

ヒト成熟 B 細胞株における SDF-1 刺激下流での DOCK2 の役割の検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】骨髄で産生された未熟 B 細胞は、骨髄から二次リンパ組織へ、また二次リンパ組織内で移動し分化するが、このときに細胞の遊走および変形を必要とする。低分子量 G 蛋白のひとつである Rac は、GDP を GTP に置換されることで活性化され、細胞膜のアクチンを重合化することで細胞の遊走および変形に関与するが、今回着目した DOCK2 はマウス未熟 B 細胞での Rac における GDP の GTP への置換を担っている。すなわち、マウス未熟 B 細胞では、ケモカインである SDF-1 の刺激により、ケモカインレセプターである CXCR4 を介して Rac が活性化され、細胞の遊走・変形が惹起されるが、DOCK2 ノックアウトマウスの B 細胞では、アクチンの重合化がほとんど見られなくなり、二次リンパ組織への細胞遊走が見られず、リンパ濾胞が高度に低形成となる。従って、DOCK2 ノックアウトマウスを用いた研究では、リンパ濾胞を経て成熟した記憶 B 細胞が存在しなくなるため、この細胞における DOCK2 の働きを検討することは困難である。また、ヒトとマウスにおけるシグナル伝達システムが必ずしも同一ではない。そこで本研究では、ヒト成熟 B 細胞株である Raji 細胞を用いて、ヒト成熟 B 細胞における DOCK2 の役割を、SDF-1 による刺激を中心に検討することを目的とした。

【方法と結果】RNAi によって DOCK2 mRNA をノックダウンするため、レンチウイルスベクターを用いて DOCK2 siRNA を Raji 細胞へ導入した。標的配列を 2 種類決定し、siRNA をコードしたベクターを挿入したレンチウイルスを産生し、Raji 細胞への導入を行った (以下 DOCK2 ノックダウン細胞)。また、陰性対照として、random oligonucleotide を持つベクターを挿入したウイルスを導入した細胞を用いた (以下 Mock 細胞)。レンチウイルスにはレポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させており、siRNA が導入された細胞を GFP 陽性分画にソーティングすることで純化した。ウエスタンブロット法で確認したところ、2 種類の DOCK2 ノックダウン細胞での DOCK2 蛋白の発現は、Mock 細胞に比して 70% 程度低下していた。フローサイトメトリーで 2 種類の DOCK2 ノックダウン細胞における CXCR4 の発現を確認したが、Mock 細胞と同等で発現変化を認めなかった。SDF-1 刺激による細胞形態変化を倒立顕微鏡で観察したところ、Mock 細胞では細胞周辺の波打ちが見られたのに対して、DOCK2 ノックダウン細胞では形態変化に乏しかった。トランスウェルマイグレーションアッセイは以下に述べる方法で行った。すなわち、24 穴プレートに SDF-1 を含むバッファーを投入した後、ケモタキセル 24 5micron を上置き、バッファーに浮遊させた Raji 細胞をケモタキセルへ投入し静置した後、ケモタキセルを取り除き、プレート中のバッファーを回収し、ケモタキセルから遊走した細胞数を FACSCalibur で計測した。2 種類の DOCK2 ノックダウン細胞での遊走は、いずれも Mock 細胞と比較し有意に減少した。また、CXCR4 からのシグナルを阻害するため pertussis toxin (PTx) を添加した Mock 細胞では、遊走細胞の割合が DOCK2 ノックダウン細胞や Rac 阻害剤を添加した細胞よりも低い傾

