The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Constitutively activated Rho GTPases regulate the growth and morphology of hairy cell leukemia (HCL) cells
Author(s)	張, 弦
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43951
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【70】

氏　　名	張（チョウ）　弦（ゲン）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１７６４０　号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Constitutively activated Rho GTPases regulate the growth and morphology of hairy cell leukemia (HCL) cells (Rho ファミリー分子によるヘアリーセル白血病細胞の増殖と形態制御についての解析)
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金倉　　譲 （副査） 教　授　北村　幸彦　　教　授　青笹　克之

論　文　内　容　の　要　旨

〔目的〕

Hairy Cell Leukemia（HCL）は白血病細胞表面に毛髪状の突起を有する比較的緩徐な経過をとる B リンパ球由来のリンパ増殖性疾患の一種である。HCL 細胞は、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ強陽性であることを特徴とし、表面免疫グロブリンや CD11c、CD22、CD25 などの表面抗原が陽性である。これらの表面形質から、HCL は成熟 B リンパ球の分化段階に位置すると考えられるが、CD5 陰性であり、慢性 B リンパ球性白血病（B-CLL）とは異なった疾患として扱われている。

欧米の HCL（typical HCL, tHCL）症例の多くは、汎血球減少症を示す。一方、本邦例では中等度の白血球増多症をきたすことが多く、CD25 陰性であり、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼも弱陽性と細胞の性質も幾分異なっている。このことから本邦例は、tHCL と区別して日本型 HCL（HCL Japanese type, HCL-J）と呼ばれている。HCL-J 細胞は位相差顕微鏡像では tHCL 細胞と同様に長い microvilli と ruffles を示す。

本研究では、他の細胞系において actin フィラメントの再構成を介して細胞骨格や形態を制御することが報告されている Rho ファミリー分子が、HCL 細胞の増殖や形態にどのような影響を及ぼすのか、また、その制御機構について解析を行った。

〔方法〕

1．HCL 細胞の調整

末梢中の白血球数が 30,000/μ 以上の HCL 症例より比重遠心法により単核球を分離した。いずれのサンプルも HCL 細胞が 95%以上を占めていることを確認し、実験に用いた。

2．形態観察

サイトスピン標本の May-Grunwald-Giemsa（M-G）染色を光学顕微鏡、phalloidin 染色による actin 線維の染色像を蛍光顕微鏡で観察した。

3．ウエスタンブロット法と GST pull-down アッセイ

HCL 細胞における RhoA、Rac1、Cdc42 蛋白の発現を total cellular lysate を用いたウエスタンブロットで解析した。活性型 RhoA を GST-RBD（RhoA-binding domain of Rhotekin）、活性型 Rac1、活性型 Cdc42 を GST-PBD（Rac1/Cdc42-binding domain of PAK）を用いた GST pull-down アッセイで検出した。

4．BNBH-I、Ba/F3 細胞への恒常的遺伝子導入

優勢阻害型（dominant negative, DN）及び恒常的活性型（constitutively active, CA）の RhoA、Rac1、Cdc42 をそれぞれ BNBH-I、Ba/F3 細胞に電気穿孔法を用いて恒常的に導入した。

〔成績〕

2 例の tHCL 細胞、3 例の HCL-J 細胞及び HCL 由来細胞株 BNBH-I は preB ALL、B-CLL 細胞とは異なり、M-G 染色で毛髪状の細胞突起を示し、phalloidin 染色で actin 突起、lamellipodia の構造を有していた。これらの HCL 細胞及び BNBH-I では、preB ALL、B-CLL 細胞と比較して RhoA、Rac1、Cdc42 がいずれも過剰発現されており、しかも恒常的に活性化されていた。

