

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890251
 研究課題名（和文） 赤白血病モデル細胞の分化および腫瘍化におけるスフィンゴシンキナーゼ 1 発現の関与
 研究課題名（英文） HMBA-induced erythroid differentiation decreases sphingosine kinase 1 gene expression of a mouse erythroleukemia cell line
 研究代表者
 祖父江 沙矢加（SOBUE SAYAKA）
 中部大学・生命健康科学部・助手
 研究者番号：50513347

研究成果の概要（和文）：フレンド細胞はマウス赤白血病の細胞株であり，HMBAにより赤芽球系細胞に分化する。今回私たちは分化誘導とSPHK1発現量との関連について転写レベルでの機序の解明を目指して研究を行った。分化誘導抵抗性株では分化誘導後もSPHK1発現量は高く維持されており，さらに造血系特異的遺伝子の転写調節に関わるMybの発現量も高いことが確認された。赤白血病の分化誘導におけるSPHK1発現量の調節にはMybが関与していることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Friend cell is a mouse erythroleukemia cell line inducible to the erythroid lineage with HMBA. Increased expression of sphingosine kinase 1 (SPHK1), a sphingolipid metabolic enzyme, has been reported in Friend cells. In the current study, we analyzed the mechanism of its SPHK1 overexpression and the sequential changes during HMBA-induced differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：SPHK1，赤白血病，分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

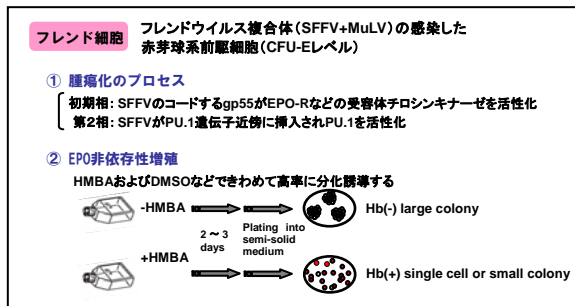
本研究では，その発現が腫瘍化と密接に関わっており診断や治療への応用が期待されているスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の発現調節機序の解明を目指している。SPHK1 発現が細胞の分化に一定の役割を担

っていることから，分化誘導療法のモデルである赤白血病に焦点を絞り，SPHK1 を標的とした臨床診断技術の確立および白血病の新規分子標的療法開発の可能性を検討する。

2. 研究の目的

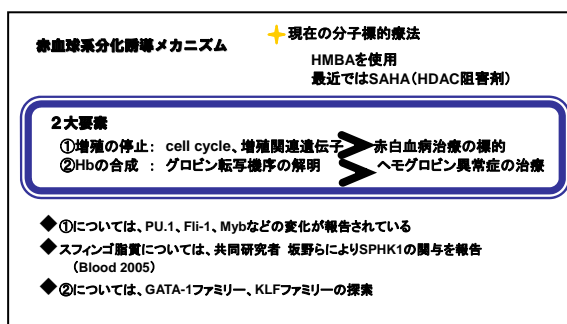
白血病での SPHK1 発現上昇の報告は、タンパクや活性レベルではこれまでにいくつかの報告があるが、詳細な発現調節機構についての解析はいまだなされていない。そこで本研究では、赤白血病モデル細胞株を用いて、SPHK1 発現量の調節機構を転写調節の観点より詳細に解析を行う。

(1) マウス赤白血病細胞株を用いて分化誘導処理後の SPHK1 の活性の変化を検討し、SPHK1 が細胞の増殖、分化において果たす役割を明らかにする。



(2) BCR/ABL 融合遺伝子により腫瘍化している K562 細胞株 (ヒト赤白血病細胞株) およびこの遺伝子を導入した Ba/F3 細胞株を用いて慢性骨髄性白血病の病態と SPHK1 発現に着目し、SPHK1 の発現量の変更によってこの赤白血病細胞が示す変化を解析する。

(3) SPHK1 を標的とした白血病の新規分子標的療法開発の可能性を検討する。



(4) (2)をさらに発展させ、各種血液疾患関連癌分子と SPHK1 の発現に検討を加え、SPHK1 と白血化との関連の有無を個々の癌関連遺伝子ごとに明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 赤白血病分化誘導モデルとしてのマウスフレンド細胞における SPHK1 の関与

① 分化誘導剤 HMBA でフレンド細胞を処理

したときの SPHK1, および関連する転写因子発現量の経時的な変化をウェスタンブロット法によりタンパクレベル, リアルタイムPCR法により mRNA レベルで検討する。

② 野生株, 分化誘導耐性株における SPHK1 転写活性を測定し, 転写因子結合予測領域を決定する。

③ フレンド細胞での SPHK1 転写を調節している転写因子を EMSA, CHIP assay により決定する。

(2) ヒト赤白血病細胞株 K562 および BCR/ABL 遺伝子導入細胞株 Ba/F3 における SPHK1 発現と BCR/ABL 遺伝子発現との関連

① BCR/ABL 転座が見られる細胞では SPHK1 発現量が高いという報告があり, 慢性骨髄性白血病患者由来細胞株, K562 もその一例である。この K562 に加えてさらに, BCR/ABL 転座のみられないマウス細胞株, Ba/F3 細胞に BCR/ABL 遺伝子を安定的に発現させ, モデル細胞を作製する。

