

## 学位論文題名

## Granulocytic differentiation of myeloid progenitor cells by p130, the retinoblastoma tumor suppressor homologue

(RBファミリー蛋白p130による血球系細胞の分化誘導に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

細胞の増殖と分化を考察するうえで、細胞周期は非常に重要な意味を持っている。すなわち、通常は二律背反である増殖と分化が協調的に調節されるためには、細胞周期に関連した特異的な制御機構が働いていることが推察されるからである。レチノブラストーマ癌抑制遺伝子産物 (retinoblastoma protein, pRB) およびそのファミリー蛋白である p107、p130は細胞増殖の抑制分子として知られているが、近年これらの蛋白が種々の細胞分化にも関与することが示されつつある。われわれはマウス骨髄芽球細胞株 32Dcl3においてpRBおよびそのファミリー蛋白がはたす役割を検討した。

## 【方法と結果】

32Dcl3はinterleukin-3 (IL-3) 存在下ではmyeloblastとして増殖し、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 存在下では増殖を停止し顆粒球に分化する事が知られている。各サイトカインの存在下で培養した32Dcl3から各々蛋白を抽出し、Rbファミリー蛋白の発現をwestern blot法にて確認した。IL-3存在下ではリン酸化状態のpRB、p107の発現を認めたがp130は検出されなかった。一方G-CSF存在下ではp130は著明な発現増強を認め、pRb、p107は発現が抑制された。

32Dcl3にtetracycline-repressible transactivatorと大腸菌の *E. coli* *lac* repressorを発現するvectorをトランスフェクトし32D-B5とした。更に目的遺伝子を組み込んだpOPTET vectorをトランスフェクトすることでisopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG) により目的蛋白を選択的に発現誘導できる系(pOPTET系) を確立した。この系を用いてRBファミリー蛋白と結合しその機能を不活化するE1Aを誘導的に発現させた。E1Aの強制発現によりG-CSFによる顆粒球への分化はほぼ完全に阻害された。これらのことからp130が顆粒球分化に促進的に働いている可能性が示唆された。

このためpOPTET系によりp130を誘導的に発現できる独立した2クローンを作成した。p130の強制発現によりIL-3存在下での細胞増殖は抑制され、一部の細胞は顆粒球への分化傾向を示した。一方、同様にしてリン酸化抵抗性変異型pRBを誘導的に発現できる独立した2クローンを作成したが、この細胞ではIL-3存在下にて変異型pRBを誘導的に発現しても細胞増殖抑制、分化誘導とも認めなかった。

つぎに顆粒球への分化が細胞周期を停止させることのみで誘導されるのか否かを検討するために、サイトカイン飢餓により細胞をG1/G0期に停止させた。通常、IL-3濃度2.5ng/mlにて細胞は増殖するが、これを1.5pg/mlの条件(サイトカイン飢餓) にすることにより細胞周期はG1/G0に停止しDNA合成も著明に低下することがFlow cytometry及

び<sup>3</sup>H-thymidine incorporation assayにより確認された。サイトカイン飢餓により細胞をG1/G0期に停止させても顆粒球への分化傾向は認めなかった。一方サイトカイン飢餓条件下で更にp130を強制的に発現させることにより著明な顆粒球への分化傾向を認めた。

p130は cyclin E / cyclin-cyclin dependent kinase (Cdk) 2 またはcyclin A/Cdk2と結合し、Cdk2活性を阻害することが知られている。このCdk 阻害活性はp130のN端とスパーサー領域を必要とする。細胞分化の促進にCdk阻害活性が関与しているか否かを明らかにするために、pOPTET系を用いてCdk inhibitor p27を誘導的に発現できる独立した2クローンを作成した。p27の強制発現により細胞はIL-3存在下においても強力に増殖が抑制されたが、顆粒球への分化傾向は認めなかった。さらにサイトカイン飢餓においてp27を強制的に発現させたところ、細胞は完全にG1/G0期に停止しDNA合成も著明に抑制されたが顆粒球への分化傾向は認めなかった。

