

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791064

研究課題名(和文)白血病髄外浸潤におけるROCKの機能解析と新規標的戦略

研究課題名(英文)Characterization of ROCK and new therapeutic strategy for extramedullary leukemia

研究代表者

大西 千恵(ONISHI, CHIE)

島根大学・医学部・医科医員

研究者番号：30598115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ITD-Flt3変異はCXCL12/SDF1に対する過剰な細胞遊走を引き起こす。私たちは、そのメカニズムを解析した。ITD-Flt3の有無に依存して異なる制御を受ける遺伝子のひとつにRock1が存在し、ITD-Flt3変異は、CXCL12によるRock1発現の抑制を阻害することにより、過剰な細胞遊走をもたらしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ITD-Flt3 enhance cell migration toward the chemokine CXCL12/SDF1. A comparison of the CXCL12-induced gene expression between ITD-Flt3+ and ITD-Flt3- Ba/F3 cells revealed that one of the genes that was differentially regulated by CXCL12 depending on the Flt3 status was Rock1. The expression of Rock1 in the ITD-Flt3+ cells that migrated toward CXCL12 was significantly higher than in ITD-Flt3- cells that migrated toward CXCL12. In ITD-Flt3- cells, Rock1 expression and MYPT1 phosphorylation were transiently up-regulated but were subsequently down-regulated by CXCL12. In contrast, the presence of ITD-Flt3 blocked the CXCL12-induced down-regulation of Rock1 and early MYPT1 dephosphorylation. Rock1 antagonists or Rock1 shRNA abolished the enhanced migration of ITD-Flt3+ cells toward CXCL12. Our findings demonstrate that ITD-Flt3 increases cell migration toward CXCL12 by antagonizing the down-regulation of Rock1 expression.

研究分野：血液病学

キーワード：急性骨髄性白血病 ITD-Flt3変異 細胞遊走 ROCK

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病の髄外浸潤は、未だ難治の疾患であり患者の生命予後を著しく悪化させる。実臨床では、白血病髄外浸潤に対して放射線治療や超大量化学療法が用いられるが、その効果は十分でなく、これらの治療は正常細胞への悪影響が問題となる。毒性の少ない選択的分子標的療法が望まれるが、髄外浸潤の分子メカニズムはほとんど解明されていない。

(2) 急性骨髄性白血病 acute myeloid leukemia (AML)における internal tandem duplication mutation-Fms-like tyrosine kinase-3 (ITD-Flt3 変異)は予後不良因子であり[1-6]、髄外病変を有する白血病症例のうち 15%が ITD-Flt3 陽性であったと報告されている[7]。

(3) 以前私たちは、ITD-Flt3 変異がマウス造血細胞において、ケモカイン CXCL12/stromal derived factor-1 (SDF1)に対する過剰な細胞遊走を引き起こすことを報告した [8]。その過剰な細胞遊走の際、Focal Adhesion 経路に関わる遺伝子発現が有意に変動することを見出した [9]。更に Focal Adhesion 経路に含まれる分子の一つが、細胞内情報伝達に関与するリン酸化酵素で固形癌の転移に関わる分子として注目されている Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (Rock)であった。

2. 研究の目的

私たちの研究の長期目標は、ITD-Flt3 陽性白血病髄外浸潤のメカニズムと浸潤過程に関わる白血病細胞特異的なシグナル経路を同定し、正常造血機能に影響を与えず髄外浸潤を抑制する治療ターゲットを提示することである。髄外浸潤は白血病細胞が増殖を繰り返す場へみずから侵入する行為が発端となることから、ITD-Flt3 変異による過剰な細胞遊走能に着目した。今回の研究の目的は、ITD-Flt3 変異によって引き起こされる CXCL12 に対する過剰な細胞遊走における Rock の機能を検証することである。

