

平成 22 年 3 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790678

研究課題名 (和文) Siva-1 を介するリンパ球のアポトーシス誘導機構の解明

研究課題名 (英文) Investigation into the apoptotic signal of lymphocyte via Siva-1

研究代表者

下田 晴子 (Shimoda Haruko)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：10452921

研究成果の概要 (和文) : Tyk2 は IFN α による B 細胞増殖抑制作用に必須の物質である。私は、アポトーシス誘導蛋白である Siva-1 が細胞内で Tyk2 と会合し、Tyk2 により Siva-1 がリン酸化されることを見出した。Ba/F3 細胞 (マウス proB 細胞) では、Siva-1 が Tyk2 と会合することにより細胞のアポトーシスが増加したことから、Siva-1 は Tyk2 と複合体を形成してリンパ球のアポトーシスシグナルを担っている可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Tyk2 is essential for B cell growth inhibition by IFN- α . We found that Tyk2 interacts with and phosphorylates Siva-1. Siva-1 is a proapoptotic protein, and the interaction between Tyk2 and Siva-1 augmented Siva-1-induced apoptosis in Ba/F3 cells (murine pro-B cells). These observations suggest that Siva-1 forms a functional complex with Tyk2 and participates in the transduction of apoptotic signals of lymphocyte.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：血液腫瘍学・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

- (1) インターフェロン(IFN) α による抗腫瘍作用の細胞内シグナル伝達経路に Tyk2 は必須の物質である。

- (2) 私は、Tyk2 下流の物質をクローニングするため、Tyk2 を bait とした two-hybrid スクリーニングを行い、Tyk2 と会合する分子として Siva-1 をクローニングした。

- (3) Siva-1 は細胞のアポトーシスを促進する proapoptotic 蛋白であること、遺伝子座は第 14 番染色体上であることが報告されていた。
- (4) Siva-1 がリンパ球の細胞増殖抑制作用における、Tyk2 下流のシグナル伝達物質である可能性を考えた。
- (5) 第 14 番染色体転座を有する悪性リンパ腫(濾胞性リンパ腫やマンテル細胞リンパ腫)では、Siva-1 蛋白の発現が障害され、細胞のアポトーシス機構が破綻し腫瘍化している可能性を考えた。

2. 研究の目的

- (1) リンパ球の細胞増殖抑制作用に Tyk2→Siva-1 のシグナル伝達経路が存在するかどうか明らかにする。
- (2) 第 14 番染色体転座を有する悪性リンパ腫の発症あるいは病態に、Siva-1 が関与しているかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Siva-1 と Tyk2 の生化学的解析

- ① Tyk2 と Siva-1 の細胞内での会合を明らかにする。次に、Siva-1 の各ドメインに注目して Siva-1 の deletion 変異体を作成し、Tyk2 との会合部位を明らかにする。
- ② チロシンキナーゼである Tyk2 が Siva-1 をリン酸化するかどうかを明らかにする。次に、Siva-1 の各チロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を作成し、Tyk2 により Siva-1 のどのチロシンがリン酸化されるかを明らかにする。

以上を 293T 細胞を用いて、免疫沈降法とウエスタンブロット法を中心に解析する。

(2) Siva-1 と Tyk2 の機能的解析

マウス proB 細胞である Ba/F3 細胞を用いて、以下の手順で解析する。

- ① Tyk2 を恒常的に発現している、Ba/F3/Tyk2 細胞を樹立する。
- ② Ba/F3 細胞に Siva-1 を導入し、従来の報告どおり細胞にアポトーシスが生じるかどうか確認する(アネキシン染色後、FACS にて測定)。
- ③ Siva-1 導入によって生じるアポトーシスの割合を、Ba/F3 細胞と Ba/F3/Tyk2 細胞とで比較する。
- ④ (1)の①や②で作成した Siva-1 の deletion 変異体やリン酸化されな

い変異体を Ba/F3/Tyk2 細胞に導入し、生じるアポトーシスの割合を、野生型 Siva-1 を導入した場合とで比較する。この③④の実験により、Siva-1 のアポトーシス誘導能が Tyk2 によりどう影響されるかを明らかにする。

(3) 第 14 番染色体転座を有する悪性リンパ腫の発症に Siva-1 が関与しているかどうかの検討

- ① 悪性リンパ腫患者およびコントロールのリンパ節検体に関して、患者から文書による同意を得た後に検体の提供を受ける。
- ② 提供をうけたリンパ節検体の中から無作為に、第 14 番染色体転座を有する濾胞性リンパ腫患者 3 名、マンテル細胞リンパ腫患者 3 名、組織診断の結果リンパ腫ではなかったもの(反応性リンパ節炎)や固形腫瘍のリンパ節転移であったものをコントロールとしてそれぞれ 3 名ずつほど抽出する。
- ③ リンパ節を抗 Siva-1 抗体で免疫染色し、②の 4 群間で染色度を比較する。
- ④ リンパ節より蛋白を抽出し、全体の蛋白量を一定にそろえた上で抗 Siva-1 抗体をもちいたウエスタンブロット法で Siva-1 蛋白の発現量を比較する。
- ⑤ リンパ節より RNA を抽出し、RT-PCR 法により Siva-1 の mRNA 量を比較する。

4. 研究成果

(1) Siva-1 と Tyk2 の生化学的解析

- ① Siva-1 は 293T 細胞内で Tyk2 と会合した。会合部位は、Siva-1 の N 末であった。
 - ② Siva-1 は Tyk2 によりリン酸化された。Tyk2 によりリン酸化を受けるのは Siva-1 の 53 番と 162 番のアミノ酸であるチロシンであった。
- 以上より、Siva-1 は生化学的に Tyk2 の基質であることを明らかにした。

