

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591199

研究課題名（和文）白血病におけるRac上流制御因子の役割

研究課題名（英文）Roles of Rac regulators in pathogenesis of leukemia

研究代表者

勝見 章 (Katsumi Akira)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・輸血管理室・医長

研究者番号：80378025

研究成果の概要（和文）：

急性骨髄性白血病(AML)患者の75%程度は一時的に寛解を得るが、高率に再発するため長期無病生存率は20-30%と低い。造血幹細胞の生存には血管周囲細胞、骨芽細胞を中心とした骨髄ニッチへの接着が必須であることが報告されている。白血病細胞は骨髄ニッチに接着することにより化学療法抵抗性を獲得していることが示唆されている。研究代表者らは平成19-20年度基盤研究Cにおいては血球特異的GTPase RhoH低発現はAMLの全生存率と無病生存率において独立した予後不良因子であることを明らかにした。RhoHがRacのインヒビターであること、Racは悪性腫瘍で活性化していることを考え合わせると、Rac活性が高いことが腫瘍残存に影響する可能性が示唆された。RhoHがRacを不活性化するメカニズムについては詳細不明であったが、今回我々はGST-RhoHをbaitとして、血小板細胞質画分を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行い、LC/MS/MSを用いてRhoHエフェクターの同定を試みた。その結果RhoHの新規エフェクター候補の一つとしてT cell activated GAP (TAGAP)を同定した。TAGAPは活性型RhoHに特異的に結合し、細胞内のRacを不活性化した。RhoHはTAGAPのGAPドメインに結合する事が明らかになった。以上のことから白血病細胞の接着、生存のkey moleculeであるRacの上流制御機構が明らかになりつつある。

研究成果の概要（英文）：

Rho GTPases have been widely studied because they are critical regulators of cellular signaling mediated by G-protein-coupled receptors, tyrosine kinase receptors and integrins. RhoH, a member of the Rho family, is specifically expressed in the hematopoietic cells, including bone marrow progenitor, differentiated myeloid and lymphoid cells. RhoH antagonizes Rac, however, the molecules that inactivate Rac downstream of RhoH have not been identified. Here we perform GTP-RhoH affinity column chromatography. Using triple quadrupole liquid chromatography tandem mass spectrometer, 83 different proteins associated with active RhoH were identified. They include Rho GTPase activating proteins (RhoGAP), serine/threonine kinases, phosphatidylinositol kinases, and others. Among them, we focused on T-cell activation RhoGTPase activating protein (TAGAP), which is specifically expressed in the hematopoietic cells. TAGAP binds to RhoH through its GAP domain. Expression of both full length and GAP domain of TAGAP effectively deactivates Rac, whereas GAP domain deleted TAGAP did not. These results suggest that RhoH negatively regulates Rac through TAGAP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000

年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学、細胞接着

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病(AML)患者の75%程度は一時的に寛解を得るが、高率に再発するため長期無病生存率は未だに20-30%と低い。造血幹細胞の生存には血管周囲細胞、骨芽細胞を中心とした骨髄ニッチへの接着が必須であることが報告されている。我々の検討では造血幹細胞と白血病幹細胞はニッチを共有している可能性があり、白血病細胞は骨髄ニッチに接着することにより化学療法抵抗性を獲得していることが示唆されている。RacはRho family Small GTPaseであり、インテグリンを介した細胞-細胞外マトリックス接着、CD44のengagement、SDF-1 α /CXCR4、SCF/C-kit系、古典的Wnt経路、さらにカドヘリンを介した細胞-細胞間接着によって活性化され、細胞骨格、転写活性、細胞の生存、細胞周期調節等を制御している。つまり白血病細胞-骨髄ニッチ間の成長因子、細胞接着からの多彩なシグナルを中継、伝達する重要な分子スイッチがRacである。RacはGTP結合型(活性型)とGDP結合型(不活性型)の間をサイクリングしており、その間の変換を亢進することによりRacを活性化する分子群がグアニンヌクレオチド変換因子(GEF)であり、不活性化する分子群がGTPase activating protein (GAP)である。研究代表者は平成19-20年度基盤C研究でRho family GTPase RhoHの発現をAML90例につき測定し、*RhoH*遺伝子低発現群でAMLの予後が有意に不良であること、多変量解析により*RhoH*遺伝子低発現は全生存率と無病生存率において独立した予後不良因子であることを明らかにした。RhoHがRac活性のインヒビターであること、Racは悪性腫瘍で活性化していることを考え合わせると、Rac活性が高いことが腫瘍残存に影響する可能性がある(Iwasaki T, Katsumi A et al, Eur J Haematol. 2008)。哺乳類では既にRho family GTPaseに対して約69種類のGEF、約80種類のGAPが同定されている。このうち何が白血病(幹)細胞において主流かということについては結論が出ておらず、それを明らかにする事でRac上流を標的とした白血病治療の基盤となりうるものと考えられた。

