

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号： 34439
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22591039
 研究課題名（和文） 骨髄腫細胞増殖におけるLyn-PI3 kinase 刺激伝達系とPKM2の役割
 研究課題名（英文） The Role of the Lyn-PI 3-kinase signaling pathways and PKM2 in the myeloma cell proliferation
 研究代表者
 石川 秀明（ISHIKAWA HIDEAKI）
 千里金蘭大学・生活科学部・教授
 研究者番号： 40294623

研究成果の概要（和文）： interleukin-6 (IL-6) 刺激により signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 と extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 が活性化されるが、それらに加えて CD45-Lyn の活性化を介した phosphatidylinositol (PI)-3 kinase-Akt 刺激伝達系が活性化されることが IL-6 誘導性骨髄腫細胞増殖に重要である。

研究成果の概要（英文）： In addition to the activation of both signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, the CD45-Lyn-mediated activation of the phosphoinositide (PI) 3-kinase-Akt signaling pathways appear to be important for the IL-6 induced proliferation of myeloma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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、PI 3-kinase、Akt、FoxO1、NF-κB、解糖系

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)₆tag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)₆tag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

ショ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。IL-6 依存性 CD45⁺骨髄腫細胞株に Lyn を強制発現させると、IL-6 による細胞増殖が促進され、PI 3-kinase および Akt の活性化が亢進していた。PI 3-kinase 選択的阻害剤または 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、Fox0、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。

Forkheadファミリー転写因子はAktによってリン酸化されると核外に移動し、14-3-3 と結合して細胞質にとどまり、転写因子としては不活化型となる。非リン酸化 Fox0 は核内で活性化型転写因子として、pro-apoptotic 遺伝子 Fas ligand, Bim, PUMA などの発現誘導、anti-apoptotic 遺伝子 FLIP の発現抑制を介して apoptosis を誘導する。また、CDK inhibitor p27^{Kip1} 遺伝子の発現を誘導して cell cycle arrest を起こす。Akt によって Fox0 が不活化されることで、細胞増殖が促進される可能性が推察された。ただし、Fox03a に関しては、Akt 以外にも ERK や IKK (I κ B kinase) b によってリン酸化され不活性化されることが報告されており、Akt の直接の下

流で制御されているのか更に検討が必要である。

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 誘導遺伝子の解析

IL-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。

canonical および non-canonical pathway NF- κ B の活性化は認められず、典型的な NF- κ B 標的遺伝子の発現の変化は観察されなかったが、興味深いことに Bcl3 標的遺伝子および p53 標的遺伝子の一部に発現変化が認められた。

Fox0 標的遺伝子について各々 RT-PCR で解析したところ、Fox01 の標的遺伝子 FasL、p27Kip1 の遺伝子発現が低下していた。

(3) 考察・まとめ

Forkhead ファミリー転写因子の中でも Fox01, Fox04, Fox03a は線虫の相同遺伝子（蛋白質）DAF (abnormal dauer formation)-16 と相同性が高く、IL-6 による骨髄腫細胞増殖においても PI 3-kinase-Akt-Fox0 刺激伝達系が重要な役割を担っている可能性が示唆された。線虫の遺伝学的解析により同定された寿命調節に関与する刺激伝達経路（この経路が抑制されると老化の遅延と寿命の延長が認められる）insulin/IGF-I \rightarrow insulin/IGF-I receptor (daf-2) \rightarrow PI 3-kinase (Age (ageing alteration)-1) \rightarrow Akt \downarrow Fox01 (daf-16) が、IL-6 による骨髄腫細胞増殖に重要な第三の経路 CD45-Lyn の下流で活性化されている事実は大変興味深い。これは、寿命・老化の制御においてグルコース代謝（カロリーの消費）を制御するホルモン（insulin/IGF-I）とそのシグナル伝達系が進化的に重要であることを示唆している。

一方、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る。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。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。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 (Warburg effect) が細胞増殖および腫瘍形成に重要であると考えられた。

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、LDH または ENO のリン酸化チロシンと PKM2 が結合することが強く疑われ、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。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。

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2件)

- ①Mohd S. Iqbal, Naohiro Tsuyama, Masanori Obata and Hideaki Ishikawa. A novel signaling pathway associated with Lyn, PI 3-kinase and Akt supports the proliferation of myeloma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、Vol. 392, No. 3, 2010, 415-420
DOI:10.1016/j.bbrc.2010.01.038
- ②石川秀明、骨髄腫細胞のシグナル伝達、医学のあゆみ、査読無、Vol. 242, No. 13, 2012, 1027-1032
<http://www.ishiyaku.co.jp/>

[学会発表] (計5件)

- ①Hideaki Ishikawa, Mohd S. Iqbal, Naohiro Tsuyama and Masanori Obata. The IL-6-mediated signaling pathway associated with Lyn, PI 3-kinase and Akt supports the proliferation of human myeloma cells. 14th International Congress of Immunology, 2010年8月24日、神戸
- ②石川秀明、Mohd S. Iqbal、津山尚宏、小幡雅則、The Lyn, PI 3-kinase and Akt signaling pathway supports the proliferation of human myeloma cells (Lyn-PI3 kinase-Akt 刺激伝達系はヒト骨髄腫細胞の増殖を促進する)、第72回日本血液学会学術集会、2010年9月25日、横浜
- ③石川秀明、Mohd S. Iqbal、津山尚宏、小幡雅則、Lyn-PI 3-kinase-Akt 刺激伝達系による骨髄腫細胞の増殖機構、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月8日、神戸
- ④石川秀明、IL-6-induced phosphorylation of Akt and FoxO1 in human myeloma cell lines (IL-6 刺激後の骨髄腫細胞における Akt と FoxO1 のリン酸化)、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋
- ⑤石川秀明、小幡雅則、IL-6-induced phosphorylation of FoxO1 as a target of the PI-3-kinase-Akt pathway in myeloma cells (骨髄腫細胞における IL-6 刺激後 PI 3-kinase-Akt 刺激伝達系標的分子 FoxO1 のリン酸化)、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月16日、名古屋

[図書] (計2件)

- ①石川秀明、南江堂、多発性骨髄腫治療マニュアル、2012年、28-35
- ②石川秀明、日本臨牀社、別冊日本臨牀 血液症候群 III—その他の血液疾患を含めて— 第2版、2013年、519-535

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 秀明 (ISHIKAWA HIDEAKI)
千里金蘭大学・生活科学部・教授
研究者番号： 40294623

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし