナル伝達を修飾し得ることが示唆された。

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。