2. 研究の目的

血球細胞におけるRac活性制御メカニズムを解明することで白血病治療応用への基盤とする事を目的とする。

3. 研究の方法

(i) 廃棄ヒト血小板製剤由来凍結血小板から細胞質画分およびP2画分の調製

凍結血小板に超音波破碎機を用い、氷冷下で超音波破碎の後超遠心し、その上清を細胞質画分として回収した。また得られた沈殿にhomogenize bufferを加え、4℃で1時間振盪し懸濁させた後超遠心し、油層を取り除き得られた上清をP2画分として回収した。

(ii) 硫酸塩析による細胞質画分およびP2画分の濃縮

細胞質画分、P2画分1Lに対し飽和硫酸を加え、細胞質画分は終濃度80%飽和、P2画分は終濃度60%飽和とした後20,000g、4℃で1時間遠心し、沈殿を1×TEDMで溶解した後、透析チューブに移し100倍量の1×TEDMで3時間、3回透析した。得られた透析物を100,000g、4℃で1時間超遠心し、上清を濃縮細胞質画分(cyt AS 0-80画分)または濃縮P2画分(P2 AS0-60)として回収した。

(iii) GST-RhoHおよびその変異体の大腸菌による発現

プラスミドpGEX-2TK-RhoH、pGEX-2TK-RhoH T36Aを塩化カルシウム法によりRosetta gami TM 2 Competent Cellsに導入し、GST-RhoHおよびその変異体の融合タンパク質を発現、精製した(図1)。

(iv) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

GST, GST-RhoH, GST-RhoH-T36A(エフェクタードメイン変異体)をGluthatione sepharoseカラムに固層化し、(ii)で精製したヒト血小板細胞質画分、P2画分をカラムに加え、洗浄の後溶出した。溶出サンプルをLC-MS/MSショットガン法により活性化RhoHのみに結合する分子群を同定した(図2)。

4. 研究成果

MSおよびMS/MSデータをもとに、Swiss-Prot、NCBI等のデータベースを検索して新規エフェクター分子を同定した。解析

結果のうち、細胞質画分および P2 塩溶出画分から GST、不活性型 GST-RhoH T36A をリガンドとした場合に検出されたタンパク質を非特異的結合タンパク質として除外すると、同定されたタンパク質は 83 種類および 68 種類であった。同定されたタンパク質を機能別により分類すると、主に Rho family GAP、ERM タンパク質、serine/threonine kinase、phosphatidylinositol kinases、その他のタンパク質の 5 群となった。また、Rho family GAP 群として TAGAP および ARHGAP18 が同定された。ERM ファミリータンパク質群としては、エズリン (ezrin) およびラディキシン (radixin) が同定された。TAGAP は活性型 RhoH に特異的に結合し、細胞内の Rac を不活性化した。RhoH は TAGAP の GAP ドメインに結合する事が明らかになった。以上のことから白血病細胞の接着、生存の key molecule である Rac の上流制御機構が明らかになりつつある。

