

博士（医学）吉田秀昭

学位論文題名

ラット骨髓単球性白血病細胞c-WRT-7由来の分化株と
アポトーシス株の樹立と性状の違いについて

学位論文内容の要旨

背景および目的

急性前骨髓性白血病細胞はATRAによって終末分化することが知られているが、同一の薬剤により直接アポトーシスに陥ることも知られている。また白血病細胞の分化とアポトーシスは別の薬剤によっても同時にまたは連続的に誘導される。しかし、分化とアポトーシスは独立に制御されていると考えられており、同じ薬剤がいかにして分化とアポトーシスを誘導しているのかは不明である。ラット骨髓単球性白血病c-WRT-7細胞から樹立した培養細胞株parent 2 (P2)は、*in vivo*、*in vitro*ともにLPSやその活性成分であるLipid Aにより分化する。この分化誘導作用はCa依存性であることは明らかにされているが、その詳細な機構はほとんど明らかにされていない。

本研究では、P2細胞は*in vitro*でlipid A処理により大部分が分化する一方で、極く少数の細胞は分化せず、直接アポトーシスに陥ることを見い出し、P2細胞からLipid A刺激に対して分化する株とアポトーシスに陥る株をそれぞれ樹立した。これら細胞株を利用して、分化もしくはアポトーシスに陥る機構を細胞分化とアポトーシスに関与することが知られているp53、bcl-2、p38MAPKなどの発現について比較検討し解析した。

材料および方法

1. 細胞：Rauscher白血病ウィルス誘導ラット骨髓単球性白血病細胞c-WRT-7の培養株であるP2細胞を用いた。
2. 分化株およびアポトーシス株の樹立：限界希釀によりP2細胞からsingle cell cloneを得た。P2細胞を96穴プレートに1穴当たり1個以下となるようにまき、培養開始から2週間後、増殖した細胞を24穴プレートに移した後、さらに25 cm²フラスコに移し、維持した。分化株とアポトーシス株の選別は各cloneをLipid Aの誘導体であるONO-4007(以下Lipid A)刺激に対する反応により行った。
3. MTT assayによる細胞増殖の解析：96穴平底ミクロプレート中で各細胞をLipid Aで処理し、72時間培養した。MTT試薬とともにさらに6時間培養した後、MTP-100 micro-plate readerを用いて、生細胞により還元されたホルマザン濃度を比色定量した。
4. latex beads貪食能を指標とした細胞分化の解析：24穴プレートに培養した各細胞をLipid Aで処理し、48時間培養した後、latex beadsを0.25% (v/v)になるように添加し、さらに4時間培養した。200個以上の細胞を顕微鏡下で観察し、5個以上のlatex beadsを取り込んだ細胞を貪食能陽性とした。

5. DNA ladderおよびフローサイトメトリーにおけるsub-G1分画を指標としたアポトーシスの解析：a. DNA ladder形成によるアポトーシス；Lipid A処理後の各細胞DNAを1%アガロースゲルで電気泳動した後、ethidium bromideによりDNAを染色し、ladder形成の有無を検討した。b. cell cycle；各細胞をLipid Aで2-24時間刺激した後、PI染色し、FACSCaliburを用いて、ヒストグラム中のsub-G1分画に存在する細胞をアポトーシス陽性細胞とした。
6. Western blot：cell lysateをSDS-PAGEにて泳動分離後、蛋白をニトロセルロース膜に転写し、抗CD14、抗bcl-2、抗p21、抗p38MAPKおよびリン酸化p38MAPK、抗JNK/SAPKおよびリン酸化JNK/SAPKの各抗体と反応させ、被検蛋白を検出した。
7. yeast functional assayによるp53蛋白の機能異常の検討：酵母にRT-PCR法で増幅した被検p53cDNAを導入し恒常に発現させた。機能的に異常がある変異型p53が導入された酵母では、p53が酵母染色体上のRGC配列に結合できないため下流のADE2遺伝子が転写されず、酵母自身にはアデニンの中間代謝産物が蓄積しコロニーが赤くなる。この原理に基づき、酵母コロニーを形成後1プレートにつき200個以上のコロニーを観察した。赤コロニーが10%以上みられた場合にp53に機能的変異があると判定した。また野生型p53の機能におよぼす変異型p53の影響を検討するためtransdominance testを行った。すなわち上記のassay系に野性型p53を発現するベクターと変異型p53を発現するベクターとをdouble transfectし、野性型p53の白コロニー形成におよぼす影響により、変異型p53のドミナンシーを判定した。なお変異p53の塩基配列はABI373A sequencerにて決定した。