BNBH-I に DN-RhoA、DN-Rac1、DN-Cdc42 を過剰発現させると、BNBH-I の増殖はそれぞれ 70%、70%、50% 抑制された。この結果から、RhoA、Rac1、Cdc42 のいずれもが BNBH-I の増殖に関与すると考えられた。また、いずれの DN 分子も actin 突起の形成を抑制した。一方、lamellipodia の形成は DN-Rac1 によってのみ抑制された。次に、proB 細胞株 Ba/F3 に CA-RhoA、CA-Rac1、CA-Cdc42 を発現させた。空ベクターを導入した Mock のクローンでは phalloidin 染色において actin 突起や lamellipodia は認められなかったが、いずれの CA 分子を発現させたクローンでも actin 突起の形成が認められた。しかし、どのクローンでも lamellipodia の形成は誘導されなかった。これらの結果から、RhoA、Rac1、Cdc42 のいずれもが actin 突起の形成に深く関わると考えられた。一方、lamellipodia の形成に Rac1 の活性化は必要であるが、十分ではないと考えられた。

BNBH-I を RhoA の下流の機能分子である Rock の阻害剤 Y-27632 で処理すると lamellipodia の形成は影響されなかったが、actin 突起の形成が阻害された。この結果から、RhoA による actin 突起の形成には Rock が関与すると考えられた。

また、BNBH-I を P13-K の阻害剤 Wortmannin で処理しても RhoA、Rac1、Cdc42 のいずれの分子の活性も影響されず、形態変化も認められなかった。一方、チロシンキナーゼの阻害剤 PP1 は RhoA、Cdc42 の活性に影響を及ぼさなかったが、Rac1 の活性を抑制し、アクチン突起、lamellipodia の形成を阻害した。これらの結果から、Rac1 の活性化及び 1amellipodia の形成にはその上流でチロシンキナーゼが関与すると考えられた。

〔総括〕

HCL 細胞においては、preB-ALL、B-CLL 細胞とは異なり、Rho ファミリー分子が過剰発現され、恒常的に活性化されていた。また、これらの Rho ファミリー分子は HCL 細胞の増殖や毛髪状突起形成などの形態制御に極めて重要な役割を担うと考えられた。

論文審査の結果の要旨

〔総評〕

従来、Hairy Cell Leukemia（HCL）の研究は、HCL 細胞が特異な細胞形態を示し、脾臓を主な増殖の場とすることから、細胞起源の解析や細胞接着分子などの表面形質の解析が中心に行われてきた。そのため、HCL 細胞の腫瘍性増殖や形態学的特徴がどのような細胞内シグナル伝達分子の活性化によってもたらされるのかという研究はほとんど皆無であった。本研究では、これらの点を明らかにするために、他の細胞系において形態形成や細胞増殖に深く関わることが報告されている Rho ファミリー分子が HCL 細胞の増殖や形態にどのような影響を及ぼすのか、また、その制御機構について解析した。

その結果、HCL 細胞では RhoA、Rac1、Cdc42 などが過剰発現され、恒常的に活性化されていることが明らかに

した。従来、HCL は細胞表面形質の違いから B-CLL とは区別されてきたが、本研究結果から、HCL は Rho ファミリー分子の発現及び活性化状態においても B-CLL とは質的に異なる疾患であることが明らかとなった。

また、本研究では、HCL 細胞の形態的特徴である細胞突起が RhoA、Rac1、Cdc42 によって制御されること、lamellipodia が Rac1 によって制御されることが明らかにし、HCL 細胞において特異的に認められる Rho ファミリー分子の活性化がその形態的特徴に寄与することを示した。

更に、HCL 由来細胞株 BNBH-I の増殖が優性阻害型の RhoA、Rac1、Cdc42 のいずれによっても阻害されたことから、これらの分子が実際の患者 HCL 細胞の増殖にも関与している可能性が示唆された。本研究により、Rho ファミリー分子の機能阻害に有用であったチロシンキナーゼ阻害剤や Rock の阻害剤などが、今後 HCL 治療に有用である可能性が考えられた。

本研究は、HCL 細胞の増殖及び毛髪状の突起や lamellipodia 形成の分子機構を明らかにしたという点で、高い学術的価値を有している。同時に、HCL 細胞に対するより有効な治療法を確立するにあたって極めて有用な知見を供するものであり、臨床的な意義においても学位に値する研究と考えられる。