

平成21年5月 1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890061  
 研究課題名（和文） 造血と白血病発症におけるIL-3シグナルに関与するXbp-1の機能解析  
 研究課題名（英文） The function of Xbp-1 under the IL-3 signaling in hematopoiesis and leukemogenesis.

## 研究代表者

倉田 盛人 (KURATA MORITO)  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：40451926

## 研究成果の概要：

IL-3に関与する遺伝子としてER ストレスタンパクであるXbp1(X-box binding protein 1)を同定した。Xbp1はIL-3に発現・活性化がコントロールされており、ノックダウンすると細胞増殖能の低下、apoptosisの誘導が確認された。また、活性型のXbp1を誘導すると抗apoptosis作用が見られ、同時に、細胞周期の停止と骨髄系への分化が確認された。よって、Xbp1はIL-3にコントロールされ、サイトカインシグナルと密接な関係を持ち、細胞の分化・増殖に大きく関わっている。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医科学・

キーワード：白血病、IL-3、ER ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

現在、多くの人間が白血病などの造血器腫瘍に苦しんでいる。その原因としては染色体の転座が多く報告されているが、転座の結果生じるキメラタンパクのみでは白血病発症のすべてを説明するには至っていない。白血病は骨髄の比較的未成熟な細胞を発生起源

としており、通常骨髄において未成熟な多分化能もつ細胞はさまざまなサイトカインの刺激をうけて分化増殖している。

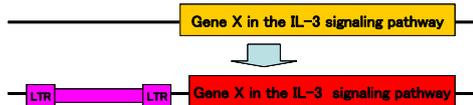
近年 IL-3 シグナルに使われている JAK2 に mutation をもつことにより骨髄増殖性疾患を来すとの報告が見られる。このことは、JAK2 に mutation があることにより骨髄幹細

胞が IL-3 などのサイトカインの制御から逃れ自立的に増殖した結果と考えられるであろう。故に、IL-3 シグナルが腫瘍化にとっても重要な因子と考え、この IL-3 に着目して研究を行う。

## 2. 研究の目的

IL-3 依存性であるマウスの骨髄細胞由来の細胞株 BaF3 を用いてレトロウイルスを感染させることにより insertional mutagenesis 引きおこし、IL-3 シグナルに関するある遺伝子 X を活性化させる。

### Retroviral insertional mutagenesis



レトロウイルス挿入によって活性化されたある遺伝子 X により、IL-3 非存在下において増殖できるクローンを獲得する。実際、3 つのクローンが得られ、inverse PCR・Splinkette PCR 法を用いて、そのうちの 1 個のクローン (BaF3-B6F) より Xbp1 (X-box binding protein 1) の上流にウイルス挿入を確認した。Xbp1 は ER ストレスに応答して誘導される転写因子として知られており、B 細胞が免疫グロブリンを大量に作る必要がある形質細胞に分化する段階でとても重要な働きをすることが報告されている。Xbp1 には、スプライシングを受けた活性型とスプライシングを受けていない非活性型が知られており、活性型は核に移行し強い転写活性能力をもつ。また最近では、B 細胞特異的なプロモーターと組み合わせて Xbp1 の活性型を用いて transgenic モデルを作成すると多発性骨髄腫の形成が見られるとの報告も見られる。

## 3. 研究の方法

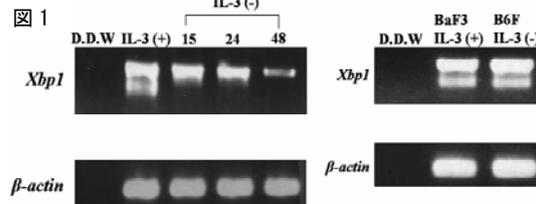
- (1) RT-PCR を用いて IL-3 を取り除いた時の *Xbp1* の発現を解析する。また、IL-3 を取り除いた状態から IL-3 を再添加し、ウェスタンブロットにより *Xbp1* とそれに関与する分子の発現を解析する。
- (2) *Xbp1* が IL-3 シグナルにどのように関与しているかを、*Xbp1* のプロモーター領域を検索しルシフェラーゼアッセイを行うことで上流の転写因子を決定する。
- (3) siRNA を用いて、*Xbp1* をノックダウンする。今回、*Xbp1* の近傍にウイルスの挿入のあったクローン BaF3-B6F を用いて IL-3 のない状態、また、IL-3 を加えた状態での細

