

サイトカイン依存性細胞株 F-36P をモデルとした 血液細胞における DOCK180発現の意義の検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 生体において造血が維持されるのは、骨髄に造血幹細胞が存在するためである。骨髄内の造血支持組織は造血微小環境と呼ばれ、造血幹細胞との相互作用により、造血幹細胞の自己複製、分化、増殖を調節する。この相互作用に関連する分子は多数存在するが、近年低分子量GTP結合タンパク質の1つであるRacが造血幹細胞と骨髄微小環境の接着やホーミングに重要であると報告された。Racはグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と呼ばれるタンパクの働きで活性化されるが、造血幹/前駆細胞におけるRacの活性化に関わるGEFが何であるかは不明であった。近年、純化CD34陽性細胞において、これまで血球細胞には発現していないと考えられていたDOCK180が高発現を示すこと、好中球への分化誘導によりDOCK180発現量が低下することが報告された。DOCK180はRacに対する特異的GEFの一つで、ヒト上皮系細胞株ではインテグリンからの刺激をうけて貪食や細胞遊走に作用することが報告されているが、造血幹/前駆細胞では貪食能や遊走能とは異なる未知の機能にDOCK180が関わっている可能性が考えられた。本研究では、造血幹/前駆細胞におけるDOCK180の機能を明らかにすることを目的として、血液細胞株のスクリーニングを行い、DOCK180を発現するF-36Pを見出した。F-36Pは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロポエチン(EPO)等のサイトカイン存在下でのみ生存できることや、EPO投与で赤芽球系へ分化誘導されることなど、造血幹/前駆細胞がもつ性質を保持していると考え、F-36PにレンチウイルスベクターによるRNA干渉(RNAi)を用いて、DOCK180ノックダウン細胞株を樹立し、DOCK180の機能を検討した。

【方法と結果】 RT-PCRおよびImmunoblottingにより各種血液細胞株におけるDOCK180の発現を検討した。F-36Pは陽性対照とした293T細胞と同等レベルのDOCK180 mRNA発現を認めたが、他の白血病細胞株にはmRNAの発現を認めず、Immunoblottingにおいても同様であった。

次に、RNAiによってDOCK180 mRNAをノックダウンするレンチウイルスベクターを作製し、F-36Pに導入した(DOCK180ノックダウン細胞)。対照として、random oligoを導入したF-36P(MOCK細胞)を作製した。

F-36Pは、EPO存在下で赤芽球系特異的マーカーであるGlycophorin A(GPA)陽性細胞へと分化する。野生株F-36PをEPOによって赤芽球系へと分化誘導し、DOCK180発現量を検討したが、GPA陽性細胞とGPA陰性細胞の間でDOCK180蛋白量には変化を認めなかった。また、DOCK180ノックダウン細胞とMOCK細胞をGPA陰性細胞分画に純化し、EPO存在下で6日間培養したが、どちらの細胞もGPA陽性細胞への分化が認められた。以上から、F-36Pにおける赤芽球系分化に、DOCK180は不要であることが示唆された。

DOCK180ノックダウン細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、MOCK細胞における類円形の形態と異なり、培養プレート上で辺縁が波打つなどの複雑な形態を示したが、トリパンブルーによる観察で死細胞ではないことが確認された。

DOCK180の下流因子であるRacは、細胞周期の制御にも重要であることが知られており、

細胞周期の解析を行った。DOCK180ノックダウン細胞では、野生株F-36P細胞、MOCK細胞と比較して、有意にG2/M期の細胞の増加を認めた。Rac1インヒビターを終濃度50 μ Mで添加した野生株F-36Pは、培養2日目の細胞周期の解析で、未処理の野生株F-36Pと比較しG2/M期細胞の増加が見られた。

次にDOCK180ノックダウン細胞において、GM-CSFレセプターの下流のシグナル伝達に変化があるか検討した。MOCK細胞およびDOCK180ノックダウン細胞に対して6時間のserum starveを行い、GM-CSFで刺激し、AKTおよびERKのリン酸化を検討した。MOCK細胞ではGM-CSF刺激の5分後、および10分後にERK、AKTのリン酸化がともに認められるのに対して、DOCK180ノックダウン細胞においてはAKTのリン酸化は認められず、ERKは刺激後5分で弱いリン酸化を認め、10分後に明瞭となった。

【考察】DOCK180ノックダウン細胞株において、形態異常や、細胞周期上G2/M期細胞の増加を認めた。最近の報告ではRac1が細胞周期の進行を制御し、Racのエフェクター分子、p21-activated kinasesがその機序に関与することが報告されている。DOCK180ノックダウン細胞における細胞周期の変化はこれらの報告と矛盾しない。正常な細胞分裂がおこるためには、細胞周期の各期におけるチェックポイントでの正常性が確かめられなければならない。このうち、G2/M期のチェックポイントでは、DNAの分配において細胞内アクチンの重合にRacが重要な役割を果たす。DOCK180ノックダウン細胞に見られるG2/M期細胞の増加は、DOCK180-Rac経路のノックダウンによりDNA分配に失敗している可能性が考えられ、DOCK180が新しい調整因子となる可能性が示唆された。造血幹細胞は自己複製能を維持するために、骨髄微小環境においてG0/G1期の静止状態であることが要求されるが、その制御にRacと同じRho-GTPaseファミリーに属するCdc42が重要な役割を果たすことが知られている。DOCK180がCdc42同様、細胞周期や造血幹細胞の局在に重要である可能性が考えられるが、DOCK180ノックアウトマウスは胎生致死であり、コンディショナルノックアウトマウスによる検討などが必要と考えられた。