② これら BCR/ABL 遺伝子安定発現細胞における SPHK1 発現量を測定する。

③ BCR/ABL 遺伝子が SPHK1 発現量を調節する機序について確認する。

④ これら安定発現株に対する SPHK1 発現阻害の細胞生物学的効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 分化誘導抵抗性株を作製し, HMBA で処理前後での SPHK1 発現量をタンパク, mRNA レベルで検討した。野生株は分化誘導後に SPHK1 発現量が急激に低下するのに対して, 抵抗性株では SPHK1 発現量は維持された。これと同様に, 抵抗性株では Myb の発現量も維持されていたが, 野生株では分化誘導後に Myb 発現量が急激に低下した。この結果から, 分化誘導抵抗性と SPHK1 発現量, Myb 発現量の間に関連性があることが示唆された。

(2) フレンド細胞に安定的に SPHK1 (Wt) または不活性型 SPHK1 (DN) を過剰発現させた細胞株作製し, 血清除去後の細胞生存について検討した。Wt 株では血清除去後も増殖し赤芽球系細胞への分化が抑制されていたのに対し, DN 株では増殖が抑えられアポトーシスが誘導された。このことから SPHK1 が細胞にとって抗アポトーシス作用をもたらす結果として白血化を導くことが確認できた。

(3)SPHK1 の転写レベルでの発現調節機序を解明するために、マウス SPHK1 のプロモーター領域を採取した。まず、5' -RACE 法により転写開始点を決定した。フレンド細胞における SPHK1 の転写開始点は Web で報告のある 2 点のうち a タイプのみであることが確認された。転写開始点より上流約 1.5kb のプロモーター領域を PCR 法により採取し、pGL3 レポーターベクターに組み込んだ。さまざまな長さの deletion mutant も同時に作製した。これらを用いたルシフェラーゼアッセイの結果から、転写に最も重要な最小領域を特定し、その領域はコンピューターサーチの結果から Myb または ETS モチーフが存在することも確認できた。

(4)当初予定していたヒト赤白血病細胞株 K562 および BCR/ABL 遺伝子導入細胞株 Ba/F3 における SPHK1 発現と BCR/ABL 遺伝子発現との関連は、実験計画の変更により遂行できなかった。

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 6 件)

- ① ①Sobue S, Nemoto S, Murakami M, Ito H, Kimura A, Gao S, Furuhashi A, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Ito Y, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T.
Implications of sphingosine kinase 1 expression level for the cellular sphingolipid rheostat: relevance as a marker for daunorubicin sensitivity of leukemia cells.
Int J Hematol. 2008;87:266-275. 査読有
- ② Iwasaki T, Murakami M, Sugisaki C, Sobue S, Ohashi H, Asano H, Suzuki M, Nakamura S, Ito M, Murate T.
Characterization of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia by immunostaining of p53 and hemoglobin F and karyotype analysis: differential diagnosis between refractory anemia and aplastic anemia.
Pathol Int. 2008;58:353-360. 査読有
- ③ Sobue S, Murakami M, Banno Y, Ito H, Kimura A, Gao S, Furuhashi A, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T.
v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding

proteins.

Oncogene. 2008;27:6023-6033. 査読有

- ④ Furuhashi A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Kikuchi R, Iwasaki T, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T.
GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines.
Leukemia. 2009;23:1270-1277. 査読有
 - ⑤ Ito H, Murakami M, Furuhashi A, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Hagiwara K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Banno Y, Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Nozawa Y, Murate T.
Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin.
Biochim Biophys Acta. 2009;1789:681-690. 査読有
 - ⑥ Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Yoshida K, Sobue S, Ichihara M, Takagi A, Kojima T, Tanaka K, Koizumi T, Kyogashima M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T.
ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUP-TFI.
J Neurochem. 2010;112:511-520. 査読有
- [学会発表] (計 6 件)
- ① 祖父江沙矢加, v-Srcによる SPHK1 mRNA 安定化と発現増強, 第 81 回日本生化学会, 2008 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
 - ② Hiromi Ito, Regulatory mechanism of neutral sphingomyelinase 2 gene expression by daunorubicin in MCF-7 cells. 第 81 回日本生化学会, 2008 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
 - ③ Masashi Murakami, ATRA inhibits ceramide kinase transcription through an ATRA-related transcription factor, COUP-TF1, in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells. 第 81 回日本生化学会, 2008 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)

- ④ Siqiang Gao, Mutated Ras-induced phospholipase D1 transcription in a human colon adenocarcinoma cell line, DLD-1. 第 81 回日本生化学会, 2008 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ⑤ 伊藤裕美, ヒト乳癌細胞株 MCF7 細胞における ATRA による NSMase2 の発現調節, 第 82 回日本生化学会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ⑥ 山井一晃, 水素水投与後の血中水素濃度動態の検討, 第 2 回水素研究会学術集会, 2010 年 2 月 12 日, アルカディア市ヶ谷 (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 沙矢加 (SOBUE SAYAKA)
中部大学・生命健康科学部・助手
研究者番号: 50513347

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし