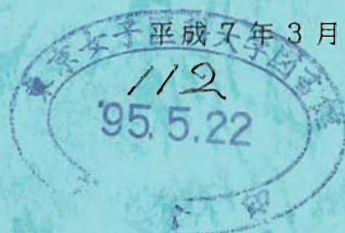


ヒト巨核球の成熟機構の分子生物学的解析

研究課題番号 05670934

平成6年度科学研究費補助金 (一般研究C)

研究結果報告書



研究代表者 寺村正尚

(東京女子医科大学医学部講師)

平6  
1C  
Ter

ヒト巨核球の成熟機構の分子生物学的解析

研究課題番号 05670934

平成6年度科学研究費補助金 (一般研究C)

研究結果報告書

平成7年3月

研究代表者 寺村正尚

(東京女子医科大学医学部講師)

研究組織 研究代表者 寺村正尚（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者 小林祥子（東京女子医科大学医学部助手）

研究経費 平成5年度 1,700千円

平成6年度 500千円

計 2,200千円

## 研究発表

### I. 学会誌等

1. Kobayashi S, Teramura M, Sugawara I, Oshimi K, Mizoguchi H:  
Interleukin 11 acts as an autocrine growth factor for human megaka-  
ryoblastic cell line. Blood 81:889-893, 1993

2. 寺村正尚、斉藤博、小林祥子、星野茂、押味和夫、溝口秀昭：再生不良  
性貧血の免疫抑制療法とそのメカニズム．臨床血液 34:273-276, 1993

3. Kaneko T, Fusauchi Y, Kakui Y, Masuda M, Akahoshi M, Teramura M, Motoji T, Okumura K, Mizoguchi H, Oshimi K: A bispecific antibody enhances cytokine-induced killer-mediated cytotoxicity of autologous acute myeloid leukemia cells. *Blood* 81:1333-1341, 1993
4. Kobayashi S, Teramura M, Hoshino S, Motoji T, Oshimi K, Mizoguchi H : Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3. *Br J Haematol* 83:539-544, 1993
5. Kaneko T, Fukuda J, Teramura M, Fusauchi Y, Kakui Y, Okumura K, Mizoguchi H, Oshimi K: Combination of interleukin-2-stimulated lymphocytes and bispecific antibodies that efficiently lyse leukemic cells does not affect bone marrow CD34-positive stem cell function in vitro. *Bone Marrow Transplantation* 14:213-217, 1994
6. Kobayashi S, Teramura M, Oshimi K, Mizoguchi H: Interleukin-11. *Leukemia and Lymphoma* 15:45-49, 1994

## II. 口頭発表

1. 泉二登志子、増田道彦、赤星雅、山田修、星野茂、寺村正尚、斎藤博、森直樹、鮫島勇一、小林祥子、新井ゆかり、日台裕子、大沢まゆみ、押味和夫、溝口秀昭：ハイドロオキシウレアおよびブスルファン投与時の慢性骨髄性白血病患者の急性転化について。第55回日本血液学会総会。1993

2. 金子多香子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭：CD34陽性細胞に対する lymphokine-activated killer(LAK)細胞と bispecific抗体(BsAb)の作用．第55回日本血液学会総会．1993
  
3. 小林祥子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭：Interleukin-11(IL-11) antisense oligonucleotidesによるK562の巨核芽球への分化の抑制．第35回日本臨床血液学会総会．1993
  
4. 寺村正尚、増田道彦、泉二登志子、押味和夫、溝口秀昭：抗リンパ球グロブリンが奏功したと考えられる周期性血小板減少症の一例．日本臨床血液学会第118回例会．1993
  
5. 寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭、三浦恭定、野村武夫、外山圭助、鶴岡延喜、小峰光博、浦部晶夫：抗リンパ球グロブリン投与による再生不良性貧血患者の血中サイトカインの変動．第35回日本臨床血液学会総会．1993
  
