



Down-regulation of Thanatos-associated protein 11 by BCR-ABL promotes CML cell proliferation through c-Myc expression

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-05-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横田, 大輔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2658

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 627号	学位授与年月日	平成24年 3月19日
氏名	横田 大輔		
論文題目	Down-regulation of Thanatos-associated protein 11 by BCR-ABL promotes CML cell proliferation through c-Myc expression (BCR-ABLによる Thanatos-associated protein 11 の発現低下は c-Myc の発現を介して慢性骨髄性白血病細胞の増殖を促進する)		

博士(医学) 横田大輔

論文題目

Down-regulation of Thanatos-associated protein 11 by BCR-ABL promotes CML cell proliferation through c-Myc expression

(BCR-ABL による Thanatos-associated protein 11 の発現低下は c-Myc の発現を介して慢性骨髄性白血病細胞の増殖を促進する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

慢性骨髄性白血病(CML)において、BCR-ABL キメラタンパク質が、様々な細胞増殖シグナル経路を活性化する。その中でも、癌遺伝子 c-Myc の過剰発現が CML 細胞増殖に重要な役割を担っていると考えられているが、c-Myc の発現制御機構については不明な点が多い。そこで、我々は CML 細胞の細胞増殖における c-Myc 発現制御機構について検討した。

[材料ならびに方法]

CML 細胞株(K562、Meg01、SHG3 修正前)、急性骨髄性白血病(AML)細胞株(U937、YRK2、HL60)、CML 患者由来白血病前駆細胞(12 症例)と健常人由来造血前駆細胞(6 症例)を用いた。CML 細胞株において、チロシンキナーゼ阻害剤(STI571、AMN107、BMS354825)処理と BCR-ABL タンパク質発現抑制による Thanatos-associated protein 11(THAP11)遺伝子とタンパク質発現量の変化を半定量的 RT-PCR 法とウェスタンブロット法により評価した。AML 細胞株において、BCR-ABL 過剰発現による THAP11 遺伝子とタンパク質発現量の変化を同様に評価した。次に、CML 細胞株における THAP11 過剰発現による細胞増殖への影響を、トリパンブルーを用いた細胞増殖測定法とフローサイトメトリーによるヨウ化プロピジウムを用いた DNA 含量測定法にて評価し、同時に c-Myc 遺伝子の発現量を測定した。また、THAP11 を発現抑制した CML 細胞株において、チロシンキナーゼ阻害剤処理による THAP11 と c-Myc の遺伝子及びタンパク質発現量変化を、半定量的 RT-PCR 法とウェスタンブロット法により評価した。さらに、CML 由来造血前駆細胞を、アルデヒド脱水素酵素高発現(ALDH^{hi})かつ CD34 陽性分画(ALDH^{hi}/CD34⁺)としてフローサイトメトリーにて分離、採集した。CML 由来 ALDH^{hi}/CD34⁺細胞を用い、チロシンキナーゼ阻害剤処理と BCR-ABL 発現抑制による細胞増殖への影響をメチルセルロース培地内でのコロニー数で比較し、同時に THAP11 と c-Myc 遺伝子発現量を半定量的 RT-PCR 法にて評価した。また、THAP11 と c-Myc 過剰発現がコロニー形成に及ぼす影響を評価した。さらに、THAP11 過剰発現が c-Myc の標的遺伝子発現に与える影響をウェスタンブロット法にて評価した。最後に、c-Myc 発現制御に関する JAK2 や STAT5 が、THAP11 を介して、c-Myc 発現制御に関与しているかどうかを調べるため、THAP11 を発現抑制した CML 由来 ALDH^{hi}/CD34⁺細胞において、JAK2 阻害剤と STAT5 阻害剤を用いて、c-Myc 発現の評価をした。

[結果]

