

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2007 ～ 2008
 課題番号： 19591115
 研究課題名（和文） IL-6反応性骨髄腫細胞増殖におけるCD45-Lyn刺激伝達系の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the CD45-Lyn-mediated signaling pathways in the IL-6-induced myeloma cell proliferation
 研究代表者
 石川 秀明（ISHIKAWA HIDEAKI）
 山口大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号： 40294623

研究成果の概要： Lyn を過剰発現した骨髄腫細胞株では、Lyn の著明な活性化とともに Lyn と PI 3-kinase の結合および PI 3-kinase、Akt の活性が亢進しており、PI 3-kinase 阻害剤により細胞増殖が抑制された。また、質量分析により骨髄腫細胞において IL-6 刺激後に脂質ラフトに存在する分子、チロシン・リン酸化されるタンパク質および脂質ラフト外でチロシン・脱リン酸化されるタンパク質を複数同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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： 骨髄腫、IL-6、Lyn、CD45、PI 3-kinase、Akt、解糖系、PKM2

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト骨髄腫細胞は、分化度の異なる不均一な腫瘍細胞集団であり、その中でCD45陽性の未熟骨髄腫細胞がIL-6に反応して増殖していることを我々は見出した。骨髄腫細胞株を使った実験から、骨髄腫細胞の増殖にはIL-6によって活性化されるSTAT3とERK1/2だけでは不十分であり、CD45によって制御されるsrc型チロシン・キナーゼ（PTK）、Lynの活性が必須であることが解った。CD45は有核血球細胞に発現する膜貫通型チロシン・フォスファターゼ（PTP）であり、src型PTKのカルボキシル末端に存在するチロシン残基を脱リン

酸化することによりsrc型PTKを活性化する。IL-6は骨髄腫細胞の主要な増殖因子であるが、IL-6受容体を発現する多くの細胞でIL-6刺激によりSTAT3とERK1/2の活性化が認められるにもかかわらず、IL-6が細胞に及ぼす効果は細胞の種類によって様々である。つまり、IL-6の作用全てをJAK-STATまたはRas-MAPK刺激伝達経路だけで説明することは困難である。

(2) ヒト・ゲノム配列の完成を受けて、ゲノム情報を基盤とした網羅的解析・大規模解析が進展している。遺伝子配列情報を利用した

DNAマイクロアレイは大規模な遺伝子発現解析（トランスクリプトミクス）を可能にし、既に多くの研究分野で応用されている。一方、質量分析法で得られるタンパク質の構造情報（アミノ酸配列）をタンパク質配列データベースと比較することで大規模で高感度なタンパク質の同定を可能とする技術は、様々な組織、細胞におけるタンパク質の発現解析、いわゆるタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）を現実のものとした。プロテオミクスはゲノムから創造されるタンパク質全体（プロテオーム）を網羅的に解析することで、ポストゲノム時代の最も重要な研究課題の一つになる。これからの生命科学研究の進歩は、ゲノム情報をいかに有効に利用できるかによると考えられる。

(3) 細胞内タンパク質のチロシン・リン酸化状態はPTK活性とそれを脱リン酸化するPTP活性のバランスで決定される。IL-6刺激伝達経路は、既知の経路について詳細な解析がなされている一方で、網羅的な解析の報告はなく、どの刺激伝達経路がどのような遺伝子発現カスケードを誘導して、種々の細胞にIL-6の多様な生物作用を発揮しているのかも明らかではない。本研究は、IL-6が増殖刺激を伝達する骨髄腫細胞においてプロテオミクスを駆使して、IL-6が伝える増殖刺激の本質を同定しようと試みる先駆的研究と位置づけられる。

2. 研究の目的

(1) IL-6による骨髄腫細胞増殖では、JAK-STATおよびRas-ERK経路に加えてCD45-Lyn刺激伝達系が重要な役割を果たしていることを我々は報告してきた。しかし、src型PTKの下流でどのような刺激伝達経路が活性化され、細胞増殖およびがん化に働いているのか不明である。本研究ではタンパク質の網羅的解析と大規模な遺伝子発現解析を駆使して、IL-6刺激後の骨髄腫細胞増殖におけるCD45-Lynの下流で作用するエフェクター・タンパク質および遺伝子の同定を目指す。つまり、IL-6による骨髄腫細胞増殖において我々が見出したCD45-Lyn刺激伝達系の下流で活性化される刺激伝達分子群を質量分析法により同定し、IL-6誘導遺伝子群をマイクロアレイにより同定して、IL-6投与後の細胞増殖を担う刺激伝達・遺伝子発現カスケードを明らかにする。