転写因子E2Fファミリーは細胞周期の制御においてRBファミリーの下流に位置し、細胞周期進行に必要な遺伝子群を発現させることにより、G1期からS期への進行に重要な役割を果たしている。E2FファミリーにはE2F1-5のサブタイプが存在することが知られており、pRBはE2F1、2、3と、一方p130はE2F4及び5との結合特異性を持つ。E2F binding siteを持つDNAをラベルしprobeとして用いたgel shift assayにより、32Dcl3においてはp130と選択的に結合するE2F4がE2Fファミリーの主体をなしており、他のE2Fはほとんど存在しないことが示された。

p130によるE2Fの転写活性抑制作用が、細胞増殖及び分化に直接的に関わっているかを明らかにするために以下の実験を行った。E2FはDP-1とヘテロダイマーを形成し特異的なE2F binding siteに結合し細胞周期進行に必要な遺伝子群を発現させる。我々はE2Fとのヘテロダイマーは形成するが、そのヘテロダイマーの特異的E2F binding siteへの結合能を失わせる変異型DP-1 (dominant negative DP-1, dnDP-1) をpOPTET系により誘導的に発現できる独立した2クローンを作成した。dnDP-1の発現誘導によりIL-3存在下での細胞増殖は抑制されたが、分化傾向は示さなかった。

顆粒球への分化促進作用の責任部位を明らかにすることを目的として、32Dcl3に変異型p130を誘導的に発現できるクローンを作成した。すなわちcyclin A/E-Cdk2 binding domainを欠失したp130( $\Delta$ 620-697)とE2F binding domainを欠失し、かつCdk binding activityは保持している p130( $\Delta$ 846-1119)である。いずれのクローンもwild type p130と同程度のp130変異蛋白の発現誘導を認めた。しかしこれらのクローンをサイトカイン飢餓の条件下で5日間培養してもいずれも顆粒球への分化はほとんど示さなかった。

#### 【考案】

これらの結果から血球系細胞では、pRBファミリー蛋白p130が選択的に顆粒球系細胞への分化誘導を促進することが示された。またこの細胞株においてはp130と選択的に結合するE2F-4がE2Fファミリー蛋白の主体をなしていることが示された。p130-E2F complexは細胞増殖に対して抑制的に機能することが知られている。今回の検討では、E2F binding activity を保持した変異型p130の強制発現では細胞では分化が促進しないこと、またdnDP-1の強制発現によりE2Fの機能を阻害しても細胞増殖は抑制されるが分化は促進されなかった。従ってp130-E2F complexが細胞の分化を直接促進しているという考えは否定的であり、p130がE2F以外の分化を促進する分子を制御している可能性が示唆された。

#### 【結論】

血球系細胞では細胞周期からの逸脱と細胞分化プログラムの両者の制御をp130が担っ

ていることが示された、。また顆粒球への分化誘導にはp130のcyclin A/E-Cdk2 binding domainおよびE2F binding domainの両者が必要であることが示唆された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

### Granulocytic differentiation of myeloid progenitor cells by p130, the retinoblastoma tumor suppressor homologue

(RB ファミリー蛋白 p130による血球系細胞の分化誘導に関する研究)