6. 青山雅、金子多香子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭、高橋正知：急性型顆粒リンパ球増多症における顆粒リンパ球の超微細構造：ビメンチンフィラメントの束状構造と臨床経過との相関．第35回日本臨床血液学会総会．1993
  
7. 小林祥子、寺村正尚、押味和夫、溝口秀昭：巨核芽球性白血病細胞株におけるEvi-1の発現．第56回日本血液学会総会．1994

8. 寺村正尚、吉永健太郎、小林祥子、押味和夫、溝口秀昭：巨核芽球性白血病細胞株、CMKに対するTPAの作用機序の検討．第56回日本血液学会総会．1994

9. Teramura M, Oshimi K, Mizoguchi H: Mechanism of action of anti-lymphocyte globulin for the treatment of aplastic anemia. International Society for Experimental Hematology, 23rd Annual Meeting. 1994

10. 寺村正尚、吉永健太郎、岩部弘治、溝口秀昭：c-Mplリガンドのヒト巨核球産生に対する作用．第57回日本血液学会総会．1995(発表予定)

11. 吉永健太郎、岩部弘治、寺村正尚、溝口秀昭、八木澤雅子、湯尾明、高久史磨：c-Mplリガンドの巨核球系細胞への作用とそのチロシンリン酸化によるシグナル伝達についての検討．第57回日本血液学会総会．1995(発表予定)

12. 岩部弘治、吉永健太郎、寺村正尚、溝口秀昭：K252aによる巨核芽球性白血病細胞株Meg-Jのploidy増加作用．第57回日本血液学会総会．1995(発表予定)

# 研究成果

以下のとおり

## 研究目的

巨核球-血小板産生には2種類の液性因子が必要であると考えられている。第一の因子はそれを骨髄細胞に加えて培養すると巨核球コロニーを形成する因子で、巨核球コロニー刺激因子(megakaryocyte colony stimulating factor:Meg-CSF)とよばれている。一方、第2の因子はそれだけでは巨核球コロニーを形成する活性はないが、Meg-CSFとともに骨髄細胞に加えると巨核球コロニー数、コロニーサイズ、巨核球のサイズ、ploidyなどを増加させる因子で巨核球増幅因子(megakaryocyte potentiator:Meg-POT)とよばれている。前者は巨核球系前駆細胞の増殖を刺激する因子であり、後者は主としてその成熟を刺激する因子である。しかし、それらの性状は明らかにされていなかった。

我々は、ヒト巨核球コロニーの無血清培養を開発し、これらの因子と種々のサイトカインとの関係を検討してきた。その結果、インターロイキン-3(IL-3)と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)はMeg-CSF活性をもち、エリスロポエチン、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-11(IL-11)、stem cell factor(SCF)はMeg-POT活性をもつことを明らか

にした。

このように巨核球産生に関与する液性因子については明らかになってきたが、これらの液性因子の細胞内シグナル伝達機構や遺伝子制御機構については、まったく解明されていない。本研究では、巨核球の産生過程で、もっとも特異的な現象であるendomitosis(ploidyの増加)に注目し、その遺伝子レベルでの制御機構を明らかにすることを目的とした。

#### (1) 巨核球産生に関与するプロトオンコジン、転写因子の検討

##### 【方法】

巨核芽球性白血病細胞株であるCMK、Meg-J、MEG-01、赤白血病細胞株のK562、HEL、骨髓性白血病細胞株のHL-60、KG-1、U937を用いて検討した。各細胞株にTPA $10^{-8}$ Mを添加し2.5%FCSを含むRPMI1640培地にて48時間液体培養した。またCMKについてはIL-3(500U/mL)、IL-6(100ng/mL)、IL-11(1 $\mu$ g/mL)をそれぞれ添加し、48時間培養した。培養前後の細胞からtotal RNAを抽出し、それぞれ10 $\mu$ gのRNAでreverse transcriptionを行い、cDNAを合成した。その後、Evi-1、myb、 $\beta$ 2-microglobulinのプライマーを用いて同一条件(94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30cycle)でPCR (polymerase chain reaction)を行った。