(2) IL-6による骨髄腫細胞増殖には、JAK-STAT、Ras-ERK1/2およびCD45-Lyn刺激伝達系が重要な役割を果たしていることは上述した通りである。しかしながら、IL-6処理後の骨髄腫細胞でその他の刺激伝達経路がどの

程度活性化されているのか全貌は明らかでない。本研究では、増殖刺激としてのIL-6によるタンパク質リン酸化をディファレンシャル解析し、IL-6による増殖刺激に重要な刺激伝達責任分子を明らかにする。

IL-6受容体複合体、insulin-like growth factor (IGF-I)受容体、src型PTK (Lyn)などの細胞内局在および脂質ラフト破壊薬を使った実験から、IL-6刺激伝達系における脂質ラフトの重要性が明らかになっている。さらに我々は、IL-6による骨髄腫細胞増殖においてCD45-Lynが細胞膜の脂質ラフトで機能していることを報告している。これに注目した上で、骨髄腫細胞におけるIL-6の増殖刺激伝達経路を網羅的に解析するために、IL-6刺激後に脂質ラフトでチロシン・リン酸化されるタンパク質、脂質ラフト外でチロシン・脱リン酸化されるタンパク質、脂質ラフトに移動してくるタンパク質を質量分析法により同定する。

(3) 細胞増殖はde novoの遺伝子発現・タンパク質合成を必要とする生物応答であることから、骨髄腫細胞における増殖因子IL-6の誘導遺伝子を決定することはその分子機構を理解する上でも重要である。IL-6刺激後に細胞増殖が誘導される骨髄腫細胞株とDNAマイクロアレイを用いて、IL-6刺激後に発現が変化する遺伝子を網羅的に選別し、IL-6刺激後の細胞増殖に重要な役割を果たすIL-6誘導遺伝子群を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CD45およびLynの下流で働く刺激伝達分子の探索

①Lyn分子を(His)₆ tagとの融合タンパク質として発現するIL-6依存性骨髄腫細胞株を使ってIL-6刺激前後の細胞抽出液からNi-beadsで(His)₆ tag付加されたLynとこれらに会合する分子群を高純度に精製する。

②SDS-PAGE後銀染色し、各々のバンドに含まれるタンパク質を質量分析計により同定する（質量分析装置（LC-ESI-MS/MS, Q-ToF ultima, Micromass）を使用）。

(2) IL-6によって骨髄腫細胞内で変化する刺激伝達分子の網羅的解析

シヨ糖密度勾配遠心後の脂質ラフト分画を抗リン酸化チロシン抗体-beadsによりアフィニティー精製し質量分析解析することにより、骨髄腫細胞においてIL-6刺激後に脂質ラフトに存在する分子、チロシン・リン酸化されるタンパク質および脂質ラフト外でチロシン・脱リン酸化されるタンパク質を複数同定した（LC-ESI-MS/MS, Q-ToF ultima, Micromassを使用）。

(3) IL-6刺激後にCD45-Lynの下流で働く遺伝子の同定

IL-6依存性骨髄腫細胞株 ILKM2 および ILKM8 を用いて IL-6 刺激前後で発現が変化する遺伝子 (IL-6 誘導遺伝子) を DNA マイクロアレイにより複数同定した (DNA chip; Affymetrix U133A を使用)。

4. 研究成果

(1) Lyn の下流で活性化される PI3K-Akt 刺激伝達系

①骨髄腫細胞の増殖には CD45 によって制御される src 型 PTK の活性化が重要であることから、その下流で働く刺激伝達分子を同定する目的で、(His₆) tag 化した Lyn を IL-6 依存性 CD45⁺骨髄腫細胞株 ILKM2 および ILKM8 に強制発現させると、IL-6 による細胞増殖が促進されたことから、Lyn の下流で増殖刺激シグナルが増幅されていると考えられた。過剰発現した Lyn は恒常的に活性化されており、さらに PI 3-kinase および Akt の活性化が亢進していたが、STAT3 と ERK1/2 のリン酸化は変化していなかった。これらの結果は以前の知見を支持するものであり、Lyn は STAT3 と ERK1/2 とは独立に IL-6 による骨髄腫細胞増殖に寄与していることが確認された。また、PI 3-kinase 選択的阻害剤 LY294002 または Akt inhibitor が細胞増殖を著明に抑制したことから Lyn の下流で活性化される PI 3-kinase-Akt 刺激伝達系が IL-6 による骨髄腫細胞増殖に重要であることが解った。