3. 研究の方法

(1) ITD-Flt3 陽性 AML 患者に由来する ITD-Flt3 変異を導入した Ba/F3 細胞 (ITD-Flt3 陽性細胞)と Wild type Flt3 を有する Ba/F3 細胞 (ITD-Flt3 陰性細胞)において CXCL12 へ遊走前後での遺伝子発現 profile を microarray により比較する。

(2) Rock 阻害剤および Rock1shRNA を用いて細胞遊走が抑制されるかを解析する。

(3) 各 CXCL12 濃度の Rock1 発現量の経時変化を解析する。

(4) Rock1 の細胞内基質である MYPT-1 のリン酸化を解析する。

(5) Rock1 の downstream effector である

adducin2 発現量を解析する。

4. 研究成果

(1) ITD-Flt3 陰性細胞と ITD-Flt3 陽性細胞において、CXCL12 刺激前の細胞と、CXCL12 に反応し遊走した細胞の遺伝子発現 profile を microarray により比較した。ITD-Flt3 陽性細胞では変化がなく、ITD-Flt3 陰性細胞においてのみ CXCL12 によって有意に変化する遺伝子は 333 個あり、その中に Rock1 が含まれていた (図 1)。Microarray の結果と同様に、定量的 PCR と western blot でも、ITD-Flt3 陰性細胞では、CXCL12 によって Rock1 の発現が低下した (図 2)。

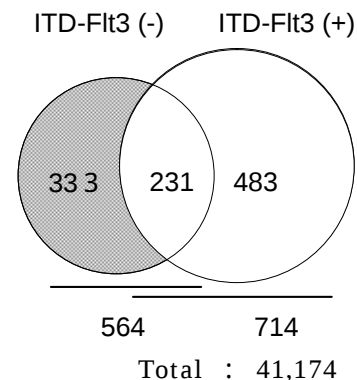


図 1 ITD-Flt3 陰性細胞と ITD-Flt3 陽性細胞における CXCL12 刺激前後の遺伝子 profile の比較

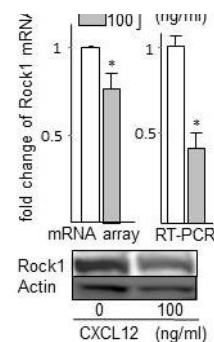


図 2 ITD-Flt3 陰性細胞における CXCL12 刺激前後での Rock1 発現量の比較

(2) 細胞遊走における Rock1 の働きを確かめるために、Rock 阻害剤 (Y27632, H1152) による前処置をほどこした細胞での遊走実験を行った。Rock 阻害剤により ITD-Flt3 陰性細胞および ITD-Flt3 陽性細胞の遊走は抑制された (図 3)。Rock1 の shRNA を用いた実験でも ITD-Flt3 陰性細胞および ITD-Flt3 陽性細胞の遊走は抑制された (図 4)。このことから、Rock1 は両者の細胞にとって、細胞遊走に必要な分子であるといえる。