また、Evi-1およびmybのAntisense、Sense oligonucleotidesをそれぞれ作成しCMKあるいはK562に添加し、2%FCS添加RPMI1640培地に植え込み、48時間液体培養を行った。培養終了4時間前に、1 $\mu$ Ciの $^3$ H-チミジンを添加し、



その取り込み量を $\beta$ カウンターを用いて測定した。

## 【結果】

巨核芽球性白血病細胞株においては、CMK、Meg-JにEvi-1 mRNAの発現が認められた。MEG-01ではEvi-1の発現は認められなかった。その他の白血病細胞株である、K562、HEL、HL-60、U937では、いずれもEvi-1の発現は認めなかった(図1)。

Evi-1の発現を認めたCMK、Meg-JにTPA $10^{-8}$ Mを添加し培養しても、Evi-1 mRNAの発現の変化は認められなかった。また、MEG-01、K562、HELにTPAを添加しても、Evi-1mRNAの発現は認められなかった。さらに、CMKにおいてはIL-3、IL-6、IL-11を添加培養しても、Evi-1mRNAの発現の変化は認めなかった(図1)。

Evi-1の巨核球系細胞の増殖、分化に対する影響の有無を検討するためにCMKにEvi-1のAntisense、またはSense oligonucleotideを添加培養したが、 $^3$ H-チミジンの取り込み量(図2) およびCD41の発現の有意な変化は認められなかった。

CMK、K562においてはmybの発現が認められた(図3)。両細胞株にmybのAntisense、またはSense oligonucleotideを添加培養し、 $^3$ H-チミジンの取り込みを測定すると、K562では $^3$ H-チミジンの取り込みの抑制がみられたが(図4)、CMKでは抑制は認められなかった(図5)。

## 【考察】

転写因子の一つであるEvi-1はヒトでは染色体上、3q26に位置する転写因子である。以前より3q26の染色体異常を伴う白血病では巨核球、血小板産生の異常を伴うことが知られており、我々はEvi-1が巨核球産生において重

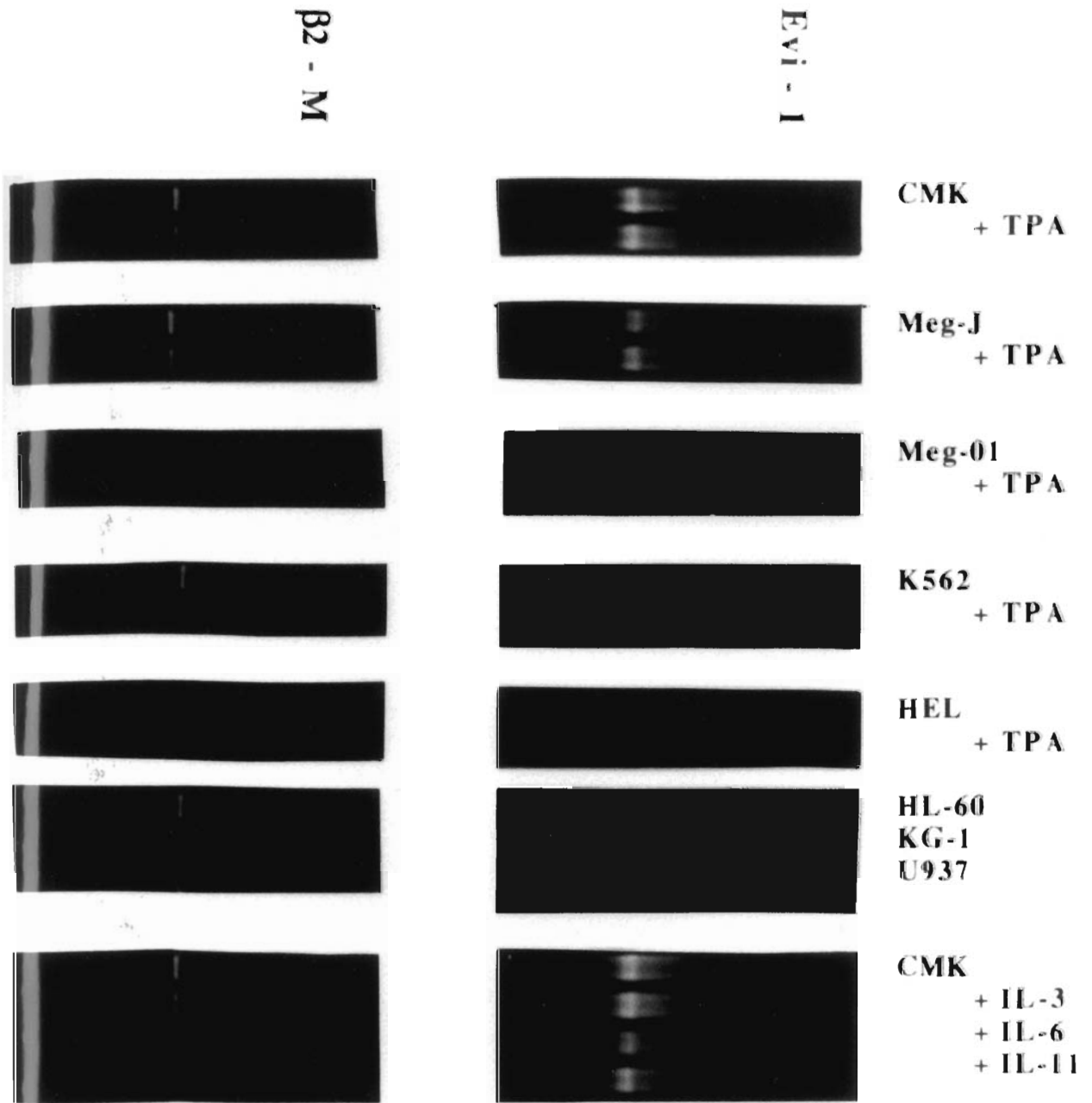


図1 巨核芽球性白血病細胞株における Evi-1の発現

要な転写因子ではないかと考え、今回の検討を行った。巨核球系の3細胞株のうちCMK、Meg-Jの2つの細胞株においてEvi-1の発現を認めたが、IL-3、IL-6、IL-11などの巨核球系細胞の増殖および成熟刺激因子を添加しても、その発現に変化は認めなかった。またCMK、Meg-JにTPAを添加して巨核球系への分化を促進させても、Evi-1の発現の変化はみられなかった。さらに、HELやK562のようにTPA添加により巨核球系に分化する細胞においても、TPA添加後にEvi-1の発現は認めなかった。以上の検討結果より、Evi-1の巨核球の増殖、分化過程における関与の可能性は低いと考えられる。

正常ヒト巨核球においては、ヒト骨髄の単核細胞にmybのAntisense oligonucleotideを添加すると、巨核球コロニー形成および成熟(ploidyの増加)が抑制されるという報告がある。しかし、今回の検討では巨核芽球性白血病細胞株、CMKにおいてmybは発現していたが、mybのAntisense oligonucleotideにより増殖が抑制されなかった。以上より、正常および異常な巨核球造血においては、その増殖機構が異なっている可能性が示唆された。