向にあった。シュードエンペリオポレーシスアッセイは以下のように行った。すなわち、マウスストローマ細胞である MS-5 を播種したプレートへ液体培地に浮遊させた Raji 細胞を添加し、表面を洗浄することで MS-5 下層へ潜り込まなかった細胞を取り除いた後に細胞を回収し、MS-5 下層へ潜り込んだ Raji 細胞の数を FACSCalibur で計測した。Mock 細胞と比較して、2 種類の DOCK2 ノックダウン細胞ではいずれも潜り込みが有意に低下した。次に、SDF-1 刺激による Rac 活性化を確認するため GTPase アッセイを行った。すなわち、Raji 細胞を SDF-1 で刺激し lysis buffer で溶解して得た蛋白抽出液を、アガロースビーズと接合させた PAK1-RBD 融合蛋白と混和させた後、アガロースビーズと結合した Rac-GTP を沈降させ、得られた Rac-GTP 蛋白をウエスタンブロット法にて検討した。2 種類の DOCK2 ノックダウン細胞での Rac 活性化は、Mock 細胞と比較し減弱していた。最後に、SDF-1 刺激下での Akt ならびに ERK リン酸化の検討を、Raji 細胞を SDF-1 で刺激した後 lysis buffer で溶解し、得られた蛋白抽出液のウエスタンブロット法で行った。Mock 細胞、および DOCK2 ノックダウン細胞 2 種類のいずれにおいても ERK および Akt のリン酸化のタイミングおよび程度に差を認めなかった。

【考察】今回の検討で、ヒト成熟 B 細胞株において、DOCK2 が SDF-1/CXCR4 刺激による細胞遊走において重要な役割を果たしていることが示された。SDF-1 によって刺激された Raji 細胞の変形および組織への侵入、細胞遊走、さらには SDF-1 分泌細胞下層への潜り込み現象において DOCK2 が重要である事が、それぞれ位相差顕微鏡による観察、トランスウェルマイグレーションアッセイ、およびシュードエンペリオポレーシスアッセイで確認された。また、DOCK2 ノックダウン細胞では Rac の活性化が低下していることが確認され、さらに Rac 阻害剤を添加した Mock 細胞と DOCK2 ノックダウン細胞との遊走能低下はほぼ同程度であったことから、DOCK2 ノックダウン細胞で見られた現象は Rac 活性化の低下を介していることが示された。さらに DOCK2 ノックダウン細胞では、PTx 添加 Mock 細胞と比較して遊走能が残存し、SDF-1 での刺激による細胞遊走に DOCK2 を介さない系が存在する可能性が考えられた。SDF-1 による刺激は、血液細胞の遊走のみならず、生存、増殖、分化、および接着に関与するとされ、これらのシグナルを介する経路が報告されているが、ヒト成熟 B 細胞において、DOCK2 は SDF-1 での刺激による PI3K/Akt、ならびに MAPK/ERK の活性化に関与しない事が示された。成熟 B 細胞の腫瘍化によって発症する悪性リンパ腫の組織浸潤は、正常 B 細胞同様、SDF-1 が働いている事が示されており、また骨髄や二次リンパ組織では、腫瘍細胞が周囲の細胞からの支持によって、化学療法や免疫療法に対して耐性を獲得する事が知られているが、DOCK2 の阻害で組織への腫瘍細胞の潜り込みを抑制する事が造血管悪性腫瘍治療へ応用される事が期待される。今回の研究では、検討が細胞株に限られており、健常人由来成熟 B 細胞における DOCK2 の機能解析、ならびに正常細胞と腫瘍細胞との間での DOCK2 活性の差などが今後の検討課題である。

【結語】1. ヒト成熟 B 細胞において DOCK2 が SDF-1 による遊走に関与する事を示した。2. ヒト成熟 B 細胞において DOCK2 が Rac の活性化を制御する事が確認された。3. ヒト成熟 B 細胞において Akt ならびに ERK の活性化に DOCK2 が関与しない事が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 藤 田 博 美

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

ヒト成熟 B 細胞株における

SDF-1刺激下流での DOCK2の役割の検討

低分子量 G 蛋白のひとつである Rac は、GDP を GTP に置換されることで活性化され、細胞膜のアクチンを重合化することで細胞の遊走および変形に関与するが、今回着目した DOCK2 はマウス未熟 B 細胞での Rac における GDP の GTP への置換を担っている。しかし、B 細胞における DOCK2 の機能解析は、マウス未熟 B 細胞のみで行われており、ヒト成熟 B 細胞ではなされていない。そこで本研究では、ヒト成熟 B 細胞株である Raji 細胞を用いて、ヒト成熟 B 細胞における DOCK2 の役割を、骨髄やリンパ節で分泌されるケモカインである SDF-1 による刺激を中心に検討することとした。