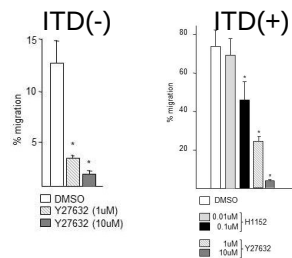


図3 Rock 阻害剤による CXCL12 への細胞遊走の抑制

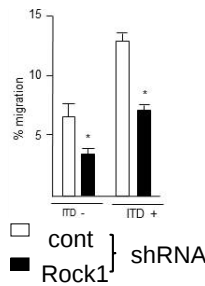


図4 Rock1 shRNA による CXCL12 への細胞遊走の抑制

(3) ITD-Flt3 陰性細胞では、CXCL12 1ng/ml に反応し Rock1 の発現は CXCL12 刺激後から 4 時間の間上昇し続けるのに対し、CXCL12 10-50ng/ml では、Rock1 の発現はいったん上昇するも CXCL12 刺激後 4 時間でベースラインに戻った(図5左)。CXCL12 100ng/ml 刺激後 4 時間における Rock1 発現は CXCL12 反応前よりも減少していた(図5右)。これに対し、ITD-Flt3 陽性細胞では各 CXCL12 濃度において、Rock1 の発現はほとんど影響されなかった(図6左右)。すなわち、ITD-Flt3 陰性細胞では、CXCL12 刺激後早期には Rock1 の発現は増加し、後期では減少に転じるのに対し、ITD-Flt3 陽性細胞では CXCL12 刺激下であっても Rock1 の高発現が維持された。Rock1 mRNA 量と同様に、ITD-Flt3 陰性細胞の Rock1 タンパク量は CXCL12 濃度依存性に徐々に増加し、その後減少した。ITD-Flt3 陽性細胞では Rock1 発現への CXCL12 の影響はほとんどなく、Rock1 の高発現が維持されていた(図7)。

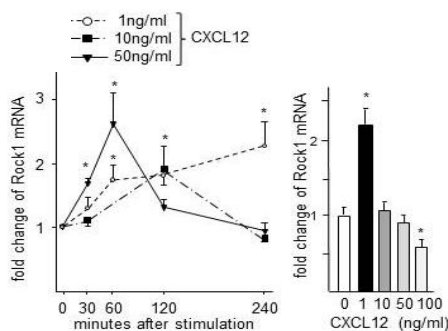


図5 ITD-Flt3 陰性細胞における CXCL12 濃度依存性の Rock1 mRNA 量の変化

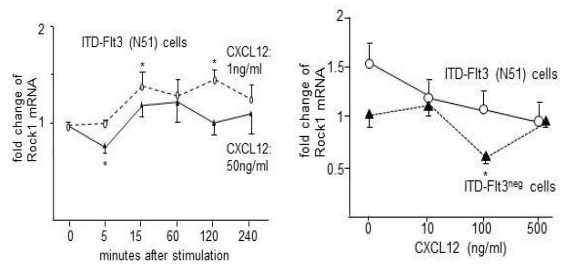


図6 左) ITD-Flt3 陽性細胞における Rock1 mRNA 量の経時変化
右) 各 CXCL12 濃度における Rock1 mRNA 量の比較

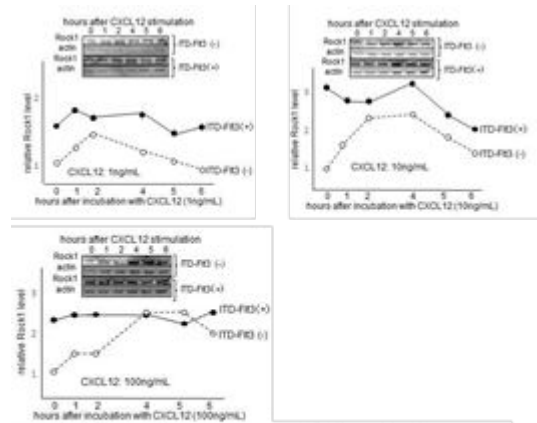


図7 各 CXCL12 濃度における Rock1 タンパク量の経時変化

(4) ITD-Flt3 陽性細胞では、ITD-Flt3 陰性細胞と比較し、Rock1 の基質である MYPT1 のリン酸化レベルは CXCL12 刺激 60 分以後、高値であった(図8)。

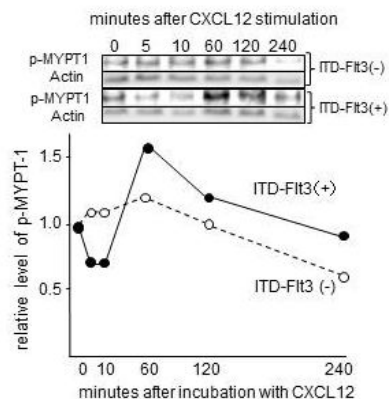


図8 CXCL12 刺激後の MYPT1 のリン酸化レベル

(5) Rock1 の downstream effector である Adducin2 は、Rock1 と同様に、CXCL12 100ng/ml によって ITD-Flt3 陰性細胞では発現が低下するが、ITD-Flt3 陽性細胞では高発現していた(図9)。