本研究の期間中、正常のヒト巨核球を純化して、種々のプロトオンコジン(myb, myc, ras)や転写因子の発現について検討を試みたが、得られる細胞数が少なく、検討は困難であった。また、巨核球のploidyの増加過程に伴うプロトオンコジンや転写因子の発現の検討も細胞数の関係で、十分な検討はできなかった。しかし、最近になって、CD34陽性細胞にc-Mplリガンドを添加培養することにより、解析可能な量のヒト巨核球を得ることが可能となった。また、Meg-J細胞にK252aを添加することにより、ploidyが著明に増加するアッセイ系を確立することに成功した。次項に、その研究結果を述べることとする。これらの実験系を用いて、巨核球造血に関与するプロトオンコジン、転写因子について、さらに明らかにしたいと考えている。

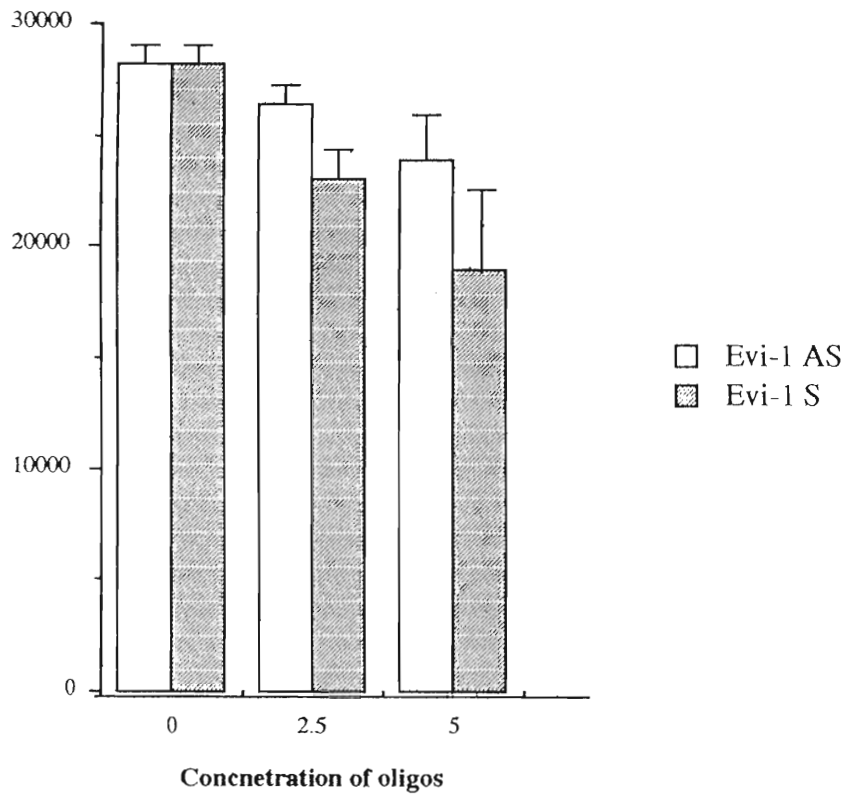


図2 Evi-1のantisenseおよびsense oligonucleotideのCMKの増殖に対する影響

