



## Small GTPase RAB45-mediated p38 activation in apoptosis of chronic myeloid leukemia progenitor cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-09-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹村, 兼成 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/00003413">http://hdl.handle.net/10271/00003413</a>

博士(医学) 竹村 兼成

論文題目

Small GTPase RAB45-mediated p38 activation in apoptosis of chronic myeloid leukemia progenitor cells

(慢性骨髄性白血病前駆細胞のアポトーシスにおける Small GTPase RAB45 を介した p38 の活性化)

論文の内容の要旨

[はじめに]

慢性骨髄性白血病 (CML) は9番染色体と 22 番染色体の相互転座により生じるフィラデルフィア染色体に特徴づけられる。フィラデルフィア染色体から生じる BCR-ABL 融合蛋白質が、恒常的にチロシンキナーゼを活性化し、細胞増殖、分化、アポトーシス等様々なシグナル経路に異常をもたらす、CML の発症に重要な役割を果たしている。しかし、CML 細胞において、BCR-ABL 融合蛋白質の抗アポトーシス効果のシグナル経路はよくわかっていない。

RAB 蛋白質は非常に多くの種類の Ras-GTPase を構成し、細胞内や細胞膜蛋白質と相互作用している。そのうちいくつかの RAB 蛋白質 (RAB1、RAB3、RAB5、RAB25、RAB45) は発がんに関与していることが報告されている。

我々は CML 細胞において RAB45 蛋白質の発現が抑制されており、ABL キナーゼ阻害が RAB45 の発現を誘導することを見出した。本研究では、CML 細胞における RAB45 の発現誘導がアポトーシスにどのように関連しているかを検討した。

[材料ならびに方法]

ABL キナーゼ阻害剤として STI571、AMN107、BMS354825 を用い、ヒト CML 細胞株 K562、Meg01、SHG3 細胞、そして健常人 (n=6) と CML 患者 (n=12) の骨髄から採取した単核球中の Aldehyde Dehydrogenase 高活性かつ CD34 陽性細胞 (ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>) を用いた。RT-PCR 法と定量的 PCR 法にて RAB45 と *Bcr-Abl* 遺伝子発現を、western blot 法にて RAB45、BCR-ABL、Survivin、XIAP、cIAP1、cIAP2、p38、Caspase-3、BCL-2、Caspase-9、PARP、BCL-xL 蛋白質発現を検討した。RAB45 蛋白質の機能解析のため、RAB45 cDNA、*Bcr-Abl* cDNA、RAB45 shRNA、*Bcr-Abl* shRNA を CML 細胞に遺伝子導入した。細胞増殖活性は細胞数をカウントし、生細胞率はトリパンブルー染色にて評価した。CML 細胞のアポトーシス評価は DiOC6 を用いたミトコンドリアの膜電位の変化とプロピジウムヨードを用いた DNA 含量の変化をフローサイトメトリーにて行った。また、臨床検体から得られた ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞を用いて、細胞増殖活性をコロニー形成能、アポトーシスの評価をアネキシン V 染色、カスパーゼ 3 活性測定にて行った。

[結果]

CML 細胞株において、ABL キナーゼ阻害剤や BCR-ABL キメラ遺伝子のノックダウンにより、RAB45 遺伝子・蛋白質の発現誘導が認められた。更に、RAB45 の過剰発現により CML 細胞の増殖が抑制され、生細胞率も減少し、アポトーシス分画の増加が認められた。RAB45 過剰発現によ

るアポトーシスは、ミトコンドリア膜電位の低下と Caspases 3 及び 9 の活性化と Survivin、 XIAP、 c-IAP1、 c-IAP2 の発現低下によることが明らかとなった。一方、RAB45 をノックダウンすることにより ABL キナーゼ阻害剤による CML 細胞増殖抑制効果は減弱した。CML 患者由来 BCR-ABL 陽性 ALDH<sup>hi</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞においても RAB45 発現は健常人由来の細胞と比較して低下しており、ABL キナーゼ阻害剤や BCR-ABL キメラ遺伝子のノックダウンにより、RAB45 遺伝子・蛋白質発現が誘導された。また、RAB45 の過剰発現は CML 前駆細胞のコロニー形成能を抑制し、ミトコンドリア膜電位の低下と Caspases 3 の活性化と p38 のリン酸化のレベルを増加させることが明らかとなった。一方、RAB45 をノックダウンすることにより、ABL キナーゼ阻害剤による CML 前駆細胞における p38 のリン酸化の減弱が認められた。

#### [考察]

我々は CML 細胞の細胞増殖抑制における RAB45 遺伝子の働きについて調べた。RAB45 蛋白質はミトコンドリアの膜電位の低下、IAP 発現抑制、p38 のリン酸化を誘導し、BCR-ABL 陽性細胞でのアポトーシスに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。p38 の阻害は BCR-ABL による白血化に重要な役割を果たしていることは報告されているが、我々は、BCR-ABL 陽性細胞において、ABL キナーゼ阻害剤によるアポトーシス誘導に、RAB45 を介した p38 の活性化が必要であることを初めて明らかにし、BCR-ABL 陽性細胞で p38 の活性化が治療に応用できる可能性が示された。

#### [結語]

本研究結果から、CML 細胞に特異的に RAB45 の発現誘導を行うことで、CML 細胞増殖を抑制する治療薬の開発に応用できると考えられる。