結果および考察

本研究では、Lipid Aで処理することによりマクロファージ様に終末分化するラット骨髄单球性白血病細胞から、Lipid A処理で分化する35株と直接アポトーシスに陥る3株を分離した。実験には代表的2株1D6と3B1を選択し用いた。これら2株がLipid A処理によってそれぞれ分化およびアポトーシスに陥ることを細胞学的および生化学的に確認した。そこでこれら2株がLipid A処理により異なった反応を示す機序の解明を試み、次の結果を得た。1) Lipid Aに対するレセプターであるCD14の発現量は両細胞株で差がなかった。2) p38MAPKについては、分化株1D6ではリン酸化p38MAPKがLipid A処理後一過性に増加し、アポトーシス株3B1ではLipid A未処理状態でもリン酸化p38MAPKが強く発現しており、Lipid A処理後に脱リン酸化されることが認められた。このように両細胞株ではp38MAPKの動態が異なっていたことからLipid A刺激後p38MAPKが活性化されることにより1D6細胞では分化が誘導され、逆に3B1細胞では既にリン酸化されているp38MAPKがLipid A刺激後に脱リン酸化されることによりアポトーシスが誘導される可能性が考えられた。3) 分化株1D6はLipid A刺激前後でアポトーシス抑制タンパクであるbcl-2の発現量に全く差がみられなかつたが、アポトーシス株3B1ではLipid A刺激後bcl-2の発現量が著明に減少した。bcl-2の上流にありその発現を調節しているp53は、両細胞株とも対立アリルの一方のみが変異を起こしていた。しかしtransdominance testの結果から、分化株1D6では変異型p53により野性型p53の機能が抑制されるが、アポトーシス株3B1では野性型p53の機能が保持されていることが示唆された。このことから1D6株ではp53を介したbcl-2の発現の調節はみられないが、3B1株ではLipid A処理後p53の発現増強を介してbcl-2の発現が減弱し、アポトーシスに陥りやすくなっている可能性が推定された。

以上のように、Lipid A刺激後の分化やアポトーシスの誘導にはp53とp38MAPKが関与することが推定されるが、その詳細については今後さらなる検討が必要である。

結語

ラット骨髄単球性白血病細胞P2から分離されたアポトーシス亜株では、分化株では欠失しているp53の機能が保持されており、それを介してLipid A処理によりbcl-2発現が低下することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 細川 真澄男

副査 教授 今村 雅寛

副査 教授 上出 利光

学位論文題名

ラット骨髓单球性白血病細胞 c-WRT-7 由来の分化株と

アポトーシス株の樹立と性状の違いについて

細胞は外からの刺激に反応して分化する一方アポトーシスに陥り死滅する。しかし、同一刺激に対して分化したり、アポトーシスに陥ったりする細胞内機構はほとんど明らかになっていない。そこで、申請者は、同一細胞由来の分化する細胞（分化株）と直接アポトーシス陥る細胞（アポトーシス株）の樹立を試み、lipopolysaccharide(LPS)刺激後の細胞内の分化あるいはアポトーシス関連蛋白分子の変動の違いを検討した。実験にはラット骨髓单球性白血病c-WRT-7細胞から樹立した培養細胞株parent 2 (P2) を用いた。この細胞の大部分は、*in vivo*, *in vitro*ともにLPSやその活性成分であるLipid Aにより分化するが、極く少数の細胞は分化せず、直接アポトーシスに陥ることが明らかになっている。また、この分化誘導作用はCa依存性であることは明らかにされているが、その詳細な機構はほとんど明らかにされていない。まず、限界希釈法により、P2細胞からsingle cell clonesを得た。実際にはP2細胞を96穴プレートに1穴当たり1個以下となるようにまき、培養開始から2週間後、増殖した細胞を24穴プレートに移した後、さらに25 cm² フラスコに移し、維持した。分化株とアポトーシス株の選別は各cloneをLipid Aの誘導体であるONO-4007 (以下Lipid A)刺激に対する反応により行った。その結果、樹立された38クローンのうち35クローンが分化株、3クローンがアポトーシス株であった。それぞれの代表株として、1D6 (分化株) と3B1(アポトーシス株)を用い、次の検討を行った。MTT assayによる細胞増殖の解析では、P2、1D6および3B1の3 株とも同様な増殖態度を示し、Lipid Aを添加による増殖抑制も同程度であり、濃度依存的であった。May-Giemsa染色による細胞形態は両者ともP2細胞同様に骨髓芽球様であったが、Lipid A刺激 4 8 時間後には1D6は多様なくびれを持った核と大きな胞体のマクロファージ様になり、3B1は核が分断され、Lipid A刺激に対する形態変化は明らかな違いが観察された。さらに、P2細胞の分化の指標であるplastic beads の細胞内取り込み（貪食能）を示す細胞が無刺激状態では1D6と3B1それぞれ4.8%および3.0%以下であったが、Lipid A刺激 4 8 時間後はP2および1D6では90%以上であった。