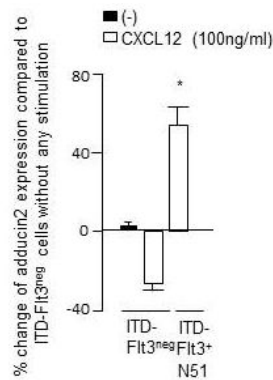


図9 ITD-Flt3 陽性細胞における adducin2 mRNA 量の ITD-Flt3 陰性細胞との比較

以上の結果から、ITD-Flt3 変異は CXCL12 による Rock1 発現の抑制を阻害することにより、制御を欠いた過剰な細胞遊走をもたらしていると考えられた。Rock1 をターゲットとする治療は、ITD-Flt3 陽性の白血病細胞の髄外浸潤の予防を含めた新たな治療戦略となると考える。

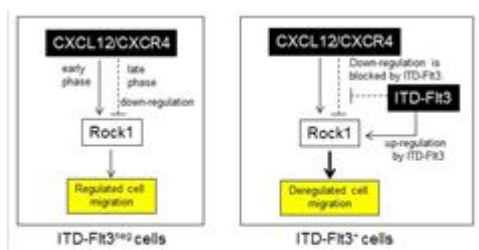


図10 ITD-Flt3 変異による過剰な細胞遊走の分子メカニズム

<引用文献>

1. Kiyoi H. et al. Blood. 1999;93 :3074-3080.
2. Abu-Duhier F.M. et al. Br J of Haematology. 2000;111:190-195.
3. Kottaridis P.D. et al. Blood. 2001;98 :1752-1759.
4. Frohling S. et al. Blood. 2002;100:4372-4380.
5. Schnittger S. et al. Blood. 2002;100:59-66.
6. Moreno I. et al. Haematologica. 2003;88 :19-24.
7. Ansari-Lari MA. et al. Br J of Haematology. 2004;126:785-791
8. Fukuda S. et al. Blood. 2005;105:3117-3126.
9. Fukuda S. et al. ASH Abstract2009:#2383.

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1件)

Chie Onishi, Satomi Mori-Kimachi, Tomohiro Hirade, Mariko Abe, Takeshi Taketani, Junji Suzumiya, Toshitsugu Sugimoto, Seiji Yamaguchi, Reuben Kapur, Seiji Fukuda
Internal Tandem Duplication Mutations in Flt3 augment Chemotaxis to CXCL12 by Blocking the Down-Regulation of the Rho-Associated Kinase via the CXCL12/CXCR4 signaling axis
The Journal of Biological Chemistry 289(45): 31053-65, 2014
DOI:10.1074/jbc.M114.568287

(学会発表)(計2件)

大西千恵、平出 智裕、山口 清次、福田 誠司

ITD-Flt3 accentuates cell migration by antagonizing the reduction of ROCK1 induced by SDF1

第75回日本血液学会学術集会、2013年10月11日、さっぽろ芸文館(北海道・札幌)

Chie Onishi, Satomi Mori, Tomohiro Hirade, Mariko Abe, Seiji Yamaguchi, Reuben Kapur, Seiji Fukuda

The Internal-Tandem-Duplication of Flt3 Mutations Augment Chemotaxis in Hematopoietic Cells by Blocking the Down-regulation of Rho-Associated Kinase that is induced by SDF1/CXCR4 signaling.

The 54th Annual Meeting of American Society of Hematology, Poster presentation, December 8, 2012, Atlanta, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 千恵 (ONISHI, Chie)

島根大学医学部・医科医員

研究者番号: 30598115