

ヒト CD34陽性細胞における DOCK180の発現に関する検討

学位論文内容の要旨

高等生物は、外界および自らの体内の様々な情報を捉えて、その情報に適切に対処することによって自らの恒常性を維持している。この恒常性を維持するためには種々の細胞活動が必要不可欠で、その中には細胞運動と食食作用が含まれる。細胞運動は、形態形成や炎症反応、そして癌細胞の転移などの様々な現象に関わっている。また食食作用は、自然免疫として外来生物から生体を防御するために大切な機構である。それらの作用機構に重要な役割を果たしているもののひとつに低分子量G蛋白, Racが挙げられる。Racは比較的小さな蛋白質で、細胞膜に局在し活性化を受けることで多くの細胞内のシグナル伝達に関与することが知られており、特に細胞膜のアクチンを重合化させ細胞運動の原動力となる葉状突起の形成に関わっているとされる。また、細胞の食食能にも重要な役割を担っていることが報告されている。Racをはじめとする低分子量G蛋白はGDPを解離してGTPと結合することで活性化状態になるが、このGDPとGTPの交換反応を触媒するのが guanine nucleotide exchange factor (以下 GEF) と呼ばれる分子群で、ヒトではこれまで60種以上のGEFが同定されている。1996年に癌関連遺伝子産物 Crk の結合蛋白としてクローニングされた DOCK180は、Racに対する特異的 GEF の一つであり、ヒト上皮系細胞株を用いた検討ではインテグリンからの刺激により、この DOCK180 による Rac の活性化がアポトーシス細胞の食食や細胞遊走において重要な役割を果たしていることが判明している。DOCK180は上皮系の細胞に幅広く発現しているが、これまでの研究では末梢血白血球には発現が認められず、その相同体である DOCK2 が相補的に発現していることが報告されている。しかし、その後の研究で血球細胞由来である樹状細胞 (以下 DC) において DOCK180 の発現が認められることが報告された。また末梢血から分離された単球には DOCK180 蛋白の発現は認められなかったものの、*in vitro* での分化誘導後のマクロファージ、DCには食食能の獲得に相応して DOCK180 の発現が誘導されることが判明した。このように血球細胞においても DOCK180 の発現と機能が重要であることが判明してきたが、これまで血液幹細胞を含む各種血球細胞における詳細な DOCK180 の発現検討はなされていない。そこで、本研究では血液幹細胞レベルの細胞であるヒト CD34 陽性細胞を中心に各種血球細胞における DOCK180 の発現の検討を行った。また、*in vitro* でヒト CD34 陽性細胞を顆粒球に分化させることによる DOCK180 の発現の変化についても検討を行った。

1. ヒト CD34 陽性細胞における DOCK180 発現

末梢血から分離したリンパ球、単球を含む末梢血単核細胞、顆粒球、アフエレーシスプロダクト(以下 AP)中の単核細胞(以下 AP 単核細胞)と AP 中の CD34 陽性細胞(以下 AP CD34 陽性細胞)、および骨髄単核細胞と骨髄 CD34 陽性細胞における DOCK180 mRNA の発現量を検討した。その結果、リンパ球及び単球を含む末梢血単核細胞と顆粒球において、DOCK180 mRNA は極めてわずかに検出されたのみであった。一方、AP CD34 陽性細胞、骨髄 CD34 陽性細胞において高い発現を認めた。また、AP 単核細胞、骨髄単核細胞においてそれぞれ DOCK180 mRNA は、ほとんど検出されなかった。

さらに Immunoblotting により DOCK180 蛋白の発現を解析したところ定量 RT-PCR の結果同様、AP CD34 陽性細胞と骨髓 CD34 陽性細胞にのみ発現を認め、AP 単核細胞、骨髓単核細胞には発現を認めなかった。また、末梢血単核細胞と顆粒球にも DOCK180 蛋白の発現は認められなかった。以上より、骨髓および末梢血いずれにおいてもヒト CD34 陽性細胞にのみ DOCK180 が発現していることが確認された。

2. ヒト CD34 陽性細胞の顆粒球分化における DOCK180 の発現変化

ヒト正常末梢血顆粒球においては DOCK180 の発現を認めなかったため、次に DOCK180 の発現を認めたヒト CD34 陽性細胞を *in vitro* で顆粒球へ分化誘導し 7 日目、14 日目に回収し DOCK180 の発現の変化を検討した。定量 RT-PCR 法でヒト CD34 陽性細胞および分化誘導 7 日目、14 日目の DOCK180 mRNA 発現量を解析した結果、純化したヒト CD34 陽性細胞においては DOCK180 mRNA の高い発現を認めたが、分化誘導 7 日目、14 日目と経時的に発現の低下を認めた。次に Immunoblotting により、顆粒球系への分化誘導における DOCK180 蛋白の発現を検討したところ、7 日目、14 日目と経時的に DOCK180 蛋白の発現低下が認められた。

以上の結果より、ヒト CD34 陽性細胞における DOCK180 は顆粒球に分化する過程でその発現が低下することが明らかになった。

3. 急性白血病細胞における DOCK180 の発現

急性骨髄性白血病(以下 AML)患者 4 例の骨髓単核細胞(白血病細胞)から RNA を抽出し DOCK180 mRNA の発現量を検討した。4 例の CD34 陽性 AML 細胞では、正常の骨髓液 CD34 陽性細胞と比較して全例で DOCK180 mRNA の発現は、極めて低かった。また、Immunoblotting でも AML 細胞には DOCK180 蛋白の発現を認めなかった。