②Akt の下流では、Bad、FoxO、IKK、p70S6-kinase、p27^{Kip1}、MDM2 などが働いている可能性が各々のタンパク質リン酸化状態から示唆された。

③PI 3-kinase 以外にも、質量分析法により CD45-Lyn 刺激伝達系の下流エフェクター分子として解糖系の酵素群 (乳酸脱水素酵素 LDH、エノラーゼ ENO) を同定した。

(2) IL-6 刺激伝達系における脂質ラフトの重要性

①質量分析法により CD45 陽性骨髄腫細胞において IL-6 刺激後に脂質ラフトに存在する分子、チロシン・リン酸化されるタンパク質および脂質ラフト外でチロシン・脱リン酸化されるタンパク質を複数同定した。その中に含まれる、HSP90 が IL-6 を含め種々の刺激伝達経路に関与しており、骨髄腫の治療薬として HSP90 阻害剤である Geldanamycin の有効性が報告されていることを考え合わせると興味深い。CD45 はシステイン残基を介したジスルフィド結合の有無が PTP 活性に重要であり、Lyn もまた レドックス制御を受けており、酸化ストレスに反応して活性化されることか

ら、thioredoxin 類も興味深い。

②熱ショック・タンパク質、thioredoxin 類以外では pyruvate kinase M2 (PKM2)、LDH、ENO、phosphoglycerate kinase (PGK) などの解糖系の酵素が含まれていた。IL-6 刺激に伴う腫瘍細胞特異的ピルビン酸キナーゼ PKM2 のチロシン・脱リン酸化が CD45 発現骨髄腫細胞でのみ観察され、この現象は PTP 阻害剤により消失したことから、CD45 の PTP 活性の関与が強く示唆された。PTP 阻害剤が CD45 陽性骨髄腫細胞の IL-6 反応性増殖を抑制する実験結果を考慮すると、Lyn の活性化に加えて、解糖系酵素の発現およびリン酸化状態が IL-6 による CD45 陽性骨髄腫細胞増殖の重要な病理的一面を捉えていることが強く示唆される。

(3) IL-6 誘導遺伝子の解析

①IL-6 依存性骨髄腫細胞株を用いて、DNA マイクロアレイによる IL-6 刺激後の遺伝子発現の経時的解析を行ったところ、早期には多くの STAT3 標的遺伝子 (bc1-6 など)、遅れていくつかの NF- κ B 標的遺伝子の発現が認められた。今後、これらの遺伝子の中で CD45-Lyn の下流で働く増殖誘導遺伝子群を同定する。

②PKM2 など解糖系の酵素をコードする遺伝子群が腫瘍細胞で強発現していることがマイクロアレイ解析で報告されており、我々の解析でも IL-6 刺激後の骨髄腫細胞株で上記解糖系酵素遺伝子の発現が上昇していた。

(4) 考察・まとめ

細胞は成長因子などの細胞外刺激に反応して細胞内 PTK が活性化され、それが引き金となって細胞増殖が誘導される。一方、細胞が分裂・増殖するには glucose などの栄養を摂取し細胞内代謝系の助けを借りなければならない。

細胞増殖の際には、glucose など栄養素の細胞内取り込みが亢進し、それらは anabolic processes に利用されることが知られている。成長因子反応性細胞増殖では、細胞内 PTK を介したタンパク質リン酸化カスケードが重要な役割の一端を担っているが、PTK 刺激伝達系と解糖系・TCA サイクル・電子伝達系など一連の糖代謝経路の詳細関係は不明であった。PK は Mg²⁺存在下にホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に変換する酵素で、腫瘍細胞や胎児組織では特異的に M2 isoform (PKM2) が発現している。正常成人組織で発現し恒常的に活性化している PKM1 と異なり、腫瘍細胞特異的 PKM2 は解糖系の中間代謝産物である fructose-1,6-bisphosphate (FBP) と結合することによって構造変化を起こし酵素活性を発揮するアロステリック酵素である。最近の大規模プロテオーム解析の結果、リン酸化チロシン結合タンパク質として既

