

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591261

研究課題名(和文) ヒト遺伝子ノックアウト白血病細胞株の作製とアポトーシスの分子機序の解析

研究課題名(英文) Investigation of Molecular Mechanisms of Apoptosis using gene knock-out leukemic cell lines

研究代表者

宮下 俊之(MIYASHITA TOSHIYUKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：60174182

研究成果の概要(和文): グルココルチコイド(GC)によって誘導される白血病細胞のアポトーシスの分子機序を解明する目的で、GC感受性ヒト白血病細胞株 Nalm6 において GC の標的遺伝子をターゲティングベクターを用いてノックアウトした。標的遺伝子の 1 つである *RCAN1* をノックアウトした *RCAN1* <sup>-/-</sup>細胞は野生株に比べて著明に GC によるアポトーシスが抑制された。逆に *RCAN1* を強制発現した細胞株ではアポトーシス誘導の増強が認められた。以上の結果より *RCAN1* 遺伝子は GC によるアポトーシスを媒介する標的遺伝子の 1 つであると考えられた。

研究成果の概要(英文): In order to investigate the molecular mechanism of how glucocorticoid (GC) induces apoptosis in certain leukemic cells, we established *RCAN1* gene knock-out Nalm6 cells. *RCAN1* is one of the target genes of GC and Nalm6 is a human leukemic cell line that undergoes apoptosis upon the treatment with GC. *RCAN1* <sup>-/-</sup> cells were markedly resistant to GC compared with wild-type cells. On the contrary, overexpression of *RCAN1* resulted in enhanced apoptosis by GC. These results demonstrate that *RCAN1* is a mediator for GC-induced apoptosis in leukemic cells.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：アポトーシス、グルココルチコイド、RCAN1、白血病

## 1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド(GC)は生体内で産生されるステロイドホルモンであるが、白血病、リンパ腫の化学療法に必須の薬剤でもある。GCは幼若なリンパ球や白血病細胞に細胞周期の停止とアポトーシスと呼ばれる細胞死

を誘導することが知られており、これが抗がん剤としての作用と考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。GCは細胞膜を通過し、細胞質に存在するグルココルチコイド受容体(GR)と結合する。GRはGCの結合により構造変化を起こし、HSP90がはずれ

で核内に移行する。GRは核内で2量体としてゲノム上の特定の DNA 配列 (glucocorticoid response element: GRE) に結合し、その下流にある遺伝子の転写を活性化する。GRはこのように転写因子としてはたらく他、NF- $\kappa$ B、Stat5 等の転写因子と結合し、それらの活性化因子、あるいは抑制因子として作用することも報告されている (下図)。転写活性化能のない変異型 GR はアポトーシス誘導能がないことから、GR の下流で活性化される何らかの遺伝子 (標的遺伝子) がアポトーシス誘導に必須と考えられる。最近マイクロアレイを用いて GC の標的候補遺伝子が多数報告されるようになったが、この中のいずれがアポトーシス誘導に関与しているかは全く不明である。そこで本研究では GC に感受性のヒト白血病細胞株で標的候補遺伝子をノックアウトすることにより、GC による白血病細胞におけるアポトーシス誘導機序の解明を目指した。

## 2. 研究の目的

最近ヒトリンパ性白血病細胞株の中にジーンターゲットが比較的効率よく行えるものがあることが明らかになってきた。本研究ではそのような細胞株であり、かつ GC でアポトーシスが効率よく誘導されるヒト Pre-B 細胞株である Nalm-6 を用いてヒトアポトーシス遺伝子のノックアウト細胞株を作製し、GC によるアポトーシスに与える影響を与えるかを解析することを目的とした。以前の我々の解析から GC の標的遺伝子の可能性が高く、複数の論文でアポトーシスへの関与が示唆されている *FKBP5* と *RCAN1* をノックアウトする対象遺伝子とした。

## 3. 研究の方法

(1) ターゲティングベクターの作製  
Nalm-6 から抽出したゲノム DNA をもとに PCR を行い、5 Arm と 3 Arm となるゲノム断片を得た。これらを用いてターゲティングベクターを作製する際、Invitrogen 社の MultiSite Gateway System を用いた。これを用いることにより、制限酵素部位にとらわれず必要な断片をベクターの必要な場所に正確かつ迅速に組みこむことが可能となった。

(2) ターゲティングベクターによる遺伝子のノックアウト

(1) で作製したターゲティングベクターをエレクトロポレーション法で Nalm-6 細胞に導入した。翌日からハイグロマイシンを含む培地に替え、96 穴プレートにまく。3-4 週間で薬剤耐性クローンを得た。各耐性クローンの中から PCR 法あるいはサザンプロット法