以上のように、本研究において私は、初めてヒト CD34 陽性細胞が DOCK180 を発現することを明らかにし、更に *in vitro* での顆粒球系への分化によって消失することを明らかにした。このことは、上皮系細胞における DOCK180 の役割の一つである細胞運動の制御機構が、この骨髓微小環境内における CD34 陽性細胞の移動や細胞間相互作用に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。一方、未分化な状態で微小環境を離れる AP CD34 陽性細胞にも DOCK180 の発現を認めたことは、この非生理的状況では骨髓内での移動という生理的な DOCK180 の働きと無関係なメカニズムによって CD34 陽性細胞が末梢へ移動する可能性を示唆する。しかし実際に動員された AP CD34 陽性細胞は、再度骨髓へホーミングし造血を構築するので、DOCK180 が保持されていることは骨髓微小環境へ戻った際のホーミング能力の維持に関与している可能性も考えられる。また、AML の 4 例では CD34 陽性にもかかわらず、DOCK180 の発現を認めなかった。このことから腫瘍化した AML 細胞は造血幹細胞の持つ表面マーカーの CD34 が陽性であっても基本的に分化能を失った細胞であり、正常な CD34 陽性細胞が骨髓微小環境から受ける分化刺激には依存していないことが想像される。正常 CD34 陽性細胞と AML 細胞における DOCK180 の発現の違いは、難治性 AML に対する分子標的治療として DOCK180 が有用である可能性を示唆している。今後の研究で、これらの関係を明らかにする事により新規治療へ結びつく事が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 島 山 鎮 次

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

ヒト CD34陽性細胞における DOCK180の発現に関する検討

細胞運動、貪食作用の作用機構に重要な役割を果たしているものに低分子量 G 蛋白の Rac がある。Rac は guanine nucleotide exchange factor (以下 GEF) にて活性化されるが、Rac に対する特異的 GEF の一つに DOCK180 がある。これまで DOCK180 は上皮系細胞に発現しているが、血液細胞には発現していないと考えられていた。しかし、先の研究で樹状細胞(以下 DC)、マクロファージには DOCK180 が発現していることが判明した。これまで各種血液細胞における詳細な DOCK180 の発現検討がなされていなかったため、本研究では血液幹細胞レベルの細胞であるヒト CD34 陽性細胞を中心に各種血液細胞における DOCK180 の発現の検討を行った。また、*in vitro* でヒト CD34 陽性細胞を顆粒球に分化させることによる DOCK180 の発現の変化についても検討を行った。まず、末梢血単核細胞、顆粒球、アフェレーシスプロダクト(以下 AP)中の単核細胞(以下 AP 単核細胞)と AP 中の CD34 陽性細胞(以下 AP CD34 陽性細胞)、および骨髓単核細胞と骨髓 CD34 陽性細胞における DOCK180 mRNA の発現量を検討した。その結果、末梢血単核細胞、顆粒球、AP 単核細胞、骨髓単核細胞において、DOCK180 mRNA は極めてわずかに検出されたのみであったが、AP CD34 陽性細胞、骨髓 CD34 陽性細胞において高い発現を認めた。さらに Immunoblotting での DOCK180 蛋白の発現の検討にても同様の結果が得られた。よって、骨髓および末梢血いずれにおいてもヒト CD34 陽性細胞にのみ DOCK180 が発現していることが確認された。次に、ヒト CD34 陽性細胞を *in vitro* で顆粒球へ分化誘導し 7 日目、14 日目に回収し DOCK180 の発現の変化を検討した。定量 RT-PCR 法でヒト CD34 陽性細胞および分化誘導 7 日目、14 日目の DOCK180 mRNA 発現量を解析した結果、ヒト CD34 陽性細胞においては DOCK180 mRNA の高い発現を認めたが、分化誘導 7 日目、14 日目と経時的に発現の低下を認めた。さらに Immunoblotting での DOCK180 蛋白の発現を検討にても、同様な結果が得られた。よって、ヒト CD34 陽性細胞における DOCK180 は顆粒球に分化する過程でその発現が低下することが明らかになった。次に、急性骨髓性白血病(以下 AML)患者 4 例の骨髓単核細胞(白血病細胞)から RNA を抽出し DOCK180 mRNA の発現量を検討した。4 例の CD34 陽性 AML 細胞では、正常の骨髓液 CD34 陽性細胞と比較して全例で DOCK180 mRNA の発現は、極めて低かった。また、Immunoblotting でも同様に AML 細胞には DOCK180 蛋白の発現を認めなかった。よって、腫瘍化した CD34 陽性細胞では、DOCK180 の発現を認めないこと

が明らかになった。以上のように、本研究において、初めてヒト CD34 陽性細胞が DOCK180 を発現することを明らかにし、更に *in vitro* での顆粒球系への分化によって消失することを明らかにした。また、AML の腫瘍化した CD34 陽性細胞では、DOCK180 の発現を認めないことが判明した。これらの結果より、DOCK180 がヒト CD34 陽性細胞の骨髄内での移動に関わっている可能性や腫瘍化の機序に大切な働きを持っている可能性が示唆された。質疑応答では、副査畠山教授から、DOCK180 の発現制御機構について、DOCK180 の遊走能との関わりについて、副査今村教授から、BFU-E、CFU-GM レベルでの DOCK180 の発現量の検討について、AML 細胞の分化レベルでの DOCK180 の発現について、DOCK180 の分子標的治療の target としての可能性について、主査小池教授から、DOCK180 の発現調整について、DOCK180 の細胞接着への関与について、DOCK180 の強制発現による抗腫瘍効果について、微小残存病変のマーカーとなりうる可能性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はこれまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に回答した。

本論文は、DOCK180 が正常ヒト CD34 陽性細胞発現すること、そして腫瘍化したヒト CD34 陽性細胞には発現しないことを明らかとした点で高く評価され、今後、白血病の腫瘍化の病態解明や新規治療の開発に繋がることが期待される。

審査委員一同は、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。