

機関番号：35303

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21790546

研究課題名（和文）

インビトロモデルを用いた好中球分化とその破綻による白血病化機構の解明

研究課題名（英文）

The analysis of differentiative pathway in neutrophils using in vitro model and the pathogenic mechanisms of progression to leukemia

研究代表者

辻岡 貴之 (TSUJIOKA TAKAYUKI) 川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50330551

研究成果の概要（和文）：Sykは分子量72KDaの非レセプター型チロシンキナーゼである。Sykは血液造血細胞を含む多くの細胞に発現しておりBリンパ球の成熟に関係することが報告されてきた。我々は顆粒球細胞の白血病化におけるSykの役割について注目した。32D（マウス白血病細胞株）を用いて好中球分化モデルとSyk変異株を作製した。その結果、Syk自体と分化の関連は認めなかったが、SH2ドメインと分化抑制の関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The tyrosine kinase Syk (molecular weight 72KDa) which is widely expressed in hematopoietic and non-hematopoietic cells has been reported as a key molecule which is associated with hematopoiesis of the B cell lineage. We noticed the role of Syk in leukemic progression of myeloid lineage and established the differentiative model in neutrophil and Syk mutant cell lines using 32D (mouse AML cell lines). As a result, we suggested that Syk was not associated with the differentiation of myeloid lineage, but high expression of Syk SH2 domain was related to the suppression of differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：検査血液学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：Syk, 好中球, 分化, G-CSF レセプター

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病は分子標的療法、造血幹細胞移植が確立された現在においても5年生存率が20～40%程度の予後不良疾患である。

(2) 白血病の発症機序・白血病化のメカニズムを解明することは白血病患者の予後向上にとって重要な課題である。

2. 研究の目的

(1) 顆粒球の分化機序と Syk の役割を解明すること。

(2) 白血化における Syk の役割を明らかにすること。

3. 研究の方法

1) 細胞株

32D clone 3 細胞株 (IL-3 依存性マウス白血病細胞株) を用いた。RPMI1640 培地に牛胎児血清 10% と抗生剤 (ペニシリン・ストレptomycin) を加えたものを 37 度, CO₂ 5% の条件下で培養した。

32D-Dominant-negative Syk 変異株は 2mg/ml の Hygromycin B を添加し培養した。

2) 形態観察

細胞 10000 個を培養液中から採取しサイトスピン標本を作製した。メイ・グリーンワルド・ギムザ染色の後, 光学顕微鏡にて形態観察を行った。

3) 細胞増殖

細胞増殖の評価を MTT アッセイで行った。細胞増殖の評価を 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT 試薬: Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO, USA) を用いて行った。96 穴マイクロプレートに細胞数 2500/well の条件下で培養した。Day0, 3, 5, 7 にてマイクロプレートリーダー (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies, Offenburg Germany) を用いて吸光度を測定した。

4) フローサイトメトリー

細胞表面の G-CSFR の発現を計測した。細胞を PBS で洗浄溶解し室温で Rabbit anti-human G-CSFR polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を 1 時間, その後, AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG 抗体 (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, USA) で 40 分間反応させた。フローサイトメトリー (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて細胞表面抗原発現を計測した。解析は Cellquest software (BD Bioscienc, Mansfield, MA) で行った。

5) ウェスタンブロット法

Syk の蛋白発現を検討した。細胞 (5x10⁶ 個) を 1 ml の可溶化バッファー (1% TritonX-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM バナジル酸, 1mM PMSF) にて溶解し, 15000 回転にて遠心沈降後, 上清を 2% SDS, 5% 2-mercaptethanol を含むサンプルバッファーにて 100°C、3 分間処理した。次にサンプルを SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ, PVDF メンブレンに転写後, メンブレンをスキムミルクにてブロッキングした。1 次抗体を室温にて 1 時間反応させ洗浄後 HRP 標識 2 次抗体にて室温で 30 分反応させた。洗浄後 ECL 発光アッセイシステム