胞増殖・アポトーシスを観察する。また、親株にも同様の siRNA を行う。

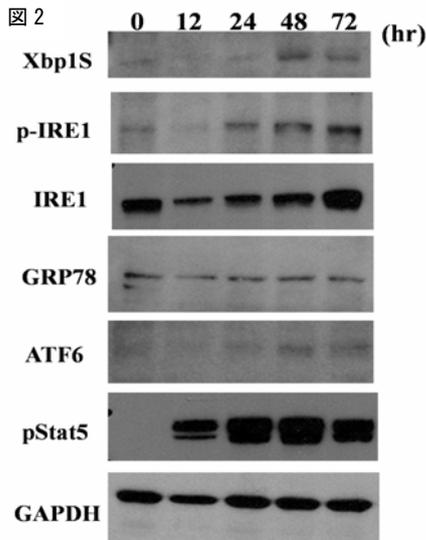
- (4) 活性型 *Xbp1* を遺伝子導入し、IL-3 を取り除いた状態での細胞増殖能、抗アポトーシス作用について解析する。また、IL-3 を添加した状態においても、細胞の変化を観察する為に、細胞周期・形態学的変化を観察する。また、フローサイトメーターを用いて表面マーカーの解析を行った。

## 4. 研究成果

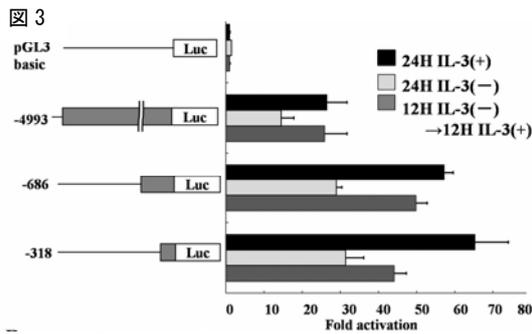
(1) BaF3 において、IL-3 を取り除いた状態で *Xbp1* の発現を RT-PCR を用いて解析した。*Xbp1* にはスプライシングを受けた活性型が知られており、今回の図 1 において下のバンドが活性型に相当する。IL-3 を取り除くと、活性型の発現の低下が見られた。上のバンドはスプライシングを受ける前の *Xbp1* であるが、その発現も低下している。また、今回得られたクローン (B6F) では、IL-3 がいない状態でも両方の型の発現が見られる (図 1)。



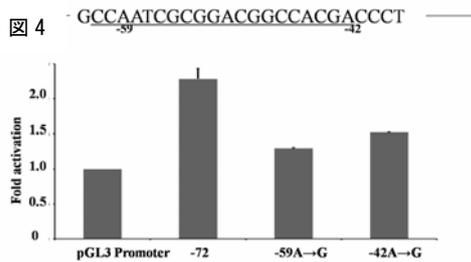
次に、ウェスタンブロットを持ちいて、IL-3 を取り除いた状態から IL-3 を再添加すると、活性型 *Xbp1S* の発現が 24 時間～48 時間後に観察された (図 2)。また、*Xbp1* を活性化 (スプライシング) する IRE1 の活性化 (リン酸化) も *Xbp1* の発現に先行してリン酸化見られ、発現自体も IL-3 によって誘導されている。また、*Xbp1* を誘導することで知られている ATF6 の発現も誘導されていることがわかった。また、IL-3 下流と知られている *stat5* はすぐにリン酸化が回復している。この結果より *Xbp1* は IL-3 により発現のコントロールを受けているのと同時に、スプライシング (活性化) もコントロールしていることが示された。



