



Mutation analysis of SHIP gene in hematological malignancies

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 羅, 建民 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1232

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 379号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏 名	羅 建 民		
論文題目	Mutation analysis of SHIP gene in hematological malignancies (造血器悪性腫瘍における SHIP の遺伝子変異解析)		

博士(医学) 羅 建 民

論文題目

Mutation analysis of SHIP gene in hematological malignancies

(造血器悪性腫瘍における SHIP の遺伝子変異解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

SHIP (SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase) は 145-kDa 蛋白質である。SHIP は当初には増殖因子およびサイトカイン刺激による tyrosine リン酸化蛋白質として報告され、その後主に造血細胞に存在することが明らかになり、細胞の増殖および生存における重要な負の調節因子であることが示されている。SHIP が過剰に存在する場合、骨髓細胞株では細胞増殖の抑制および apoptosis を誘導される。SHIP ノックアウトマウスは、増殖因子刺激に対して過剰反応を示して、骨髓は増殖し、臓器へ骨髓細胞浸潤を起こすため短命となる。SHIP (-/-) マウスの骨髓は、顆粒細胞およびマクロファージの慢性的な浸襲の結果過形成を示す。SHIP (-/-) マウスの骨髓細胞増殖は PIP3 の増加および wortmannin による AKI/PKB 活性化の両者に関係する。しかしながら、SHIP 遺伝子機能の欠如が腫瘍抑制か腫瘍形成のどちらに関与するのかは不明である。本研究では、ヒトの造血器悪性腫瘍における SHIP 遺伝子の役割を検討する。

[患者ならびに方法]

細胞株：白血病細胞株 (K562、HL60、U937、NKM-1、NOMO-1、NB4、KG1、NOP-1、Daudi、CEM/C1)。臨床検体：造血器悪性腫瘍患者 48 例の骨髓または末梢血単核球 (急性骨髓性白血病 (AML) 32 例、急性リンパ性白血病 (ALL) 9 例、慢性骨髓性白血病 (CML) 1 例、骨髓異形成症候群 (MDS) 4 例、多発性骨髄腫 (MM) 2 例)。健常人 50 名の末梢血単核球 (正常コントロール)。

RT-PCR-SSCP (Reverse transcription-polymerase chain reaction amplification and single strand conformation polymorphism)：細胞株および Ficoll 分離にて得られた単核球より TRIzol にて total RNA を抽出した。AMV-reverse transcriptase を用いて cDNA を作成した。PCR は Genebank にて SHIP (U57650) cDNA 全領域に対して約 250bp の DNA となるようにプライマー設計して増幅しアガロースゲルで確認した。次に 10% ポリアクリルアミドゲルにて 5% グリセロール添加、非添加および室温、4℃ の条件にて SSCP を行い、異常バンドの検出を行った。SSCP は 3 回繰り返して同様のバンドが検出されたものを陽性とした。

Sequence：ポリアクリルアミドゲルより異常バンドを切り出し DNA を抽出した後に、同じプライマーを用いて PCR で再増幅したものを pCR2.1 ベクターに導入して ABI310 シークエンサーにて遺伝子配列を検討した。

Western blot 分析：骨髓または末梢血単核球 (2×10^6) は様々な時間、37℃ で IL-3 (5ng/ml) で刺激した。刺激後、細胞洗浄、遠心分離した。20μl の細胞溶解液を添加し全細胞溶解物を 10% の SDS-PAGE ゲル上で分析し、蛋白質は PADF 膜に転写した。Akt 抗体およびリン酸化特異的 Akt 抗体 (Ser-473) を用いて immunoblot した。Immunocomplex はアルカリフォスファターゼ基質キットによって検出した。

〔結果〕

1. 白血病細胞株：10細胞株中2細胞株(20%：Daudi、NOP-1)に SHIP 遺伝子の missense mutation を検出した。Daudi には codon 618(IP5Pase 領域内)に point mutation が検出され、NOP-1には codon 312および codon 351に同じ point mutation が検出された。
2. 臨床検体：我々は、AML 32例中7例(22%)のおよび ALL 9例中1例(11%)の ALL に SHIP 遺伝子の missense および nonsense mutation を検出した。このうちで67%(8/12)の mutation は重要な機能 domain に集中してる。このうち ALL 患者1人には codon 28(SH2領域の FLVRES motif)に point mutation が存在した。また ALL 患者1人には他の point mutation があり、codon 1076で止まることによる C-terminal にある3つの PxxP motifs の欠失が認められた。また別の AML 患者1人では IP5Pase 領域および PxxP motif に2つの missense mutation が存在した。しかし、この2つの missense mutation は CR 後に消失した。この患者の細胞に IL3刺激を加えると Akt リン酸化は遷延しかつ増加した。したがって、この患者の場合、これらの変化が病因に重要な役割を果たすことが考えられた。これらの結果から SHIP が PI3K/Akt signaling pathway の負の調節に重要な役割を果たすと考えられた。
3. Polymorphism 分析：Polymorphism は50名の健常人において SHIP の全領域に沿って解析した。codon 25、26、117、346、583および1008の polymorphism は以前に報告されており、今回もこれらの polymorphism は細胞株および患者サンプルの中で検出された。ほかには健常人のサンプルに codon 529の新たな polymorphism を検出した。