レチノブラストーマ癌抑制遺伝子産物 (retinoblastoma protein, pRB) およびそのファミリー蛋白であるp107、p130は細胞増殖の抑制分子として知られているが、近年これらの蛋白が種々の細胞分化にも関与することが示されつつある。申請者はマウス骨髄芽球細胞株 32Dcl3においてpRBおよびそのファミリー蛋白が果たす役割を検討した。この細胞株ではG-CSF投与による分化にともないpRBおよびp107の発現が抑制される一方、p130の強い発現誘導を認めた。申請者は改変型テトラサイクリン制御プロモーターにより外来遺伝子の発現を誘導する系を用い種々の蛋白を誘導的に発現できる実験系を用いて以下の実験を行った。pRBファミリー蛋白と結合しその機能を不活化するE1Aを誘導的に発現させたところ、G-CSFによる顆粒球への分化は阻害された。さらにこの細胞株にp130を誘導的に発現させたところ細胞増殖は抑制され、一部の細胞では顆粒球系細胞への分化を認めた。一方、リン酸化抵抗性の変異型pRBの発現誘導では細胞の増殖抑制、分化誘導のいずれも認めなかった。またこの細胞にp27CDK阻害分子の発現誘導あるいはサイトカイン飢餓により細胞をG1期に停止させても細胞の分化誘導は認められなかった。しかしサイトカイン飢餓によりG1期に停止させた細胞にp130を誘導的に発現することにより、顆粒球系細胞への分化が劇的に促進された。これらのことから単に細胞周期を停止させるだけでは分化誘導されないこと、更にp130が分化誘導に対して促進的に機能することが示された。次にE2F binding siteを持つDNAをラベルしprobeとして用いたgel shift assayにより、32Dcl3においてはp130と選択的に結合するE2F4がE2Fファミリーの主体をなしており、他のE2Fはほとん

ど存在しないことが示された。更にE2Fとのヘテロダイマーは形成するが、そのヘテロダイマーの特異的E2F binding siteへの結合能を失わせる変異型DP-1の発現誘導によりIL-3存在下での細胞増殖は抑制されたが、分化傾向は示さなかった。このことからp130による分化誘導はE2Fの転写活性抑制作用のみに依存していないことが示唆された。この細胞株に変異型p130を発現させることにより、血球系細胞の分化誘導にはp130のポケットドメインおよびスパーサドメインの両者が必要であることが示唆された。以上のことから、血球系細胞では細胞周期からの逸脱と細胞分化プログラムの両者の制御をp130が担っていることが示された。

公開発表に際し、副査の内科学第二講座小池教授より、本研究の臨床応用に関して申請者の意見が求められた。申請者は急性前骨髄芽球性白血病における、All-trans retinoic acid (ATRA) を用いた分化誘導療法に関連して、ATRAによる分化誘導がP130やE2F4を介して行われている可能性があるかと答え、これらの遺伝子を用いての遺伝子治療の可能性を述べた。続いて加齢制御医学講座今村教授より、P130発現による分化誘導の際に形態学以外の分化マーカーに関する質問があった。申請者は、p130により分化した細胞ではFlow cytometryによる検討の結果、Gr-1の発現は認めたがCD14の発現を認めなかったこと、また特殊染色によってペルオキシダーゼ染色陰性であったことを説明した。更にこのことからp130の発現では核のsegmentationは誘導するが完全に成熟した顆粒球までの分化誘導作用ではないという可能性を示し、in vivoの細胞分化においてはp130-E2F4以外の因子が関与している可能性が考えられると答えた。続いて内科学第三講座浅香教授より、遺伝子治療を念頭に置いた上で将来的に本研究結果を臨床の治療に役立てるとしたら、p130による増殖抑制効果と分化誘導効果のどちらがより有用であると考えられるか、との質問があった。申請者は本研究がこれまで比較的研究が進んでいなかった細胞の分化誘導機構の一端を明らかにした研究であることから、現在様々な分野でその臨床応用が期待されている分化誘導療法に対して、本研究がより寄与する可能性があるかと答えた。最後に主査の癌研生化田中教授より、p130遺伝子のノックアウトマウスに関する質問があった。申請者は文献での報告をもとに、ある種のマウスにおいてはp107およびp130のいずれかのノックアウトでは正常に生まれてくるが両者のダブルノックアウトマウスは骨形成不全により生後間もなく肋骨骨折による呼吸不全により死亡することを説明した。さらにこのことからp107とp130はお互いの機能を相補しあうことが示唆されることを説明した。

本研究では血球系細胞では細胞の増殖抑制と分化誘導の両者の制御をp130が担っていることが示された。またこのことは今後の分化誘導療法の機序解析並びに遺伝子治療等の臨床応用に寄与していく可能性も期待される。以上より、審査員一同はこの研究を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。