にて得られた発光バンドをレントゲンフィルムに感光させた。

6) プラスミド, 変異株作製

Human G-CSFR cDNA を Xba I で切りだした後, pcDNA6V5/HisA ベクター (Invitrogen) に ligation した。さらに, G-CSFR 遺伝子とベクター内の V5 エピトープを直接つなげる目的で遺伝子組み換えを行った。まず BstE II (5') と Xba I (3') でストップコドン削除した。BstE II 切断部位からストップコドンまでの PCR 産物を作製し V5 エピトープと結合させた。これを 32D にエレクトロポレーション法にて導入し positive clone を 10⁴ g/ml の Blasticidin で selection した。V5 の発現は anti-V5 抗体 (Invitrogen) を用いてウェスタンブロット法で確認した。

Syk 遺伝子発現を抑制するために Lentiviral expression system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて SykshRNA/pLKO.1-puro (Sigma) を 32D 細胞株に導入した。positive clone を 4⁴ g/ml の Puromycin で selection した。Syk 発現の確認はウェスタンブロット法で Rabbit anti-human Syk polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いて行った。

Human G-CSFR cDNA を 32D にエレクトロポレーション法にて導入した。Syk 遺伝子発現を抑制するために Lentiviral expression system を用いて SykshRNA を 32D 細胞株に導入した。

4. 研究成果

a) 32D -G-CSFR 細胞株作製

32D 親株の形態的特徴は単核で好塩基性の強い細胞質を持つ幼若な芽球である。細胞表面に G-CSFR の発現をわずかに認める (図 1c)。これを G-CSF100ng/ml で処理すると 48~72 時間で好中球様細胞に分化する。しかし, 急激に分化し細胞死に陥るため形態評価のモデルとして適さない。そこで我々は過去の報告にもある通り 32D 細胞株に G-CSFR を強制発現させることで, より生理的な分化モデルである 32D-G-CSFR 株を作製した (4)。G-CSFR の細胞表面の発現はフローサイトメトリー法で, V5 をウェスタンブロット法で確認した 32D-G-CSFR 株は表面に G-CSFR を強発現しており G-CSF で処理すると day3 までは増殖し, それ以降は分化に移行した。

b) 32D-DNSyk 細胞株

32D -DNSyk /G-CSFR 株作製

Syk は分子量 72KDa の非レセプター型チロシンキナーゼで 2 つの SH2 domain と 1 つの kinase domain からなる。Dominant negative Syk (DNSyk) とは本来の Syk の構造から

kinase domain を削除したものである。我々は Syk 発現を抑える目的で 32D 親株に DNSyk (SH2 domain 強発現) を強制発現させた 32D-DNSyk 株 (32D-SykSH2 強発現株) を作製した。まずウェスタンブロット法で Syk 発現の低下を確認した。32D-DNSyk 株は形態的に親株同様、幼若芽球であったが G-CSF を加えても分化を認めなかった。さらにこれは G-CSFR を同時に導入した変異株 32D-DNSyk/G-CSFR でも同様の傾向を示した。

c) 32D-SykhshRNA,

32D -SykhshRNA/ G-CSFR 細胞株作製

Syk と分化との関連をより詳細に解析するためレンチウイルスベクターを用いて 32D-SykhshRNA 株の作製を行った。IL-3 培養下では形態的に細胞質が好塩基性の強い芽球であることは親株同様である。ウェスタンブロット法で Syk の発現の低下を確認した。G-CSF 処理を行うと親株同様に 48~72 時間で急速に分化傾向を示した。G-CSFR+SykhshRNA+32D 細胞株では 32D-GCSFR 株同様に day3 まで増殖しそれ以降分化傾向を認めたが後者と比較して IL-3 培養下の増殖スピードが加速した。

d) 32D-DNSyk/ SykhshRNA

32D -SykhshRNA /G-CSFR/DNSyk
細胞株作製

Syk の発現のみを抑えると細胞の増殖スピードは加速する。しかし、細胞の分化に影響を及ぼさない。32D-DNSyk 株で分化抑制を認めたのは Syk の発現を抑えたためではなく Syk-SH2 domain 強発現の影響が考えられる。そこで 32D-SykhshRNA 株に DNSyk (Syk-SH2 domain) を導入し、G-CSF で処理した時、分化が抑制されるか検討した。32D-SykhshRNA/DNSyk 株は IL-3 培養下では形態的に細胞質が好塩基性の強い芽球であることは親株同様である。ウェスタンブロット法では Syk 発現抑制と DNSyk 発現を認めた。

