

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591380

研究課題名(和文)白血病の分化制御規定因子PRDM16とその生理的インヒビターLR11の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the differentiation control factor of leukemia, PRDM16 and physiological inhibitor LR11

研究代表者

清水 直美 (SHIMIZU, Naomi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：30375802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：白血病細胞でLR11が高発現し、この分子が白血病細胞の運動能亢進に関わるとともに、G-CSFにより可溶性LR11が上昇することを報告してきた。このような背景下に白血病細胞の分化制御を規定する転写因子とLR11の関わりについて検討を行ったが、核内転写因子との明らかな関連性は認められなかった。しかし、分化過程において重要なサイトカインであるG-CSFは白血病細胞株において可溶性LR11とほぼ同じ挙動でTNF- α を上昇させ、プロテアーゼ活性化を惹起していることが明らかとなった。プロテアーゼにより膜に局在する転写因子が活性化する機序の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported that LR11 is highly expressed in blasts of leukemia cells and the soluble form of LR11 (sLR11) is a modifier of leukemic cell migration. Moreover, the sLR11 levels are elevated by G-CSF. We evaluated the relation between transcriptional factors which regulate differentiation mechanism and LR11 under this background. It was not observed apparent association between the nuclear transcription factor and LR11. However, G-CSF, an important cytokine in the differentiation process, increased the TNF- α with soluble LR11 in leukemic cell lines. These results revealed the involvement of protease activation in the mechanism. The transcriptional factors which localize to cell membrane may be activated by proteases and play a key role in the relation between the transcription factors and LR11.

研究分野：血液内科

キーワード：LR11 G-CSF 白血病 転写因子 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) LR11 は幼弱血管細胞からクローニングした新規受容体遺伝子である。細胞膜から shedding により放出された可溶性 LR11 は、ウロキナーゼ受容体(CD87)シグナルを介して未分化細胞の機能を制御する (Jiang, *JCI* 118(8) 2733-2746, 2008)。LR11 ノックアウトマウスでは、血管細胞のみならず脂肪細胞の分化も障害され、脂肪細胞内で白色脂肪から褐色脂肪への形質転換が認められ異所性褐色脂肪細胞が誘導されるが本機序として、褐色脂肪細胞での LR11 による PRDM16 機能発現抑制が明らかとなり、LR11 ノックアウトマウスで PRDM16 が白色脂肪組織内で過剰発現し異所性の褐色脂肪分化が導かれることが近年発見された。

(2) G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) は造血前駆細胞の分化過程において重要なサイトカインであるが、G-CSF による造血幹細胞の動員過程において、骨髄球系細胞内の LR11 が細胞内で発現上昇するとともに、骨髄内、血清可溶性 LR11 も上昇する。また G-CSF により上昇した可溶性 LR11 が細胞の遊走、接着に関与することを報告してきた。また LR11 は白血病細胞や悪性リンパ腫において腫瘍細胞でも高発現するとともに、可溶性 LR11 も高値であること、また腫瘍量が多く、ステージングが進行し病勢の強いものほど、その発現が高いことも報告してきた。先に述べた PRDM16/MEL1 は、骨髄性白血病や骨髄異形成症候群で高発現する EVI1 と構造の類似した遺伝子ファミリーを形成し EVI1 を高発現する白血病は予後不良であることも明らかとなっている。

(3) アルツハイマー病の患者脳内では LR11 の発現量が減少していること、また LR11 ノックアウトマウスの脳においてアルツハイマー病の有力な原因物質とされるアミロイドタンパク質の量が増加しており、このマウスがアルツハイマー病の症状を示したことから、LR11 がアルツハイマー病に対し保護的に働いていることも明らかとなっている。また脳内アミロイドタンパク質の動態にはプロテアーゼが大きな役割を果たすことも分かっているが、全長型 LR11 からプロテアーゼ切断により生じる可溶性 LR11 は髄液中で測定可能であり、髄液中可溶性 LR11 はアルツハイマー病のバイオマーカーとして注目されている。以上のように LR11 が shedding される過程でのプロテアーゼの活性化は血液疾患の病態の面からも非常に重要である。

