

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650623

研究課題名(和文)新規細胞株を用いたマスト細胞腫瘍化プロセスのメカニズム解析

研究課題名(英文)Mechanism of tumorigenesis in mast cells

研究代表者

安部 良 (Abe, Ryo)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号：20159453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：免疫で役割を果たすマスト細胞の増殖は、サイトカインとそれに対する受容体によって厳密に調節されている。そのため、それらの過剰発現や恒常的活性化変異は、マスト細胞を自律増殖に導き、マスト細胞腫瘍につながる事が知られている。しかし、マスト細胞ががん化するプロセスはほとんど理解されていない。以前に、当研究室では、マウス脾臓からの複数のマスト細胞株を樹立しており、その中にマスト細胞腫瘍の特徴を持った細胞株を見出した。本研究では、マスト細胞の腫瘍化プロセスの理解を目的とし、マイクロアレイ解析と生化学的手法を組み合わせ、マスト細胞の腫瘍化に関与する因子の同定を試みた結果、いくつかの知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Mast cells have an important role in immune responses. Their proliferation is tightly regulated by various receptors that bind to cytokines. It is well known that constitutively activation of the receptors lead to mast cell tumors. However, the precise mechanism of the tumorigenesis of mast cells is not fully understood. Recently, we established a mast cell lines that have characteristic features of a mast cell tumor. Using microarray analyses and biochemical analyses, we obtained some novel findings about the process of mast cell tumorigenesis.

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん細胞の特性 マスト細胞 腫瘍化 STAT5 Akt

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞・好塩基球はアレルギー反応における重要なエフェクター細胞であるのみならず、様々な慢性炎症性疾患の病態形成において極めて重要な役割を果たしている (*Immunol. Rev.* 217:5, 2007)。また、マストサイトーシスやマスト細胞腫などの増殖性疾患も存在する。マスト細胞の分化、生存、増殖はサイトカイン環境により厳密に制御されており、この恒常性の破綻が上記疾患の病因であると考えられている。一方、近年、マスト細胞 progenitor (MCP) が骨髄中で同定され、さらには脾臓中においてマスト細胞・好塩基球 progenitor (BMCP) の存在が確認された (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18105, 2005)。しかしながら、progenitor として維持することが困難なことが、マスト細胞・好塩基球系細胞の分化に関する研究の障壁となっている。さらに、増殖・機能制御機構についてもいまだ不明な点が多く、これらの点について理解が進めば、アレルギー性疾患や炎症疾患の新たな治療法の開発につながる可能性がある。さらに、マスト細胞の腫瘍化は、骨髄性白血病などとの共通性が指摘されており、この点においても、重要な知見が得られると考える。

2. 研究の目的

本研究は、培養環境により、細胞の形態、表面分子、及び細胞増殖におけるサイトカイン要求性が変化する、新規マスト細胞系細胞株 (R cell) を用い、マスト細胞の分化や増殖、他の細胞リネージへの分化、さらには腫瘍化プロセスに関わるメカニズムを明らかにすることを目的としている。具体的には、オリジナルの細胞株より *in vitro* で誘導された一連の細胞株の、網羅的な遺伝子発現解析、細胞の形態・表面分子発現解析、細胞機能解析、細胞内シグナル解析、個体内での腫瘍形成能、転移能の解析により、(1)

マスト細胞系のサイトカイン感受性決定メカニズム、(2) マスト細胞のサイトカイン依存性制御の破綻による腫瘍化メカニズム、(3) c-Kit チロシンキナーゼの恒常的活性化変異に依存する腫瘍化と依存しない腫瘍化メカニズムを明らかにする。本研究をアレルギー性疾患や骨髄系細胞腫瘍の新規治療法開発の一助としたい。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞系のサイトカイン感受性決定メカニズムの解析、(2) 腫瘍化に関わるメカニズムの解析

R cell をクローニングしたのち、RCGF 添加量を徐々に減少させた条件で培養することで、サイトカイン感受性の異なる複数クローン由来の細胞を樹立する。これらの細胞の *in vitro* での増殖反応や、*in vivo* での腫瘍原性を検討する。細胞表面分子の発現や、細胞内タンパク質のリン酸化、Jak/STAT、PI-3K/Akt、MAPK pathway などのシグナル伝達系の活性化を解析するとともに、DNA アレイやプロテオーム解析により、それぞれの形質・機能の発現に寄与する候補遺伝子同定する。これらの遺伝子を、R cell に強制発現、あるいはノックダウンすることにより、その機能を明らかにする。

(3) c-Kit 変異体に依存しない腫瘍化メカニズム

樹立した腫瘍化した細胞株の中には、マスト細胞の腫瘍化に必須であると考えられてきた c-Kit の恒常的活性化変異を有さないものがある。上記の研究方法を本細胞株に適用し、c-Kit 活性に依存しないマスト細胞の腫瘍化機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) マスト細胞系のサイトカイン感受性決定メカニズムの解析

増殖のためのサイトカイン濃度が異なる細胞株間の mRNA 発現レベルを比較するた

めに、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、完全に腫瘍化したマスト細胞株に有意に高発現する遺伝子を複数種類見出した (図 1)。これらの遺伝子群を一つずつノックダウンしたところ、腫瘍化マスト細胞株の自律増殖を担う複数の因子を見出すことができた。今後、これら因子がヒトのマスト細胞腫瘍の自律増殖で役割を果たすかを明らかにしていきたい。