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 10 件)

1. Kajiguchi T, Katsumi A et al., Y654 of β -catenin is essential for FLT3/ITD-related tyrosine phosphorylation and nuclear localization of β -catenin. **Eur J Haematol.** 2012 Apr;88(4):314-20. Epub 2012 Jan 4.
2. Katsumi A* et al., Virus-Associated Hemophagocytic Syndrome Caused by Pandemic Swine-Origin Influenza A (H1N1) in a Patient After Unrelated Bone Marrow Transplantation. **J Clin Exp Hematop.** 2011 May;51(1):63-5 (*corresponding author).
3. Katsumi A*, Kaibuchi K et al., FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through $\alpha 4 \beta 1$ integrin and Pyk2 signaling. **Eur J Haematol.** 2011 Mar;86(3):191-8 (*corresponding author).
4. Urakawa H, Nishida Y, Tsukushi S, Katsumi A, Ishiguro N. Glanzmann thrombasthenia detected because of knee hemarthrosis: a case report. **J Pediatr Orthop B.** 2010 Nov;19(6):521-3.
5. Miyawaki Y, Suzuki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Suzuki N, Katsumi A et al., Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an F8-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation. **Int J Hematol.** 2010 Sep;92(2):405-8.
6. Suzuki M, Abe A, Imagama S, Nomura Y,

Tanizaki R, Minami Y, Hayakawa F, Ito Y, Katsumi A et al., BCR-ABL-Independent and RAS/MAPK Pathway-Dependent Form of Imatinib Resistance in Ph-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Cell line with Activation of EphB4. **Eur J Haematol.** 2010 Mar;84(3):229-38.

7. Takefuji M, Asano H, Mori K, Amano M, Kato K, Watanabe T, Morita Y, Katsumi A, Kaibuchi K et al., Mutation of ARHGAP9 in patients with coronary spastic angina. **J Hum Genet.** 2010 Jan;55(1):42-9.
8. Tanaka R, Nakashima D, Suzuki A, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, Takagi A, Murate T, Yamamoto K, Katsumi A et al., Impaired secretion of carboxyl-terminal truncated factor VII due to an F7 nonsense mutation associated with FVII deficiency. **Thromb Res.** 2010 Mar;125(3):262-6.
9. Inamoto Y, Murata M, Katsumi A* et al., Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. **Bone Marrow Transplant.** 2010 Feb;45(2):363-9(*corresponding author).
10. Takagi A, Tanaka R, Nakashima D, Fujimori Y, Yamada T, Okumura K, Murate T, Yamada M, Horikoshi Y, Yamamoto K, Katsumi A et al., Definite diagnosis in Japanese patients with protein C deficiency by identification of causative PROC mutations. **Int J Hematol.** 2009 May;89(4):555-7.

[学会発表] (計 7 件)

国内学会

RhoH downregulates Rac through RhoGAP.
Akira Katsumi, Megumi Goto, Miki Kobayashi, Mitsuo Maruyama, Kozo Kaibuchi, Tomoki Naoe 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 14 日~16 日 名古屋国際会議場

Proteome analysis and biological characterization of novel RhoH effectors
Akira Katsumi, Marina Takasu, Katsuhiro Kato, Tomoki Nishioka, Miki Kobayashi, Mutsuki Amano, Norio Kaneda, Kozo Kaibuchi, Tomoki Naoe 第 72 回日本血液学会学術集会 横浜市 パシフィコ横浜 (会長 檀和夫) 2010 年 9 月 24 日 (金) ~26 日 (日)

急性骨髄性白血病における RhoH 遺伝子発現と予後の関連

勝見 章、岩崎 年宏、清井 仁、石川 裕一、安部 明弘、木下 朝博、直江 知樹 第 7 回 日本臨床腫瘍学会学術集会 2009 年 3 月 20 日 (金) ~21 日 (土)