2. 研究の目的

造血幹前駆細胞の転写調節因子である PRDM16 はその遺伝子変異により急性骨髄性白血病を発症するが、脂肪細胞を用いた基

礎検討により、LR11 は PRDM16 の生理的インヒビターLR11 であることが明らかとなった。LR11 による PRDM16 を含めた転写因子の制御と造血幹前駆細胞が白血病がん細胞に至る分子メカニズムを解明し、血液悪性腫瘍が病勢進展していく過程において本調節機構と密接に関わるプロテアーゼの役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

HL-60、U937 を用いた基礎検討において G-CSF は PRDM16 の発現を亢進させ、LR11 発現を低下させること、精製された可溶性 LR11 は同細胞の PRDM16 発現を抑制することが確認され、多能性幹細胞の維持、構築における LR11 と PRDM16 の役割について検討を進めた。また、K562 は他の白血病細胞株と異なり、LR11 を発現していない細胞株である。K562 に LR11 を過剰発現させた細胞株(K562 OX)を樹立し、過剰発現株の転写因子の基礎検討から造血幹細胞の分化過程において、赤血球、血小板への分化を規定する GATA1、2 に着目し解析を行った。白血病細胞株 (HL-60、U937) また赤芽球系株として K562、HEL、TF-1、K562 に LR11 を過剰発現させた K562 OX を用いて、PRDM16、GATA1、2、WT1 などの転写因子の発現を可溶性 LR11 添加群、非添加群にて RT-PCR、Real time PCR 法を用い mRNA にて検討した。

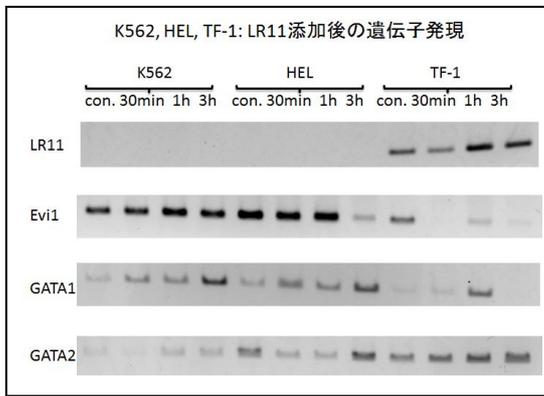
G-CSF により可溶性 LR11 が shedding を受ける系において、プロテアーゼ活性化の有無を明らかにするために、TNF- α の測定を ELISA 法にて行った。

G-CSF により LR11 の発現上昇が生じるが、LR11 産生細胞の同定のために臨床骨髄検体を用いて、LR11 の免疫染色を行うとともに、陽性細胞の同定を MPO 染色にて検討した。また G-CSF により活性化されるプロテアーゼの同定のために、同標本の連続切片にて種々のプロテアーゼの染色を行った。

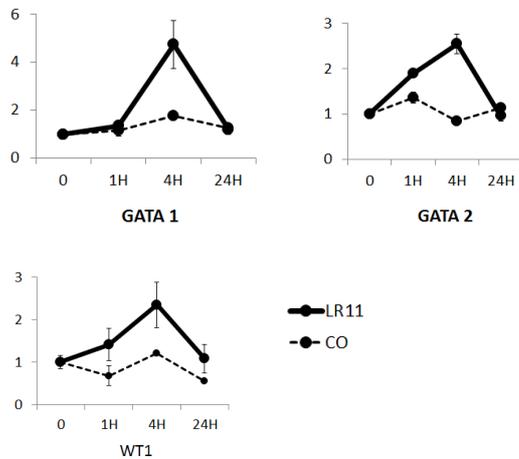
白血病細胞株を用い、プロテアーゼインヒビターを添加し G-CSF により活性化されるプロテアーゼにより上昇する LR11 等の分子動態がキャンセルされるかどうか検討することにより、LR11 shedding に関わるプロテアーゼの同定を行うことを目的とした。