研究には、レンチウイルスベクターを用いて DOCK2 siRNA を導入し、DOCK2 蛋白の産生をノックダウンした Raji 細胞を用いた。ウエスタンブロット法で確認したところ、DOCK2 ノックダウン細胞での DOCK2 蛋白の発現は、Mock 細胞に比して 70%程度低下していた。次に、SDF-1 刺激による細胞形態変化を観察した。コントロール細胞では SDF-1 刺激に伴い細胞周辺の波打ちが見られ、またアクチンの重合化・局在化がファロイジン染色で確認されたのに対して、DOCK2 ノックダウン細胞では形態変化に乏しかった。次に、SDF-1 ならびにボイデンチャンバーを用いたトランスウェルマイグレーションアッセイでケモカイン濃度勾配に従う細胞の遊走能を観察したところ、DOCK2 ノックダウン細胞での遊走は、コントロール細胞と比較し有意に減少した。また、SDF-1 の受容体である CXCR4 からのシグナルを阻害するために百日咳毒素を添加したコントロール細胞では、遊走細胞の割合が DOCK2 ノックダウン細胞や Rac 阻害剤を添加した細胞よりも低下していた。次に、Raji 細胞の骨髄ストローマ細胞下層への潜り込みを観察する目的でシュードエンペリオポレーションアッセイを行ったところ、コントロール細胞と比較して、DOCK2 ノックダウン細胞ではストローマ細胞下層への潜り込みが有意に低下した。次に、GTPase アッセイで SDF-1 刺激による Rac 活性化をウエスタンブロット法にて検討したところ、DOCK2 ノックダウン細胞での Rac 活性化は、Mock 細胞と比較し減弱していた。最後に、SDF-1 刺激下での Akt ならびに ERK リン酸化をウエスタンブロット法で検討したところ、DOCK2 ノックダウン細胞での ERK および Akt のリン酸化のタイミングおよび程度はコントロール細胞との間に差を認めなかった。以上より、今回の検討で、ヒト成熟 B 細胞株において、SDF-1/CXCR4 刺激による細胞遊走、すなわち細胞の変形、組織への侵入、細胞遊走、SDF-1 分泌下層への潜り込み現象において、DOCK2 が重要である事が確認され、また、DOCK2 ノックダウン細胞では

Rac の活性化が低下していることが示された。さらにヒト成熟 B 細胞株において、SDF-1 での刺激による細胞遊走に DOCK2 を介さない系が存在する可能性が考えられた。

成熟 B 細胞の腫瘍化によって発症する悪性リンパ腫の組織浸潤は、正常 B 細胞同様、SDF-1 が働いている事が示されており、また骨髄や二次リンパ組織では、腫瘍細胞が周囲の細胞からの支持によって治療耐性を獲得する事が知られているが、今回の研究から、DOCK2 の阻害によって腫瘍細胞の浸潤を抑制する事が造血器悪性腫瘍治療へ応用される事が期待される。

質疑応答では、副査の藤田博美教授から Rac 阻害剤の有効性、阻害剤を添加した細胞のトランスウェルマイグレーションアッセイの結果に対する考察、ならびに今回の知見を悪性腫瘍治療へ応用する際の方法論についての質問があった。次いで副査の今村雅寛教授から血液細胞における DOCK2 の特異性、DOCK2 とセレクトインの活性との関係、B 細胞の分化段階における DOCK2 発現の変化、ならびに支持組織からの SDF-1 分泌亢進の機序についての質問があった。さらに、主査の小池隆夫教授より、今回の検討を B 細胞で行った理由、DOCK2 の細胞生存への関与、今回の知見を悪性腫瘍治療へ応用する際の具体的な戦略についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の文献報告や未発表であった実験結果などを引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、マウス未熟 B 細胞でのみ検討されていた DOCK2 の機能をヒト成熟 B 細胞で解析した事が高く評価され、今後の B 細胞の運動・成熟の解析、ならびに B 細胞性悪性腫瘍への治療応用が期待される。

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。