CML 細胞株において、チロシンキナーゼ阻害剤処理と BCR-ABL タンパク質発現抑制により THAP11 遺伝子とタンパク質発現の増加が認められ、AML 細胞株においては、BCR-ABL 過剰発現により THAP11 遺伝子とタンパク質発現は減弱した。CML 細胞株における THAP11 過剰発現は、細胞増殖を抑制し、c-Myc の遺伝子発現を抑制した。また、THAP11 を発現抑制した CML 細胞株においては、チロシンキナーゼ阻害剤処理による細胞増殖抑制効果は減弱し、c-Myc の発現抑制も阻害された。さらに、CML 由来 ALDH^{hi}/CD34⁺細胞においても、チロシンキナーゼ阻害剤処理や BCR-ABL 発現抑制により、THAP11 発現誘導が認められ、コロニー数の著しい減少を認め、THAP11 遺伝子発現は増加し、c-Myc 遺伝子発現は減弱した。また、THAP11 過剰発現により、コロニー数は減少したが、c-Myc 過剰発現により、CML 由来 ALDH^{hi}/CD34⁺細胞のコロニー形成能は回復した。一方、THAP11 を発現抑制した CML 由来 ALDH^{hi}/CD34⁺細胞では、チロシンキナーゼ阻害剤によるコロニー数の減弱効果は弱められていた。さらに、THAP11 過剰発現は c-Myc タンパク質の発現だけでなく、c-Myc の標的遺伝子(Cyclin D1 とオルニチン脱炭酸酵素(ODC))の発現を減弱させた。最後に、THAP11 を発現抑制した CML 由来 ALDH^{hi}/CD34⁺細胞において、JAK2 阻害剤と STAT5 阻害剤処理は、c-Myc 発現を抑制できなかった。

[考察]

CML 細胞において、THAP11 は BCR-ABL により発現抑制されており、その結果として、c-Myc の発現が誘導されていることが示された。また、THAP11 は、JAK2 や STAT5 による発現制御を受けておらず、JAK2 阻害剤や STAT5 阻害剤の c-Myc 発現抑制には THAP11 の存在が必要であることが示唆された。

[結論]

CML において、BCR-ABL による c-Myc 発現亢進は THAP11 の発現抑制を介して細胞増殖を促進させることが示され、THAP11 の発現誘導が CML における治療標的の一つになる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

[申請者が取り組んだ研究の背景] 慢性骨髄性白血病(CML)において、BCR-ABL キメラ蛋白質が、Myc をはじめとして様々な細胞増殖シグナル経路を活性化する中心的分子であり、治療の分子標的にもなっている。c-Myc の発現制御機構を検討中、THAP11 という遺伝子の変化および機能が浮かび上がってきた。

[実験方法・結果] CML 細胞 3 株、急性骨髄性白血病(AML)細胞 3 株、CML 患者由来白血病前駆細胞(12 症例)と健常人由来造血前駆細胞(6 症例)を用いた。CML 細胞株において、チロシンキナーゼ阻害剤(STI571、AMN107、BMS354825)処理と BCR-ABL 蛋白質発現抑制による THAP11 遺伝子と蛋白質発現量の変化を半定量的 RT-PCR 法とウェスタンブロット法

により評価し、さらに、CML 由来造血前駆細胞を、アルデヒド脱水素酵素高発現(ALDH^{hi})かつ CD34 陽性分画(ALDH^{hi}/CD34⁺)としてフローサイトメトリーにて分離、採集し、その細胞を用い、チロシンキナーゼ阻害剤処理と BCR-ABL 発現抑制による細胞増殖への影響をメチルセルロース培地内でのコロニー数で比較し、同時に THAP11 と c-Myc 遺伝子発現量を半定量的 RT-PCR 法にて評価した。

考察・結論] CML 細胞において、THAP11 は BCR-ABL により発現抑制されており、その結果として、c-Myc の発現が誘導されているということが示された。また、THAP11 発現は、JAK2 や STAT5 による発現制御を受けておらず、JAK2 阻害剤や STAT5 阻害剤の c-Myc 発現抑制には THAP11 の存在が必要であることが示唆された。

以上により、本論文は THAP11 の白血病の病態における意義を詳細に検討し、治療標的としての可能性を示した点で、博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶村 春彦
副査 難波 宏樹 副査 小杉 伊三夫