のに対し、3B1ではやはり3%以下であった。一方、DNA ladder形成とFACSによる細胞周期解析でのsubG1とを指標としたアポトーシスは、Lipid A刺激24時間以内で、1D6では全く認められなかつたが、3B1では顕著であった。これら分化株とアポトーシス株でのLipid A受容体と考えられるCD14蛋白量をWestern blottingで検討したが差はなかつた。細胞の分化またはアポトーシスに関与する蛋白の検索では、p38MAPKについては、分化株1D6ではリン酸化p38MAPKがLipid A処理後一過性に増加し、アポトーシス株3B1ではLipid A未処理状態でもリン酸化p38MAPKが強く発現しており、Lipid A処理後に脱リン酸化されることが認められた。しかし、JNK/SAPKについてはこのような違いは認められなかつた。このように両細胞株ではp38MAPKの動態が異なつていてことからLipid A刺激後p38MAPKが活性化されることにより1D6細胞では分化が誘導され、逆に3B1細胞では既にリン酸化されているp38MAPKがLipid A刺激後に脱リン酸化されることによりアポトーシスが誘導される可能性が考えられた。次に、分化株1D6はLipid A刺激前後でアポトーシス抑制タンパクであるbcl-2の発現量に全く変化がみられなかつたが、アポトーシス株3B1ではLipid A刺激後bcl-2の発現量が著明に減少した。そこでbcl-2の上流にありその発現を調節しているp53の機能的変異をyeast functional assayで検討した。両細胞株ともp53の対立アリルの一方のみが変異を起こしていたが、trans dominance testの結果から、分化株1D6の変異型p53はdominant negativeで野性型p53の機能を抑制するのに対し、アポトーシス株3B1のそれはrecessiveで野性型p53の機能が保持されていることが示唆された。このことから1D6株ではp53を介したbcl-2の発現の調節はみられないが、3B1株ではLipid A処理後p53の発現増強を介してbcl-2の発現が減弱し、アポトーシスに陥りやすくなっている可能性が示唆された。以上より、Lipid A刺激後の分化やアポトーシスの誘導にはp53とp38MAPKが関与することを推定した。

公開発表にあたつて、副査上出利光教授より、それぞれのクローンの性格の安定性、p53変異のyeast functional assay以外の方法による検討の有無、抗CD14抗体のラット特異性、p38MAPKリン酸化とアポトーシスについての文献的考察について、また、副査今村雅寛教授より、分化株とアポトーシス株とでもともと分化程度に差がある可能性、p38MAPK、p53およびbcl-2の相互の関連などについて質問があり、申請者はそれぞれに妥当な回答をなした。最後に、主査細川真澄男教授よりの求めに応じて、本研究の今後の進め方について申請者の考え方を述べ公開発表を終了した。

本論文は、ラット骨髄单球性白血病細胞P2からLPS刺激に異なつた反応を示す分化株とアポトーシス株を初めて分離し、それぞれの性格を明らかにしたものであり、細胞が同一刺激に対して分化したり、直接アポトーシスの陥る機構を解析するために有用な材料を提供した点で高く評価される。

審査員一同は、これらの研究成果ならびに大学院における研鑽や取得単位などを併せ高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。