知の SH2 含有タンパク質とともに PKM2 が同定された。この結合は PKM2 特異的であり、他の isoform である PKL (肝臓)、PKR (赤血球)、PKM1 では観察されなかった。PKM2 はリン酸化チロシンと結合すると構造変化が起こり、活性化因子である FBP と結合できなくなることで、その活性が低下すると考えられた。つまり、腫瘍細胞においては細胞内タンパク質のチロシン・リン酸化状態によって PKM2 活性が影響を受けることで PTK シグナルと解糖系が関連づけられ、未知の機構により引き続き誘導される腫瘍細胞特異的 aerobic glycolysis が細胞増殖および腫瘍形成に重要であると考えられた。

Lyn 分子を (His)₆ tag との融合タンパク質として過剰発現する IL-6 依存性骨髄腫細胞株を使って IL-6 刺激後に Lyn と会合する分子群を質量分析法により解析したところ、PI 3-kinase の他に LDH、ENO など Lyn の基質と考えられる解糖系の酵素が同定された。さらに、CD45 陽性骨髄腫細胞において IL-6 刺激後に脂質ラフトでチロシン・リン酸化されるタンパク質、脂質ラフト外でチロシン・脱リン酸化されるタンパク質を質量分析法により複数同定した。その中には、熱ショック・タンパク質、thioredoxin 類とともに PKM2、LDH、ENO、PGK などの解糖系の酵素が含まれていた。

Warburg effect (aerobic glycolysis) は腫瘍細胞が大量の栄養源を消費して旺盛な細胞増殖を続けることに必須な代謝機構であり、ミトコンドリア機能障害が原因ではないことが明らかになっているが、その詳細な分子機構は依然不明である。PKM2 が結合するリン酸化チロシンのペプチド配列は src 型 PTK 認識配列と一致していることから、我々は LDH または ENO のリン酸化チロシンと PKM2 が結合することを強く疑っており、それにより解糖系の最終産物であるピルビン酸から乳酸への変換 (LDH によって触媒される) が促進されると考えている。それに伴ってピルビン酸から acetyl CoA への変換は抑制され、その結果好氣的条件下においても anabolic processes が亢進し、酸素消費が抑制される腫瘍細胞特異的な糖代謝の変化 (Warburg effect による乳酸の産生) が起こると推察される。乳酸は、解糖系を動かし続けるために NADH を NAD⁺ に戻して再利用する際水素分子を受け取る分子として重要である。また、PKM2 の酵素活性は (LDH などの) チロシン・リン酸化タンパク質と FBP によって制御を受けるので、IL-6 刺激などの PTK シグナルによって PKM2 活性が低下すると、その結果ホスホエノールピルビン酸が増加する。それに伴って解糖系の律速酵素の一つである phosphofructokinase の活性が抑制されて FBP が低下し、さらなる PKM2 活性の低下を招

くという auto-regulatory loop の存在が想像される。一方、PTK 刺激による PK チロシン・リン酸化が PK 酵素活性の抑制に関与しているとの報告もあり、腫瘍細胞における PKM2 の活性制御機構はまだ正確に理解されているとは言い難い。

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)

- ① 石川秀明、小幡雅則、骨髄腫細胞の増殖機構、血液・腫瘍科、57、148-156、2008、査読無

[学会発表] (計 2 件)

- ① Hideaki Ishikawa、The IL-6-induced cell proliferation depends on the cellular context in myelomas、第 38 回日本免疫学会学術集会、2008 年 12 月 3 日、京都
- ② 石川秀明、IL-6 による骨髄腫細胞増殖刺激伝達系における Lyn の関与、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 13 日、14 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]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~plasma/indexj.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 秀明 (ISHIKAWA HIDEAKI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号： 40294623

(2) 研究分担者 (2007)

(3) 連携研究者 (2008)

小幡 雅則 (OBATA MASANORI)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 80158831

水上 洋一 (MIZUKAMI YOICHI)

山口大学・総合科学実験センター・准教授

研究者番号： 80274158