4. 研究成果

K562 HEL TF-1 において可溶性 LR11 添加後、LR11、Evi1、GATA1、2 の発現を RT-PCR で確認したところ、TF-1 のみ LR11 の発現を認めた。Evi1 は有意な変化が得られなかったものの、GATA1、2 の発現上昇が認められた。以上の結果を踏まえ、K562 OX 株で上記遺伝子の検討を行ったが、control 細胞株と比し有意な差が得られなかった。

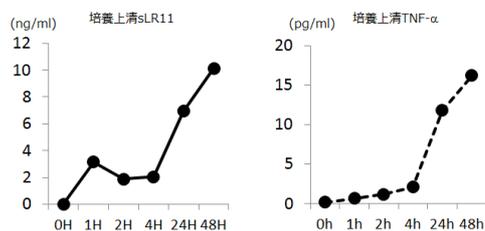


次に HL-60、U937 の白血病細胞株を用い、可溶性 LR11 を添加し、PRDM16 等の転写因子の発現を Real time PCR 法を用い mRNA にて検討した。可溶性 LR11 の活性の有無は遊走能の検討を行い添加実験毎に評価とした。PRDM16 に有意な変化は認められなかったが、下記のように GATA1、2 の上昇とともに WT1 の発現が認められた。しかし同様の系を用いその後も再現性を数回確認したが、明らかな再現性の確認が困難であった。

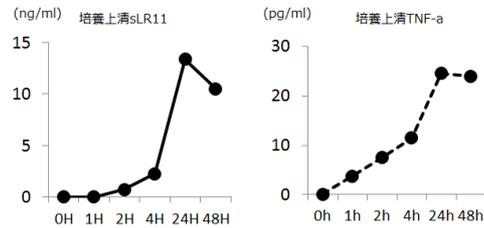


G-CSF によりプロテアーゼの活性化が生じている可能性を検討するために、HL-60、U937 の白血病細胞株を用い、G-CSF 添加後の培養上清にて可溶性 LR11 とともに、TNF- の測定を ELISA 法にて行った。G-CSF(100 ng/ml) 添加後培養上清 sLR11 TNF- 濃度

HL-60

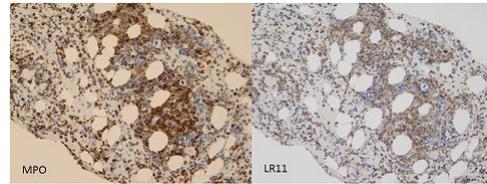


U937

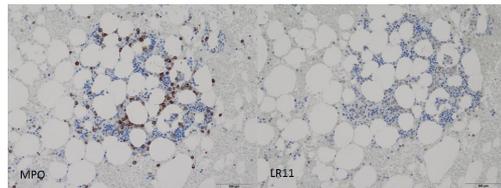


上記に示すように sLR11 と TNF- はほぼ同じ挙動を示すことが示唆され、同じプロテアーゼにより切断されていることが明らかとなった。

骨髓穿刺検体での連続切片の免疫染色により LR11 陽性細胞の同定を行った。CML 症例の骨髓上清中 sLR11 は 73.8 ng/ml と高値であり病理検体での陽性細胞の数も多く、染色濃度も濃い結果が得られた。そして MPO 染色と比較することにより、LR11 陽性細胞は骨髓球系の細胞であることが明らかとなった。



MDS 症例でも同様の検討を行った。本症例の骨髓上清中 sLR11 は 22.2 ng/ml であった。上記症例と比し、LR11 陽性細胞の数も少ない、染色程度も弱い傾向が得られた。そして LR11 陽性細胞はやはり MPO 陽性細胞と一致しており、骨髓球系の細胞であることが確認された。



