

学 位 論 文 題 名

アクチン調節蛋白質ゲルソリンの
単球性白血病細胞分化誘導能

学位論文内容の要旨

緒言

アクチン線維は細胞の形態を調節すると共に細胞環境の変化に対応して新たな細胞の振る舞いを規程する機能を持ち合わせている。ゲルソリンは、広範囲の組織に分布する代表的なアクチン調節蛋白質で、細胞の増殖、細胞死、分化といった細胞の高次機能の調節にも重要な役割を果たしていることが、最近明らかにされてきた。本研究では、ゲルソリン自身に単球性白血病細胞株の分化を誘導する機能があるか否かについて、単球細胞の形態学、細胞生物学の観点で検討し、関与する分子を同定することを試みた。

材料と方法

1. 細胞株および組み換えレトロウィルスの構築

ヒト単球性白血病細胞株 U937 を用いた。ゲルソリン cDNA を含むレトロウィルス・ベクター pLNChGSN は、ネオマイシン耐性遺伝子を含む pLNCX レトロウィルス・ベクターを用いて構築した。水疱性口内炎ウイルス (VSV)-G pseudotype レトロウィルスの産生は、pLNCX あるいは pLNChGSN と VSV のエンベロープ・タンパク質 VSV-G 遺伝子をコードするベクター pMD.G をヒト胎児腎細胞株 293gp/bsr 細胞に共導入することにより行った。

2. ゲルソリン安定発現 U937 細胞株の樹立

U937 細胞を遠心分離し沈殿させた後、上清を pLNChGSN 組み換えウィルスとポリブレンを含む培地に交換し、室温で遠心分離した。感染細胞を G418 を含む培地で培養して選択し限界希釈法によりクローン化を行った。ゲルソリンの発現が最も高い 2 つのクローン (UG6 および UG11) を選択し、その後の解析に用いた。pLNCX についても同様に U937 細胞に感染させ、ネオマイシン耐性の対照株を 1 クローン (UN5) 樹立し、その後の解析に用いた。

3. ウェスタンブロット法および生物学的解析

ウェスタンブロット法は常法を用いた。細胞の増殖は、トリパンブルー染色し血球算定盤を用いて測定した。細胞をスライドガラス上に塗布し、メタノール固定し風乾した後、ギムザ溶液で染色し、光学顕微鏡を用いて形態を観察した。活性酸素産生活性は nitroblue tetrazolium (NBT) アッセイにより解析した。また、非特異的エステラーゼ (NSE) 活性は、同様にナフチルアセテート染色法を用いて調べた。単球細胞のマーカーである細胞表面抗原 CD11b の発現はフローサイトメトリーにより測定した。

4. 半定量的 RT-PCR

c-FOS, p21CIP1 および内因性対照 GAPDH に対する半定量的 RT-PCR のためのプライマーを設計した。牛胎仔血清存在下で培養した親株 U937, 対照株 UN5, ゲルソリン過剰発現株 UG6 および UG11 から TRIzol 試薬を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA に対し SuperScript II およびラン

ダム・プライマーを用いて逆転写反応を行った。逆転写産物と、その希釈液を鋳型に、Gene Amp PCR 9700を用いてPCR反応をおこなった。PCR産物は電気泳動をおこない、その増幅産物を紫外線光下で検出した。

結 果

1. ゲルソリン高発現 U937 細胞株における増殖能と細胞形態の変化

ウェスタンブロット法を用いた解析で、親株である U937 および対照遺伝子 Neo を同じ方法で導入した UN5 細胞株では、ゲルソリンの発現は見られなかった。これに対して、ゲルソリン高発現 U937 細胞株である UG6 および UG11 では、分子量 90 KD のゲルソリンが検出された。細胞分化の過程において細胞増殖が喪失することが多くの細胞種で示されているので、細胞株 UN5, UG6 および UG11 の増殖状態について調べた。対照 UN5 細胞株は親株と同様な白血病細胞としての増殖能を示した。一方、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6 および UG11 では、培養開始 3 および 6 日目に明確な増殖抑制が観察された。

次に、ゲルソリンの高発現が U937 細胞株において単球やマクロファージへの最終分化を誘導できるか否かを調べるために、ギムザ染色を用いて形態学的に検査した。親株および対照 UN5 細胞株では、単芽球がそれぞれ 99% と 98%を占めた。これに対して、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6 および UG11 は、均一な単球あるいはマクロファージへの分化が多く見られた。この単球性形態は、UG6 および UG11 において、50〜70%の範囲で見られた。これらの結果により、ゲルソリンの高発現が単独でヒト単球性白血病細胞株 U937 において、増殖の遅延と形態学的分化を誘導することが証明された。

2. ゲルソリン高発現 U937 細胞株における単球細胞分化マーカーの誘導

NBT 還元能は親株および UN5 で共に約 2%以下だったのに対し、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6 および UG11 では、それぞれ 70%あるいは 68%と高い値を示し、有意な差が示された。NSE 酵素については、親株および UN5 での陽性細胞がそれぞれ 3%と 5%だったのに対し、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6 および UG11 では、55〜45%の陽性率を示し、有意な差を示した。また、親株および UN5 での CD11b 発現細胞が 12%〜10%だったのに対し、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6 および UG11 では、40〜36%の発現率を示し、有意な差であった。これらの成績により、ゲルソリンの高発現は、U937 単球性白血病細胞株において増殖の遅延と形態学的分化だけでなく機能的分化を誘導することが示された。

3. ゲルソリン高発現 U937 細胞株における単球性分化関連分子の発現

半定量的 RT-PCR 解析法を用いて、ゲルソリン高発現によって U937 細胞株に誘導される単球性分化に関与する因子の解析を試みた。c-FOS 遺伝子については、親株および UN5 株に比べ UG6 および UG11 株において高い mRNA レベルの亢進が観察された。親株、UN5 株での p21CIP1 遺伝子発現は、非常に低かった。これに対して、UG6 および UG11 株においては、それぞれ 13 倍、25 倍の mRNA レベルの亢進が観察された。これらの所見は、ゲルソリンの高発現によって誘導される U937 単球性白血病細胞株における増殖抑制および単球性分化の誘導に、c-FOS 遺伝子 および p21CIP1 両遺伝子の発現亢進が関与している可能性を示している。

結 語

ヒト単球性白血病細胞 U937 親株、対照遺伝子 Neo 導入株 UN5 に比べ、ゲルソリン高発現 UG6 および UG11 細胞株では、明らかな増殖抑制、単球への形態変化の増加、活性酸素産生や非特異的エステラーゼ活性の亢進、CD11b 細胞表面抗原の発現増加が観察された。半定量的 RT-PCR 解析では、UG6 と UG11 細胞株では、親株あるいは UN5 と異なり、c-FOS 転写因子および p21CIP1 サイクリン依存性カイネース抑制因子の mRNA 発現の亢進が観察された。これらの結果は、ゲルソリンが U937 細胞株において単独で形態学的かつ機能的単球性分化を誘導する機能を持ち、この作用が c-FOS あるいは p21CIP1 遺伝子の活性化を介しておこる可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

アクチン調節蛋白質ゲルソリンの 単球性白血病細胞分化誘導能

ゲルソリンは、広範囲の組織に分布する代表的なアクチンアクチン調節蛋白質である。最近の研究で、ゲルソリンが細胞の増殖や細胞死の調節といった細胞の高次機能にも重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。本研究は、ゲルソリン自身に細胞の分化を誘導する機能があるか否かについて、単球性白血病細胞株を用いて単球細胞の形態学、細胞生物学の観点で検討し、関与する分子を同定することを目的とした。

レトロウイルス・ベクターに搭載したヒトの細胞質性ゲルソリン遺伝子を感染させウェスタンブロッティング法を用いた解析で、ゲルソリンの高発現を確認したヒト単球性白血病細胞株 U937 の 2 株 (UG6、UG11) では、親株や対照遺伝子 Neo を含むベクターを感染させた U937 株 (UN5) に比較して、明確な増殖抑制が観察された。ギムザ染色法を用いた形態学的観察では親株および対照細胞株 UN5 では、単芽球がそれぞれ 99% と 98% を占めた。これに対して、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6、UG11 は、均一な単球あるいはマクロファージへの分化が 50-70% の範囲で見られた。nitroblue tetrazolium アッセイにより解析した単球の活性酸素産生活性ならびにナフチルアセテート染色法により調べた非特異的エステラーゼ活性は、親株および対照株 UN5 でそれぞれ約 2% 以下、5% 以下だったのに対し、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6、UG11 では、それぞれ約 70%、50% と高い値を示し、有意な差が示された。また、単球細胞のマーカーである細胞表面抗原 CD11b 発現をフローサイトメトリーを用いて測定したところ、親株および対照株において約 10% だったのに対し、ゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6 および UG11 では、約 40% の発現率を示し有意な差であった。これらの成績により、ゲルソリンの高発現は、U937 単球性白血病細胞株において増殖の遅延と形態学的分化だけでなく機能的分化を誘導することが示された。さらに、単球性白血病細胞の分化のとき発現が高まるとの報告がある転写因子 c-FOS およびサイクリン依存性カインース抑制因子 p21CIP1 の発現を半定量的 RT-PCR で調べた結果、いずれの遺伝子についても親株および対照株 UN5 に比べゲルソリン高発現 U937 細胞株 UG6、UG11 において高い mRNA レベルの亢進が観察された。これらの所見により、ゲルソリンの高発現によって誘導される U937 単球性白血病細胞株における増殖抑制および単球性分化の誘導に、c-FOS 遺伝子 および p21CIP1 両遺伝子の発現亢進が関与している可能性が示された。

公開発表において副査守内哲也教授より、ゲルソリンの分化誘導能は単球性白血病

に限られるか、分化と細胞増殖停止との関連について質問があった。続いて副査葛巻暹教授より、ゲルソリン高発現と転写因子 c-FOS、サイクリン依存性カイネース抑制因子 p21CIP1 発現上昇の関連と機構解析についての質問があった。また主査田中より、ゲルソリン分化誘導能の蛋白質内部位決定について、ゲルソリンに結合するフォスファチジル・イノシトールの関与について、遺伝子発現をノックダウンする実験についての質問があった。これらに対して申請者は、自己の研究結果と文献的知識を基に誠実に、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、アクチン調節蛋白質ゲルソリンにヒト単球性白血病細胞の分化を誘導する機能があることを初めて示したことで高く評価される。今後、実験動物生体での治療実験も加えることによって、単球性白血病に対する分化療法への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。