FLT3/ITD による $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン、Pyk2 シグナルを介した白血病細胞の接着制御
勝見章、清井仁、安部明弘、直江知樹
FLT3/ITD regulates leukemia cell adhesion through alpha4beta1 integrin and Pyk2 signaling

第 68 回日本癌学会学術集会 2009 年 10 月 1-3 日、バシフィコ横浜

FLT3/ITD regulates leukemia cell adhesion through alpha4beta1 integrin and Pyk2 signaling

Akira Katsumi, Hitoshi Kiyoi, Akihiro Abe, Ryohei Tanizaki, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima, Tomoki Naoe

第 71 回日本血液学会学術集会 2009 年 10 月 23-25 日、国立京都国際会館

国際学会

Proteome analysis and biological characterization of novel RhoH effectors
Akira Katsumi, Marina Takasu, Miki Kobayashi, Norio Kaneda, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima, Tomoki Naoe, Kozo Kaibuchi

XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis July 23-28, 2011, Kyoto International Conference Center

FLT3/ITD Regulates Leukemia Cell Adhesion through $\alpha 4 \beta 1$ Integrin and Pyk2 Signaling

Akira Katsumi, Hitoshi Kiyoi, Akihiro Abe, and Tomoki Naoe

51th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition

New Orleans, VA USA, December 5-8, 2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝見 章 (Katsumi Akira)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・輸
血管理室・医長

研究者番号 : 80378025

(2) 研究分担者

貝淵弘三 (Kaibuchi Kozo)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 00169377

(3) 連携研究者

該当なし

図 1 : 凍結血小板からの細胞質画分および P2 画分の精製

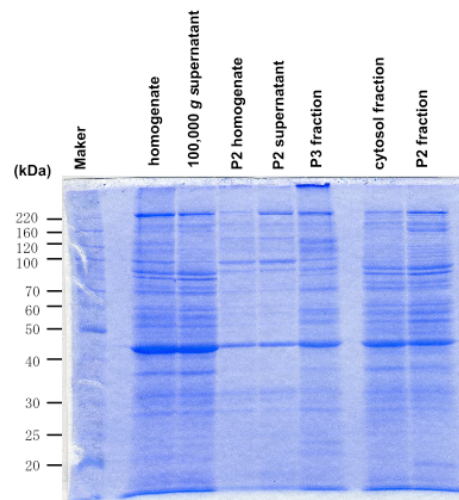


図 2 : LC-MS/MS の概略

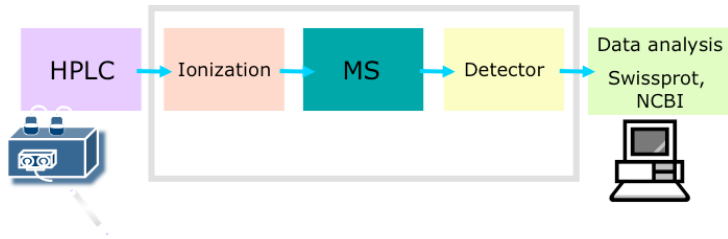


図 3 : RhoH と TAGAP の結合

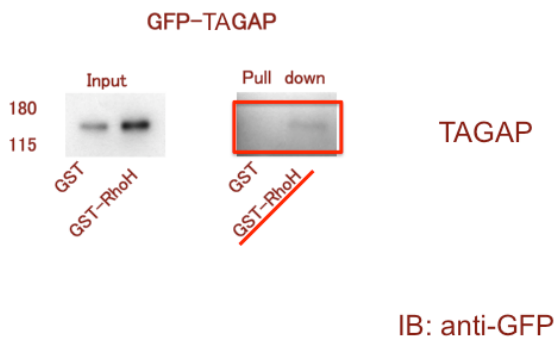


図 4 : RhoH は TAGAP を介して Rac を不活性化
する