で、ベクターが相同組換えを経て正しくゲノムに組み込まれているものをスクリーニングした。第二の薬剤耐性遺伝子をもつターゲティングベクターを用いて、残るもうひとつのアレル上にある遺伝子のノックアウトを行った。第二の薬剤として Puromycin を用いた。

(3) ノックアウト細胞株を用いた細胞死の解析

(2) で作製した細胞株を用いてアポトーシスの解析を行った。アポトーシス細胞の検出は、Annexin V 陽性細胞、ヨウ化プロピディウム染色による DNA 量の解析をいずれもフローサイトメトリーで行った。

## 4. 研究成果

(1) ターゲティングベクターによる遺伝子のノックアウト

PCR 法、サザンプロット法により *FKBP5* と *RCAN1* 遺伝子のノックアウトに成功した (図 1)。

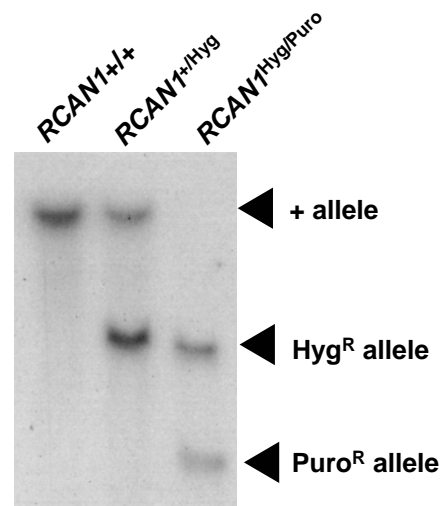


図1 RCAN1ノックアウト細胞の確認  
サザンプロット法にてRCAN1遺伝子の1アレル(RCAN1+/Hyg)及び2アレル(RCAN1Hyg/Puro)のノックアウトを確認した。

(2) ノックアウト細胞株を用いた細胞死の解析

*FKBP5* 遺伝子のノックアウトは GC によるアポトーシスに有意な影響を与えなかった。従って *FKBP5* は GC 誘導性アポトーシスを介在する遺伝子とは考えにくかった。それに対して、*RCAN1* 遺伝子のノックアウト細胞株は、残存するアレルに依存してアポトーシスに抵抗性を示した (図 2)。一方で *RCAN1* を強制発現した細胞は野性株に比べてアポトーシス感受性が上昇した (図 3)。更に *RCAN1* ノックアウト細胞株に見られたアポトーシス抵抗性は GC に特異的なものであり、

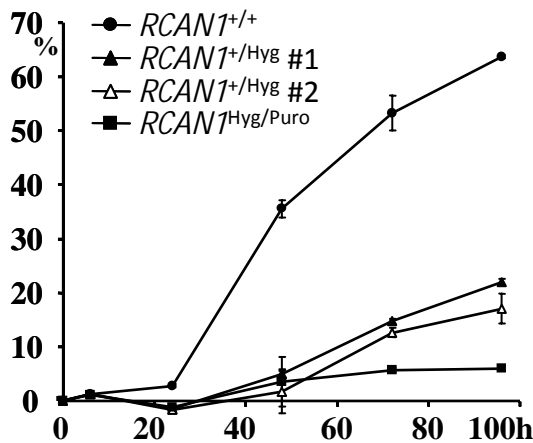


図2 *RCAN1*ノックアウトの細胞死に及ぼす影響  
それぞれの遺伝子型のNalm6細胞を $10^{-6}$ MのDexamethasoneで処理し、横軸に示された時間後に細胞死の程度をヨウ化プロピディウムの染色性を指標にフローサイトメトリーで解析した。

GC 以外の刺激によるアポトーシスにはほとんど影響を与えなかった (図 4)。

以上の点から GC によって生ずる白血病細胞のアポトーシスには GC の標的遺伝子である *RCAN1* が重要な役割を演じていると考えられた。

ヒト白血病細胞で DNA の損傷と修復に関連する遺伝子をノックアウトして解析した研究はあるものの、アポトーシス関連遺伝子をノックアウトして解析した研究は国内・国外を問わずまだなく、極めて独創的である。また本研究によって得られる成果は、より効果的な白血病に対する化学療法剤の開発や薬剤耐性の克服に貢献する可能性が高く、更に学術的な面からはヒトとマウスでのアポトーシス経路の違いの一端が明らかになると期待される。

