

Title	Functional Cooperation among Ras, STAT5, and Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Required for Full Oncogenic Activities of BCR/ABL in K562 Cells
Author(s)	園山, 順子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/44664">http://hdl.handle.net/11094/44664</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	その園 山 順 子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18208 号
学位授与年月日	平成 15 年 12 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Functional Cooperation among Ras, STAT5, and Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Required for Full Oncogenic Activities of BCR/ABL in K562 Cells (BCR/ABL 癌遺伝子による白血病化における細胞内シグナル伝達分子の協調作用)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 謙  (副査) 教授 平野 俊夫 教授 北村 幸彦

### 論文内容の要旨

#### [目的]

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) は、骨髄増殖性疾患の一つに分類され、造血幹細胞レベルでの腫瘍化に起因するクローナルな疾患である。腫瘍化の原因として CML 患者の 90% 以上に染色体転座 t (9:22) が認められ、その結果、9 番染色体上の c-Abl チロシンキナーゼ遺伝子が 22 番染色体上の breakpoint cluster region (BCR) と結合し BCR/ABL 融合遺伝子を生じることが知られている。BCR/ABL は、従来より Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/Akt 経路、Signal transducers and activators of transcription (STAT) などの様々なシグナル伝達分子を恒常的に活性化することが報告されてきたが、BCR/ABL による白血病化におけるこれらの分子の役割については明らかではない。今回、p210 BCR/ABL 陽性細胞株 K562 を用い、これら細胞内シグナル伝達分子の個々の機能及び協調作用について解析を行った。

#### [方法ならびに成績]

ヒト CML 由来細胞株 K562 において、IPTG 添加により導入遺伝子の発現を誘導することが可能なシステム (Lac-inducible System) を用い、優性阻害型 (DN) 型の Ras (N17)、PI3-K ( $\Delta$ p85)、STAT5 (694F) のそれぞれを発現するクローンを作製した。

各 DN 分子の細胞増殖への影響を細胞数変化と細胞周期解析で検討した結果、N17、694F、 $\Delta$ p85 は IPTG 添加 5 日後で K562 の増殖をそれぞれ 90、55、40% 阻害し、いずれも増殖期 (S~G2/M 期) の細胞の割合を著明に減少させた。この際の細胞周期制御分子の発現変化を Northern blot 法で調べた結果、cyclin D2 と cyclin D3 の発現はいずれの DN 分子によっても抑制されたが、cyclin E、cyclin A の発現は N17、 $\Delta$ p85 によってそれぞれ特異的に阻害された。また、N17 を発現させた場合には、DNA 量解析で 12% の細胞がアポトーシスを示す subdiploid 領域に分布するようになった。

さらに、これらの分子の協調作用を検討するために、2 種類の DN 分子を同時に (N17+694F、N17+ $\Delta$ p85、or 694F+ $\Delta$ p85) 発現する細胞株を作製した。IPTG 添加 5 日後、これらの DN 分子によっていずれのクローンにおいても

細胞増殖はほぼ完全に抑制された。また、培養3日後には、半数以上の細胞が Annexin-V、TUNEL 染色陽性となり、Caspase-3 の活性化が認められた。この結果に一致して、培養5日後には、N17+694F、N17+ $\Delta$ p85、694F+ $\Delta$ p85 を発現させた場合、それぞれ 65、68、59%の細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

次に、各分子がどのように抗アポトーシス作用を示すのか明らかにするために、個々の DN 分子を発現した細胞について抗アポトーシス分子である bcl-2 と bcl-XL の発現変化を Northern blot 法で検討した。その結果、bcl-2 の発現はいずれの DN 分子によっても抑制されたのに対し、bcl-XL は N17 でのみ抑制された。bcl-2 と bcl-XL の発現抑制には、N17 のみで十分であったが、694F もしくは  $\Delta$ p85 が N17 と協調して著明なアポトーシスを誘導したことから、これらの分子の抗アポトーシス作用には bcl-2、bcl-XL 以外の分子も深く関わると考えられた。

さらに、これら3種の DN 分子を単独で発現させた場合、抗白血病剤 IFN- $\alpha$  (3000 u/ml) や Dexamethasone (100  $\mu$ M) に対する感受性が変化するかどうかを検討した。Mock のクローンを IFN- $\alpha$  処理しても2%の細胞にしかアポトーシスが誘導されなかった。一方、N17、694F、 $\Delta$ p85 を発現させた場合、IFN- $\alpha$  によってそれぞれ 76%、45%、53%の細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。同様に、Dexamethasone に対する感受性も、Mock のクローンでは5%しか認められなかったが、N17、694F、 $\Delta$ p85 を発現させた場合には 78%、64%、69%の細胞が感受性を示した。これらの結果から、K562 細胞が抗白血病剤に対して抵抗性を示すには、3つのシグナル伝達分子がすべて活性化されることが必要であると考えられた。

#### [総括]

BCR/ABL によって活性化された Ras、STAT5、PI3-K は、それぞれ、一部は重複するが、一部は独自の標的分子の発現を制御し、BCR/ABL 依存性の細胞増殖と生存に関与することが明らかとなった。また、これらの分子を単独で抑制した場合と比較して、いずれの組み合わせでも2分子を同時に抑制すると、著明なアポトーシスが誘導されたことから、これらの分子は協調的に作用し、BCR/ABL 依存性の細胞生存に寄与することが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) では染色体相互転座により生じる BCR/ABL キメラ蛋白が発症の原因と考えられている。近年、ABL チロシンキナーゼに特異的な阻害剤を用いた治療法が注目されているが、BCR/ABL 遺伝子の付加的な変異による薬剤耐性の問題も報告されている。本論文は、BCR/ABL により恒常的に活性化されるシグナル伝達分子 Ras、STAT5、PI3-E の白血病化における役割を明らかにするために、p210BCR/ABL 陽性細胞株 K562 を用い、個々の機能及び協調作用についての解析を行ったものである。

優性阻害 (dominant negative: DN) 型の Ras、STAT5、PI3-E を単独または2分子誘導発現できる細胞株を作製した。細胞増殖への影響を細胞数変化で検討した結果、DN 分子の単独発現は誘導5日後、DN Ras で 90%、DN STAT5 で 55%、DN PI3-K で 40%阻害し、2分子発現はいずれも細胞増殖をほぼ完全に抑制した。細胞生存への影響は、単独発現では DN Ras が約 10%アポトーシスを誘導したのに対し、2分子発現ではいずれも約 60%誘導したことより、これらの分子が協調的に作用し、BCR/ABL 依存性の細胞生存に寄与することが明らかとなった。また、DN 分子誘導時の遺伝子発現変化を調べた結果、Ras、STAT5、PI3-K は、それぞれ一部は重複するが、一部は独自の標的分子の発現を制御し、BCR/ABL 依存性の細胞増殖と生存に関与することが明らかとなった。抗癌剤 IFN- $\alpha$ 、Dexamethasone に耐性である K562 細胞が、DN 分子の単独発現時の処理によりいずれもアポトーシスを誘導したことから、3つのシグナル伝達分子がすべて活性化されることが薬剤耐性機序に重要であると示唆された。

現在、癌の分子機構の解明が進むと共に、Ras を含む分子を標的とした阻害剤が次々と開発されてきている。本論文は CML の分子標的療法に役立つ新たな知見をもたらしたことより学位に値するものとする。