〔考察および結論〕

我々は、白血病細胞中の SHIP 遺伝子に高頻度の mutation の存在を明らかにした。これはヒトの悪性腫瘍の中でこの遺伝子の変異に関する初めての報告である。今回の結果から、SHIP 遺伝子が造血細胞の PI3K/PKB/Akt signaling pathway を負に調節することにより、tumor suppressor としての役割を果たす可能性があると考えられ、この遺伝子の変化が白血病の発生原因の一つとなりうることを示唆された。

論文審査の結果の要旨

SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) は血球系の細胞において主に発現し、内在する5'-フォスファターゼ活性により、増殖・分化のシグナルを負に調節する。多くの細胞において増殖と生存に関与する AKI/PKB (Ser/Thr キナーゼ) は、増殖因子の刺激に対し phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の下流で活性化されるが、SHIP は B 細胞においてこの AKI/PKB 活性化を阻害することが報告されている。また、SHIP ノックアウトマウスの骨髓細胞は増殖し、臓器に浸潤することが知られている。しかしながら、SHIP 遺伝子の機能異常が造血器悪性腫瘍にどのような影響を与えるかは不明である。申請者らは、10種の白血病細胞株、48例の造血器腫瘍 (AML 32例、ALL 9例、CML 1例、MDS 4例、MM 2例) の骨髓、または末梢血単核球、健常人50名の末梢血単核球を用い、RT-PCR-SSCP 法により遺伝子変異を検出し、その変異を DNA 塩基配列の決定により確認した。また、リン酸化 Akt に対する単クローン抗体を用いた Western blot 解析で Akt のリン酸化を測定した。得られた結果は以下の通りである。

- (1) SHIP 遺伝子変異：白血病細胞株10株中2株(Daudi、NOP-1)にミスセンス変異を、AML 32例中7例(22%)、ALL 9例中1例(11%)および CML の1例にミスセンス変異およびナンセンス変異を認めた。これらの変異は SHIP 全領域に渡って認められたが、このうち67%(8/12)は重要な機能ドメインに集

中していた。これらの変異が遺伝子多型ではないことを以下の実験により確認した。

(2) SHIP の多型分析：健常人のサンプルを用いて多型を検出したところ、以前に報告されたコドン25、26、117、346、583、1008以外に新たなコドン529に多型を検出した。

(3) SHIP 変異の Akt リン酸化に与える影響：白血病患者細胞で SHIP 変異を示すものと示さないものを用い、IL-3刺激を加えたところ、SHIP に変異を示すものは Akt のリン酸化が遅延し、かつ増加した。

以上の結果から、申請者らは SHIP 遺伝子が造血細胞の PI3K-Akt/PKB シグナル伝達系を負に調節することで、がん抑制の役割を果たす可能性があること、またこれにより SHIP 遺伝子の変異が白血病の発生原因の一つとなりうることを示唆した。

審査委員会では、白血病細胞の SHIP 遺伝子に高頻度の変異があることを初めて明らかにした点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

1. 使用した白血病株を選んだ理由は
2. 使用した末梢単核球における白血病細胞の割合は
3. SHIP の変異が ALL より AML で多い理由は
4. SSCP 解析の再現性は
5. SHIP 変異の Akt 脱リン酸化に与える影響は全ての白血病細胞で検討したか
6. SHIP のどの部位の変異が Akt の脱リン酸化に影響を与えたか
7. 正常白血球における Akt の脱リン酸化のパターンは検討したか
8. 完全寛解に入った白血病患者の白血球には SHIP 突然変異を認めなかったか
9. PTEN は SHIP の機能不全を代償しないのか
10. SHIP の intervening domain の機能について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 小 出 幸 夫

副査 相 村 春 彦 副査 本 郷 輝 明