今回、GM-CSFレセプターからAKTあるいはERKへのシグナル伝達経路にDOCK180が関与していることが示された。ERKやAKTは細胞増殖や生存に関連するが、DOCK180ノックダウン細胞に認められた細胞周期および形態の変化にAKTおよびERKの経路が関連する可能性が示唆される。白血病細胞の多くでDOCK180の発現を認めないが、DOCK180がGM-CSFの下流で作用するという結果は、サイトカインに依存したシグナル伝達へDOCK180が関与している可能性を示しており、自律的な増殖能を獲得した白血病細胞との違いを示していると考えられた。

【結論】1) 血液由来細胞株に従来発現しないと考えられてきたDOCK180がF-36Pに発現している。2) DOCK180ノックダウンにより、細胞周期のG2/M期における遅延を認めた。3) EPOによる分化誘導は、DOCK180ノックダウンの影響を受けない。4) GM-CSF刺激の下流で、ERKおよびAKTを介したシグナル伝達にDOCK180が関与している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

サイトカイン依存性細胞株 F-36P をモデルとした 血液細胞における DOCK180発現の意義の検討

細胞運動、細胞形態の維持、細胞増殖などのさまざまな細胞機能には、アクチン骨格の再構成が重要であり、低分子量 G 蛋白質の Rho ファミリーが重要な役割を果たす。この Rho ファミリーに属する Rac を活性化する DOCK180 が、近年造血幹/前駆細胞に高発現していることが明らかとなった。しかし、造血幹/前駆細胞における本遺伝子の機能は不明であり、本研究ではまず血液細胞株を用いて DOCK180 の発現をスクリーニングした。このうち F-36P のみに DOCK180 が強く発現することが明らかとなった。次に、F-36P に対し、レンチウイルスベクターによる RNA 干渉法を用いて DOCK180 ノックダウン細胞株を樹立した。DOCK180 ノックダウン細胞株では、細胞増殖能の低下、細胞形態の異常、細胞周期の G2/M 期での遅延、GM-CSF による刺激後の AKT のリン酸化の消失が認められることが示された。

質疑応答では、副査の笠原教授から、①今回の細胞株を用いた分化誘導実験の結果は一般化してよいか②プライマリーの CD34 陽性細胞を用いた DOCK180 の機能解析は可能か③マウスを用いた機能解析は可能か④PI3K-AKT 経路への DOCK180 の関与は、Rac の GEF としての機能によるものか、について質問があった。これに対して申請者は①F-36P の分化は、GPA 陽性かつ CD34 陽性の段階までで、CD34 陰性細胞へは分化しなかった。今後正常の赤芽球での DOCK180 の発現を検討する必要がある②ヒトプライマリー細胞では、細胞数が不足するため機能解析は困難であった③今後の研究では、DOCK180 コンディショナルノックアウトマウスの使用が、DOCK180 の機能を検討する上で有用と考えられる④Rac2 ノックアウトマウスは、Stem Cell Factor による刺激後の AKT のリン酸化が消失し、また Rac2 の強制発現により AKT のリン酸化が回復することが報告されている。今回刺激の系は異なるが、GM-CSF の下流でも、DOCK180 が Rac を介して AKT のリン酸化に関わると考えている、と回答した。副査の今村教授からは、①各種の血液細胞における分化段階と DOCK180 の発現の関係について、特に赤芽球における発現はどうであるか②白血病細胞では多くの場合に DOCK180 が発現していないが、DOCK180 が白血病の発症に関与しているのか、あるいは発現の消失は二次的なものか③EPO のシグナル伝達への DOCK180 の関与は検討したか、について質問があった。これに対して申請者は①マクロファージでは、DOCK180 が再び発現してくるが、好中球では発現せず、また、赤芽球における DOCK180 の発現は、今後検討する必要がある②F-36P における DOCK180 のノックダウンで増殖能が低下したことは、白血病細胞の多くに DOCK180 が発現しないことと一見矛盾するが、今回、GM-CSF レセプターの下流で DOCK180 が作用する結果が得られており、このシグナル伝達経路の違いによるのではないかと考えられる。現在のところ白血病における DOCK180 の発現消失は二次的で、白血病化に関係しないのではないかと考えている③EPO のシグナル伝達は今回検討していない、と回答した。主査の小池教授から

は、①F-36Pにおける DOCK180 の構造異常の有無を検討しているか②DOCK2 が DOCK180 の機能を相補している可能性はあるか③今後の展望に関して、の質問があった。これに対して申請者は①今回 DOCK180 遺伝子の変異は検討しておらず、変異の有無に関しては、配列決定が必要である②DOCK2 と DOCK180 を共に持つ細胞は、正常の CD34 陽性細胞を除くと現時点で F-36P のみである。DOCK2 ノックアウトマウスのリンパ球では、AKT のリン酸化に異常が無かったことが報告されており、両者を血液細胞がどのように使い分けるのか今後検討が必要である③白血病細胞の多くは DOCK180 を発現しないと考えられ、正常の CD34 陽性細胞との違いを利用して微小残存腫瘍の診断に応用が期待される、と回答した。

本研究は、血液細胞における DOCK180 の機能解析を行った初めての報告であり、DOCK180 ノックダウン細胞株に認められたさまざまな異常から、血液細胞において本遺伝子が重要な機能を持つことが示された。今後 DOCK180 の発現を指標として白血病における微小残存腫瘍の検出や再発の早期診断、白血病細胞の体内動態の解析などに臨床応用され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。