このような臨床検体を用い、関連するプロテアーゼの同定を行うべく、TNF-、MMP-9、ADAM17 などのプロテアーゼの免疫染色を行ったが、いずれも明らかな陽性所見は得られなかった。固形癌の検体では ADAM17 染色では LR11 と一致して染色される傾向があり、骨髓検体を凝固させる過程でのプロテアーゼの失活が評価を困難にさせているのではという可能性を示唆した。

G-CSF に活性化されるプロテアーゼの同定を行うために、まず TNF- のインヒビターである TAPI-0 を HL-60、U937 の白血病細胞株に添加し基礎検討を行った。G-CSF (100 ng/ml) を添加した系、TAPI-0 2 時間 pre incubation 後 G-CSF (100 ng/ml) を添加した系を作成し、無添加の系をコントロール

としそれぞれ 24 時間後に TNF- の測定を EILSA 法にて行った。G-CSF 添加した系では TNF- の上昇は確認できたものの、TAPI-0 によるキャンセルは確認できなかった。以上のことから TNF- の shedding に関係するプロテアーゼとして TCE に着目して検討を行ったが、他のプロテアーゼにより shedding の調節を受けている可能性が示唆された。

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 4 件)

(1) Serum soluble LR11, a novel tumor derived biomarker associated with the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma.

Ohwada C, Yamazaki A, Kawaguchi T, Sugita Y, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Tsukamoto S, Muto T, Jiang M, Higashi M, Yokote K, Tamaru JI, Bujo H, Nakaseko C.

Leuk Lymphoma. 2015 Mar 11:1-4. 査読有

(2) Potential utility of serum soluble LR11 as a diagnostic biomarker for intravascular large B-cell lymphoma.

Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Higashi M, Fujikawa K, Matsue K, Yokote K, Tamaru J, Bujo H, Nakaseko C.

Leuk Lymphoma. 2014 Oct;55(10):2391-4. 査読有

(3) G-CSF induces the release of the soluble form of LR11, a regulator of myeloid cell mobilization in bone marrow.

Shimizu N, Nakaseko C, Jiang M, Nishii K, Yokote K, Iseki T, Higashi M, Tamaru J, Schneider WJ, Bujo H.

Ann Hematol. 2014 Jul;93(7):1111-22. 査読有

(4) Tetraspanin CD9 modulates

ADAM17-mediated shedding of LR11 in leukocytes.

Tsukamoto S, Takeuchi M, Kawaguchi T, Togasaki E, Yamazaki A, Sugita Y, Muto T, Sakai S, Takeda Y, Ohwada C, Sakaida E, Shimizu N, Nishii K, Jiang M, Yokote K, Bujo H, Nakaseko C.

Exp Mol Med. 2014 Apr 4;46:e89. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

(1) Naomi Shimizu, Hideaki Bujo, Meizi

Jiang, Keigo Nishii, Emiko Sakaida, Chikako Ohwada, Masahiro Takeuchi, Naoya Mimura, Yusuke Takeda, Shokichi Tsukamoto, M, Tomoya Muto, MD PhD, Ichiro Tatsuno, Chiaki Nakaseko. Soluble LR11, GCSF - induced Migration Regulator from Myeloid Cells, Is Highly Increased in Chronic Myeloid Leukemia **The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology**, San Francisco, USA, Dec 6-9, 2014

(2) Naomi Shimizu, Chiaki Nakaseko, Masahiro Takeuchi, Chikako Ohwada, Shokichi Tsukamoto, Takeharu Kawaguchi, Atsuko Yamazaki, Keigo Nishii, Meiji Jiang, Koutaro Yokote, Isamu Fukamachi, Hideaki Bujo. Soluble LR11, a novel acute leukemia marker, drastically induces WT1 mRNA expression together with synergic activation of GATAs, and the migration activity. **The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology**, Atlanta, USA, Dec 8-11, 2012

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

清水 直美 (SHIMIZU, Naomi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号 : 3 0 3 7 5 8 0 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：