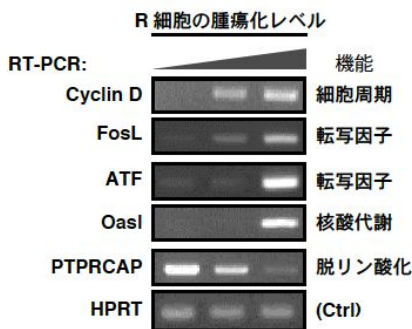


図 1. 腫瘍化プロセスにおける遺伝子発現変動。トランスクリプトーム解析において、腫瘍化に伴い発現亢進/抑制を示す遺伝子の一部を示す。腫瘍化レベルによって特徴的な変動が認められる。これら因子が腫瘍化の各段階に必要なのか？

(2) 腫瘍化に関わるメカニズムの解析
腫瘍化したマスト細胞株のシグナル伝達経路を調べたところ、STAT5, Akt, Erk が恒常的に活性化していた。STAT5, Akt の阻害は、有意にその増殖を抑制した。一方、Erk の抑制は腫瘍化マスト細胞の増殖に影響無かったことから、その自律増殖には STAT5, Akt が必須の役割を果たすことが明らかになった。興味深いことに、STAT5 の活性化は、現在までに報告されている JAK によるメカニズムではなく、未知の機構で活性化していることを見出した。今後、STAT5 を直接活性化しているキナーゼを明らかにすることで、マスト細胞腫瘍の自律増殖機構の正確な理解につなげていきたい。

(3) c-Kit 変異体に依存しない腫瘍化メカニズム
樹立した腫瘍化した細胞株の中には、マ

スト細胞の腫瘍化に必須であると考えられてきた c-Kit の恒常的活性化変異を有さないものがあった。この細胞株は、Kit 変異を有する細胞株よりも腫瘍原性が高く、悪性度が高かった。この細胞株においても、Akt, STAT5 の恒常的活性化を見出しており、それらの活性化に Src キナーゼが必要であることを示唆するデータを得た (図 2)。今後、Src キナーゼを標的としたマスト細胞腫瘍の治療を提案しているようなデータを蓄積していきたい。

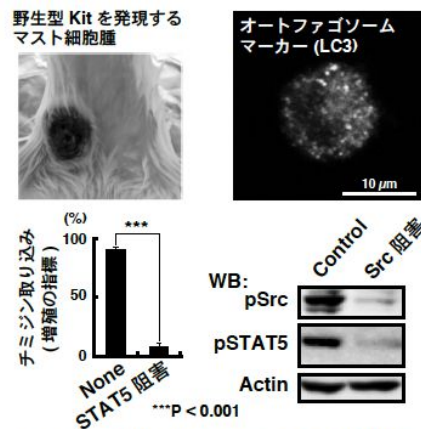


図 2. 野生型 Kit を発現するマスト細胞腫。 (左上) マウスにおいて、腫瘍原性を示す。 (右上) 本細胞のオートファゴソーム形成。 (下) 本細胞は、STAT5 に依存した自律増殖を示し、この STAT5 の活性化は、Src キナーゼが担っていることが示唆される。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

(1) Toyoshima, S., Obata, Y., Wakamatsu, E. and Abe, R.: Induction of unique mast-lineage cells through T cell activation: Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013 年 12 月 11 日 ~ 12 月 13 日, 幕張.

(2) 小幡裕希, 豊島翔太, 都田 宗, 岡本淳史, 大島知樹, 若松 英, 江角浩安, 安部 良: マスト細胞の腫瘍化における Kit チロシンキナーゼのシグナリング: 恒常的活性化型 Kit の細胞内動態とシグナル伝達機構 第 36 回日本分子生物学会, 2013 年 12 月 2 日 ~ 12 月 6 日, 神戸.

(3) 小幡裕希, 豊島翔太, 岡本淳史, 都田宗, 大島知樹, 若松 英, 江角浩安, **安部良**: マスト細胞の腫瘍化における Kit チロシンキナーゼのシグナリング: 恒常的活性化型 Kit の細胞内動態とシグナル伝達機構. 第 86 回 日本生化学会年会, 2013 年 9 月 11 日~9 月 13 日, 横浜.

(4) Toyoshima, S. and **Abe, R.**: T cell dependent induction of novel mast cell-lineage cells in spleen. AAI Annual Meeting 2013, 2013 年 5 月 3 日~5 月 7 日, Hawaii.

(5) Okamoto, A., Toyoshima, S., and **Abe, R.**: Tumorigenic transformation of mast cells in a c-kit mutant dependent and independent manner. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013 年 12 月 5 日~12 月 7 日, 神戸.

(6) Miyakoda, S., Toyoshima, S., and **Abe, R.**: A role of STAT5 pathway in malignant transformation of mast cell. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2012 年 12 月 5 日~12 月 7 日, 神戸.

(7) Toyoshima, S., Okamoto, A., and **Abe, R.**: T cell dependent induction of novel mast cell-lineage cells in spleen. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2012 年 12 月 5 日~12 月 7 日, 神戸.

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安部 良 Ryo Abe

東京理科大学 生命医科学研究所 教授

研究者番号: 20159453