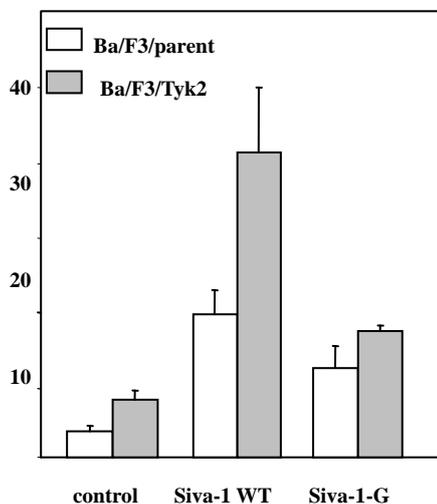
(2) Siva-1 と Tyk2 の機能的解析

(下図参照)

- ① Ba/F3 細胞に Siva-1 を導入すると、約 18%の細胞にアポトーシスが生じた(コントロール <5%)。
- ② Ba/F3/Tyk2 細胞に Siva-1 を導入すると、生じるアポトーシスの割合は約 40%と 2 倍以上に増加した。

- ③ Siva-1 のN末を削除した、Tyk2 と会合できない Siva-1-G 変異体を Ba/F3/Tyk2 細胞に導入して生じるアポトーシスの割合は約 16%と Ba/F3 細胞に導入した時と同程度であり、野生型 Siva-1 を Ba/F3/Tyk2 細胞導入時にみられたようなアポトーシスの増加はなかった。
- ④ これらの結果より、Siva-1 が細胞内で Tyk2 と会合することによって、Siva-1 が本来有するアポトーシス誘導能が亢進することが示唆された。Tyk2 による Siva-1 のリン酸化が、Siva-1 のアポトーシス誘導能の亢進に関与しているかどうかは、現在検討中である。

(図) Siva-1 導入により生じるアポトーシスの割合(%)



(3) 第 14 番染色体転座を有する悪性リンパ腫の発症に Siva-1 が関与しているかどうかの検討

文書による同意を得た結果、目標とする数の悪性リンパ腫患者およびコントロールのリンパ節検体の提供を受けることができた。現在、Siva-1 の発現量について当初の計画に基づいた方法で解析を進めている。

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 3 件)

- ① Shide K, Shimoda HK, 以下 16 名、Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing Jak2 V617F. *Leukemia* 22, 87-95, 2008、査読有

- ③ Hidaka T, Shide K, Shimoda HK, 以下 13 名、The impact of cytogenetic abnormalities on the prognosis of primary myelofibrosis: a prospective survey of 202 cases in Japan. *European Journal of Haematology*. 83(4), 328-333, 2009、査読有
- ② 松永卓也, 幣光太郎, 亀田拓郎, 下田晴子, 下田和哉、JAK2 阻害剤開発の現状とその展望、*血液フロンティア* 19(10), 55-63, 査読無

[学会発表] (計 11 件)

- ① 下田和哉、変異 JAK2 の発現量が慢性骨髄増殖性疾患の病型を決定する、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業、2008 年 2 月 15 日、東京
- ② 管博美、両側副腎原発悪性リンパ腫の 1 例、第 280 回日本内科学会九州地方会、2008 年 1 月 26 日、福岡
- ③ 亀田拓郎、急性混合性白血病の経過中に肺胞蛋白症を合併した 1 例、第 281 回日本内科学会九州地方会、2008 年 5 月 10 日、宮崎
- ④ 唐澤直希、高度の貧血、血小板減少、Gerstmann 症候群を認めた抗リン脂質抗体症候群の 1 例、第 282 回日本内科学会九州地方会、2008 年 8 月 23 日、沖縄
- ⑤ 杉田泰雅、MDS の経過中に舌潰瘍で発症した Sweet 症候群の 1 例、第 286 回日本内科学会九州地方会、2008 年 1 月 26 日、鹿児島
- ⑥ 幣光太郎、新規 JAK2 阻害剤 R723 は骨髄増殖性疾患モデルマウスの病態を改善する、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、京都
- ⑦ 山下清、宮崎県における急性骨髄性白血病の検討、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、京都
- ⑧ 亀田拓郎、成人 T 細胞性白血病/リンパ腫における JAK1 遺伝子変異の検討、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、京都
- ⑨ 谷口康博、骨腫瘍、脾腫瘍で発症し、Sarcoma との鑑別を要した precursor B lymphoblastic lymphoma の 1 例、第 71 回日本血液学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、京都
- ⑩ Kotaro Shide, Efficacy of R723, a potent and selective JAK2 inhibitor, in JAK2 V617F-induced murine MPD model, 第 51 回米国血液学会、2009 年 12 月 7 日、ニューオリンズ、米国
- ⑪ Takuro Kameda, Absence of somatically acquired JAK1 mutations in Adult

T-Cell leukemia/lymphoma、第51回米国血液学会、2009年12月7日、ニューオーリンズ、米国

〔図書〕(計2件)

- ① 下田晴子, 下田和哉、南江堂、「内科」特集 内科診療ガイドライン活用法、2008、6
- ② 下田晴子, 下田和哉、医薬ジャーナル社、WHO血液腫瘍分類 ～WHO分類2008をうまく活用するために～、2010、9

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/2nai/miyazaki/gyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下田 晴子 (SHIMODA HARUKO)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：10452921

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：