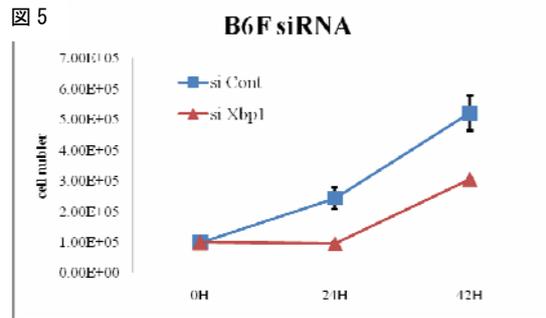
(2) ルシフェラーゼアッセイにより、xbp1 の上流に IL-3 に反応する要素が見られる。IL-3 を 24 時間添加すると活性が見られ、24 時間取り除くと活性の低下が見られる。また、12 時間 IL-3 を取り除いた状態から、再添加するとルシフェラーゼの活性の回復が見られる (図 3)。



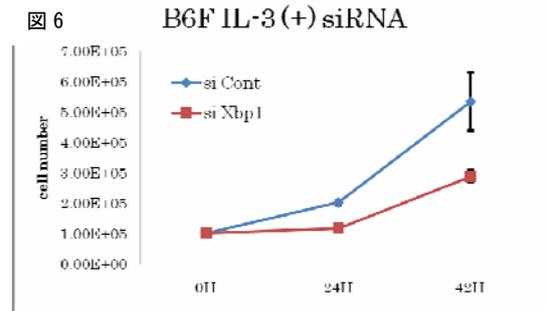
Xbp1 上流に ERSE (ER-stress responsive element) が見られ、変異を誘導すると活性の低下が見られる (図 4)。



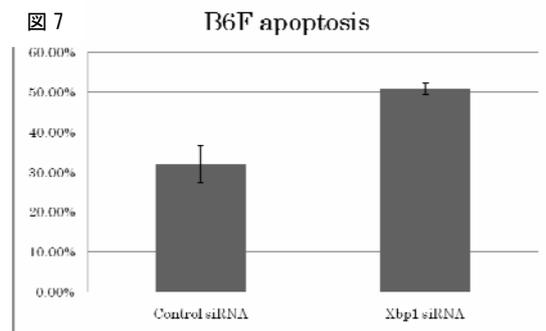
(3) BaF3-B6F も用いて siRNA でノックダウンを行う。その結果、siRNA により Xbp1 を阻害すると細胞増殖能の阻害が見られた (図 5)。



この細胞に IL-3 を再添加しても siRNA の効果はキャンセルされなかった (図 6)。

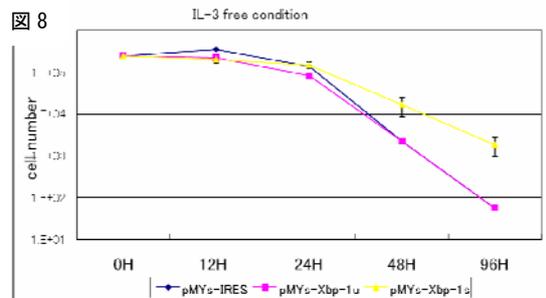


親株の BaF3 においても同様の結果が得られた。また、siRNA によりアポトーシスの誘導も確認された (図 7)。



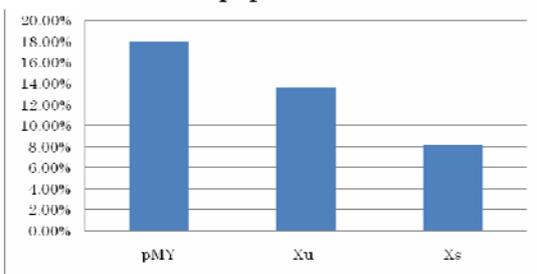
これらの結果より、Xbp1 は IL-3 シグナルの下流で、細胞の増殖に関与していることが判明した。