考察

顆粒球分化経路における増殖・分化の区分は極めて不明瞭である。我々は 32D 細胞株に G-CSFR を強制発現させることにより好中球分化モデルを作製し Syk 遺伝子発現を操作することによって G-CSF シグナルを介する増殖・分化への影響に着目した。

SykhshRNA 株の結果から Syk 発現低下により IL-3 培養下での細胞増殖が加速した。32D 親株は IL-3 dependent な細胞株であるが 32D-SykhshRNA 株はサイトカイン刺激の無い状態でも生存し続けた。これに対してウェスタンブロット法で Bcl-2, Bcl-XL, survivin の発現を検討したが両者で顕著な差を認め

なかった。

Syk 発現低下は分化そのものに影響しなかったが DNSyk 株の結果から G-CSF 処理に対する分化抑制を認めたため SykSH2 ドメイン強発現が分化抑制に関わっている可能性が示唆された。今後、SH2 ドメインと分化抑制との関係を明らかにし、それ以降の下流分子を明らかにすることにより SH2 との関係を解析する。また 32D-Syk-SH2/G-CSFR 株に野生型 Syk を発現させた場合の変化、SH2 ドメイン発現の強弱による分化の程度、SH2 ドメインと既存の増殖・分化経路との関係について検討予定である。

Syk 発現低下株については G-CSF 刺激時に分化速度の亢進を認め、核に過分葉所見を認めた。Syk 発現との関連は不明であるがこの点についても今後明らかにしていきたい。

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 4 件)

- 1) Tsujioka T, Kisimoto M, Kondo T, Matsuoka A, Tasaka T, Sugihara T, Wada H and Tohyama K: Impact of serum soluble interleukin-2 receptor levels on the diagnosis of malignant lymphoma. *Kawasaki Medical Journal*, in press (査読あり).
- 2) Tsujioka T, Tohyama K: Application of laser scanning cytometry to clinical and laboratory hematology. (Pogorelov A eds.). **Laser scanning, Theory and applications**, 185-194: INTECH, Vienna, Austria, 2011. (依頼総説)
- 3) 山本博美, 中原貴子, 久山亜紀, 松岡亮仁, 辻岡貴之, 近藤敏範, 田坂大象, 通山 薫: 血液細胞における核膜蛋白 lamin A/C の発現とその局在. **日本検査血液学会雑誌** 11(2):177-183, 2010. (査読有.)
- 4) Matsuoka A, Tochigi A, Kishimoto M, Nakahara T, Kondo T, Tsujioka T, Tasaka T, Tohyama Y, Tohyama K: Lenalidomide induces cell death in an MDS-derived cell line with deletion of chromosome 5q by inhibition of cytokinesis. **Leukemia** 24:748-755, 2010 (査読有.)

[学会発表] (計 2 件)

- 1) Tsujioka T, Kishimoto M, Matsuoka A, Kuyama A, Nakahara T, Mukae Y, Tasaka T, Tohyama K: Effect of a DNA

methyltransferase inhibitor (decitabine)
in an MDS-derived cell line. 日本血液学会
学術集会抄録集 51(9)1112, 2010.
2010年9月24日, パシフィコ横浜

2) 辻岡貴之, 通山 薫: 骨髓異形成症候群
の形態診断. 日本臨床検査医学会学術集会
抄録集 58 補冊 75, 2010.
2010年9月12日, 京王プラザホテル東京

[図書] (計2件)

1) 辻岡貴之, 他、分光堂、病理形態学キー
ワード、2010, 342-343.

2) 辻岡貴之, 他、医学書院、検査と技術、
2009、1104-1107.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/lh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻岡 貴之 (Tsujioka Takayuki)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50330551