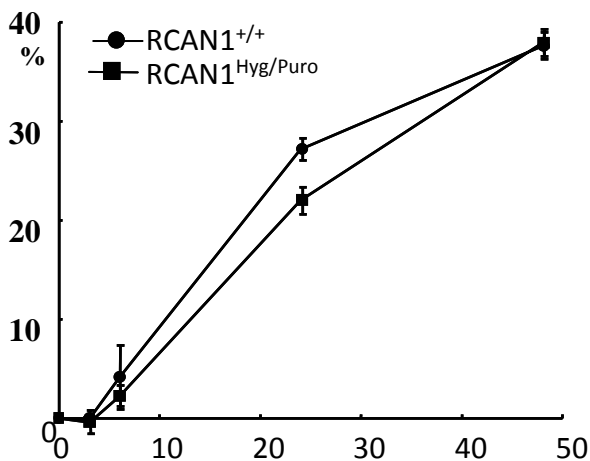


図4 *RCAN1*ノックアウトのTRAILによる細胞死に及ぼす影響

それぞれの遺伝子型のNalm6細胞を10ng/mlのTRAILで処理し、横軸に示された時間後に細胞死の程度を7-AADの染色性を指標にフローサイトメトリーで解析した。

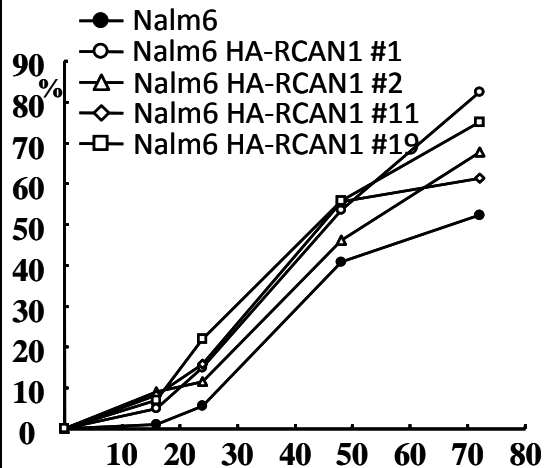


図3 *RCAN1*強制発現の細胞死に及ぼす影響  
*RCAN1*を強制発現させた4クローンと野生型のNalm6を $10^{-6}$ MのDexamethasoneで処理し、横軸に示された時間後に細胞死の程度をannexinV-PEの染色性を指標にフローサイトメトリーで解析した。

## 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12件)

Nagao, K., Fujii, K., Saito, K., Sugita, K., Endo, M., Motojima, T., Hatsuse, H. and Miyashita, T. Entire *PTCH1* deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan. Clin. Genet. 2011, 79, 196-198、査読有

Sasaki, R., Miyashita, T., Matsumoto N., Fujii, K., Saito, K., Ando, T. Multiple keratocystic odontogenic tumors associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome having distinct *PTCH1* mutations: a case report. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2010, 110, e41-e46、査読有

Miyauchi, J., Ito, Y., Tsukamoto, K., Takahashi, H., Ishikura, K., Sugita, K. and Miyashita, T. Blasts in transient leukemia in neonates with Down syndrome differentiate into basophil/mast-cell and megakaryocyte lineages in vitro in association with down-regulation of truncated form of GATA1. Brit. J. Haematol. 2010, 148, 898-909、査読有

藤井克則, 宮下俊之. ヘッジホッグと形態形成 - Gorlin 症候群と *PTCH* 遺伝子変異 - 日本小児皮膚科学会雑誌 2010, 28, 65-71、査読有

宮下俊之. グルココルチコイド受容体 日本薬理学会誌 2010, 135, 117-118、査読有

Sasaki, R., Saito, K., Watanabe, Y.,

Miyashita, T., Fujii, K., Agawa, K., Takayama, Y., Ando, T., and Akizuki, T. Nevoid basal cell carcinoma syndrome with cleft lip and palate associated with the novel *PTCH* gene mutations. *J. Hum. Genet.* 2009, 54, 398-402、査読有

Abe, Y., Oka, A., Mizuguchi, M., Igarashi, T., Ishikawa, S., Aburatani, H., Yokoyama, S., Asahara, H., Nagao, K., Yamada, M., and Miyashita, T. *EYA4*, Deleted in a case with middle interhemispheric variant of holoprosencephaly, interacts with *SIX3* both physically and functionally. *Hum. Mutat.* 2009, 30, E946-E955、査読有

藤井克則, 宮下俊之. ヘッジホッグと形態形成 - 発生生物学から臨床医学への応用 - 脳と発達 2009, 41, 247-252、査読有  
田辺良, 藤井克則, 宮下俊之, 他. Gorlin 症候群における臨床的検討 - 主要症状を中心とした多様な症候スペクトラム - 脳と発達 2009, 41, 253-257、査読有

遠藤真美子, 藤井克則, 宮下俊之, 他. Gorlin 症候群における分子遺伝学的検討 - *PTCH1* 遺伝子変異とその多様な変異スペクトラム - 脳と発達 2009, 41, 259-263、査読有

Ohba, S., Kawaguchi, H., Kugimiya, F., Ogasawara, T., Kawamura, N., Saito, T., Ikeda, T., Fujii, K., Miyajima, T., Kuramochi, A., Miyashita, T., Oda, H., Nakamura, K., Takato, T., and Chung, U.I. Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev. Cell* 2008, 14, 689-699.、査読有

宮下俊之, 押田忠弘. (2008) ステロイドの抗腫瘍作用 マイクロアレイを用いた作用機序の解析 日本臨床 66, 89-93、査読無

〔学会発表〕(計 12 件)

長尾和右, 桐生麻衣子, 高山吉永, 宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群の約 16% が *PTCH1* 遺伝子全欠損で発症する. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010. 9.22-24. 大阪  
高山吉永, 長尾和右, 桐生麻衣子, 宮下俊之. ヘッジホッグシグナル伝達経路に抑制的に働く抗 *PTCH1* マウスモノクロナル抗体の作製. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010. 9.22-24. 大阪

宮下俊之, 長尾和右, 遠藤真美子, 本島敏乃, 齋藤加代子, 杉田克生, 藤井克則. 日本人母斑基底細胞癌症候群の 16% は *PTCH1* 遺伝子の片アレル欠損で発症する. 第 16 回日本家族性腫瘍学会学術集会. 2010.7.9-10. 新潟

宮下俊之, 遠藤真美子, 齋藤加代子, 杉田克生, 藤井克則. 第 16 回日本家族性腫瘍学

会学術集会. 2010.7.9-10. 新潟

長尾和右, 高山吉永, 亀山孝三, 宮下俊之. 母斑基底細胞癌症候群症例の 16% が *PTCH1* 遺伝子の全欠損によって発症する. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010.12-7-10. 神戸

高山吉永, 志村将人, 桐生麻衣子, 長尾和右, 亀山孝三, 宮下俊之. ヒト Patched1 (*PTCH1*) レセプターに対して作製したマウスモノクロナル抗体の評価. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010.12-7-10. 神戸

阿部裕一, 島田隆史, 古山晶子, 星野英紀, 久保田雅也, 宮下俊之, 岡明. 6 番染色体長腕に欠損を認めた全前脳症亜型における原因遺伝子についての検討. 第 51 回日本小児神経学会総会, 2009.5.28-30, 米子  
佐々木亮, 齋藤加代子, 宮下俊之, 渡辺頼勝, 藤井克則, 阿川かおり, 高山吉永, 秋月種高, 安藤智博. 多発性顎嚢胞を契機に診断した *PTCH* 遺伝子異常を伴った基底細胞母斑症候群. 第 15 回日本家族性腫瘍学会学術集会, 2009.6.12-13, 東京

長尾和右, 山田正夫, 宮下俊之. *FKBP5* ノックアウト細胞株を用いたアポトーシス誘導機序の解析. 第 68 回日本癌学会総会, 2009.10.1-3, 横浜

長尾和右, 宮下俊之. *FKBP5* ノックアウト白血病細胞株を用いたグルココルチコイドによるアポトーシス誘導機序の解析. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜

阿部裕一, 石川俊平, 油谷浩幸, 横山成俊, 浅原弘嗣, 山田正夫, 岡明, 五十嵐隆, 宮下俊之. 全前脳症原因候補遺伝子としての *EYA4* に関する検討. 第 31 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, 2008.12.9-12, 神戸

宮下俊之, 藤井克則. *PTCH1* 遺伝子領域を含むゲノム欠損による母斑基底細胞癌症候群 3 例の解析. 第 14 回日本家族性腫瘍学会学術集会 2008.6.20-21, 東京

〔図書〕(計 1 件)

宮下俊之 (分担翻訳). 症例でわかる新臨床遺伝学 (水谷修紀 監訳) 2008, メディカル・サイエンス・インターナショナル

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~molgen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 俊之 (MIYASHITA TOSHIYUKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 60174182