(4) 活性型 Xbp1 を強制発現させると、IL-3 を取り除くと、コントロールベクター (pMY) やスプライシングを受けていない Xbp1U と比較して、生存細胞数の増加が見られる (図 8)。



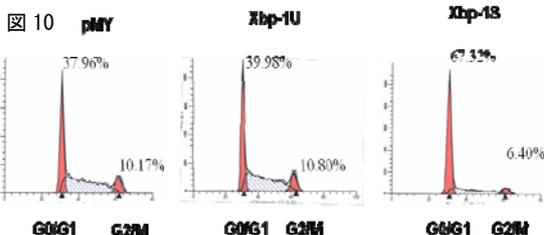
この時に、IL-3 を取り除いてからアポトーシスを観察すると、

図9 BaF3 apoptosis IL-3 (-)

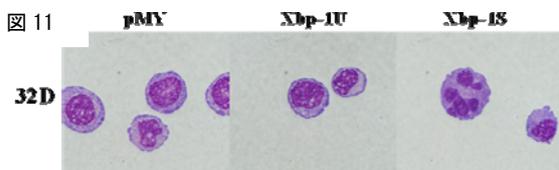


活性化型 Xbp1S(Xs)を誘導した細胞では、IL-3を取り除いた状態でアポトーシスの抑制が見られる(図9)。

また、細胞増殖能を評価する目的で、細胞周期の解析を行った(図10)。



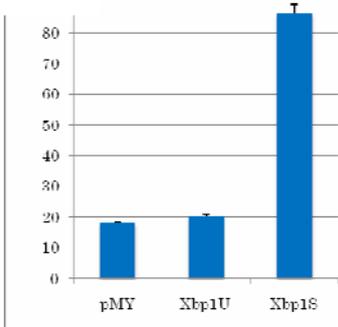
Xbp1Sを誘導するとG1の割合の増加が見られる。また、細胞周期と細胞分化には密接な関係が知られており、IL-3依存性の骨髄の幼弱な細胞株である32Dを用いて、Xbp1Sを誘導し、形態学的変化を観察した(図11)。



その結果、Xbp1Sを誘導した細胞では、核の分葉や細胞質にアズール顆粒が見られる。骨髄球系への分化が見られる。

骨髄球への分化を確認する為に、フローサイトメーターにより、表面マーカーの解析を行った。

図12



その結果、Xbp1Sを誘導した細胞では、骨髄球系のマーカーであるMac-1の発現上昇が見られた(図12)。

これらの結果より、Xbp1はIL-3に発現が

コントロールされており、活性化も制御されている。また、Xbp1は造血細胞において骨髄分化に関与し、増殖能と関連し白血病への関連が示唆される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 倉田盛人、北川昌伸、中村卓郎 白血病発症におけるERストレスXbp-1の機能第98回日本病理学会総会 2009年5月1日 京都
- ② Morito Kurata, Masanobu Kitagawa, Takuro Nakamura. 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Identification of the Xbp-1, ER-stress protein, as a key molecule of the IL-3 signaling in the hematopoietic cell. 2008年10月28日 名古屋
- ③ 倉田盛人、北川昌伸、中村卓郎 血液細胞におけるIL-3シグナルとERストレス蛋白Xbp-1の役割。第97回日本病理学会総会 2008年5月15日 金沢
- ④ Morito Kurata, Masanobu Kitagawa, Takuro Nakamura. Identification of the Xbp-1 as a key molecule of the cytokine signaling in the growth of the hematopoietic cell. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association. 2007年10月5日 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉田 盛人 (KURATA MORITO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40451926

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

中村卓郎 (Nakamura Takuro)

財団法人癌研究会癌研究所発がん研究部部長

研究者番号：00180373

北川 昌伸 (Kitagawa Masanobu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10177834