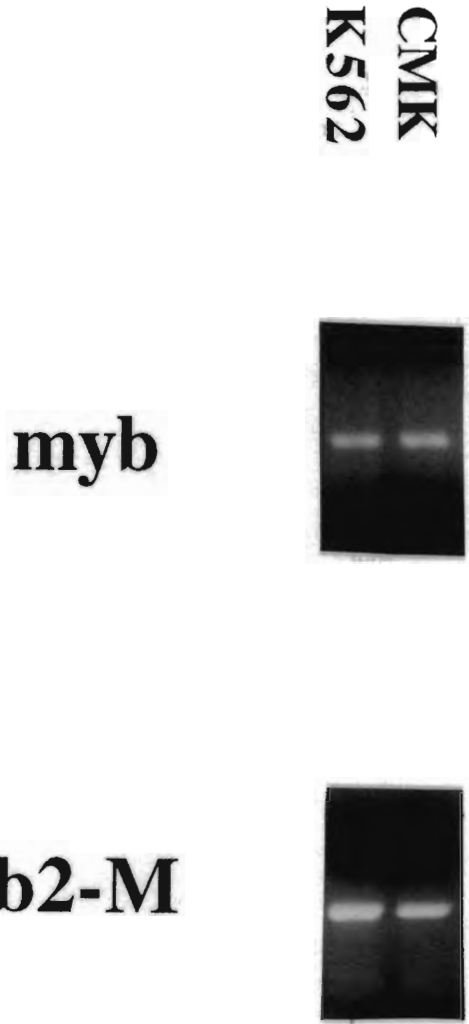


図3 CMK, K562におけるmybの発現

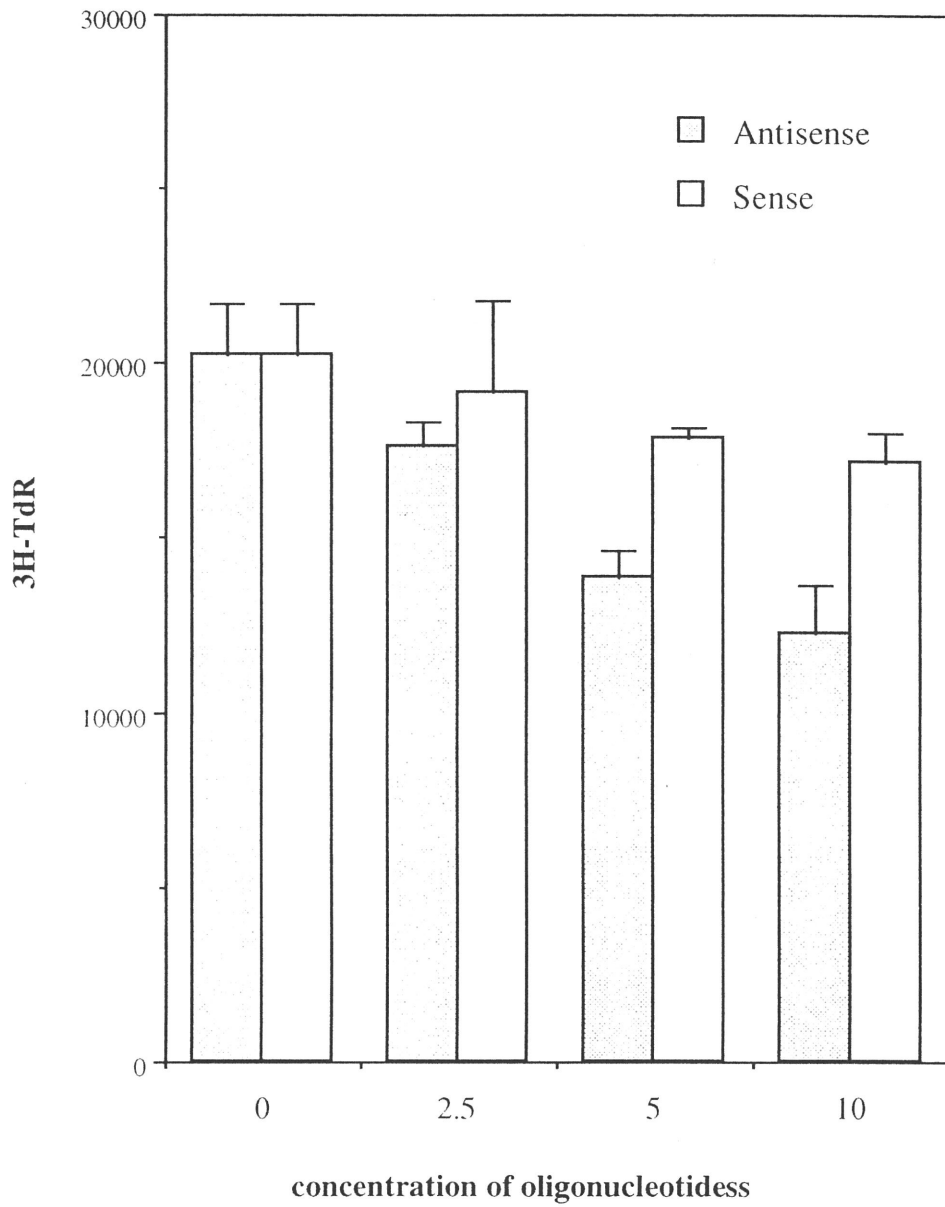


図4 mybのantisenseおよび sense oligonucleotideの K562の増殖に対する影響

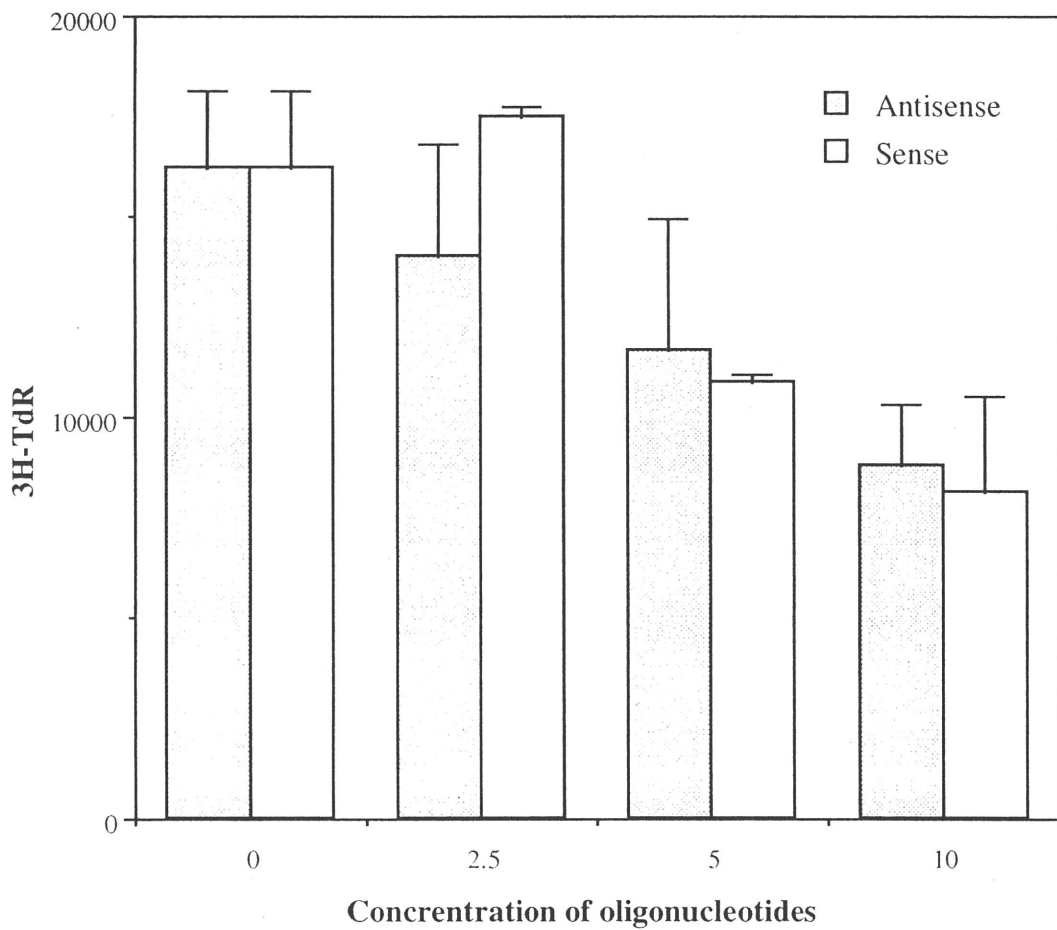


図5 mybの antisenseおよび sense oligonucleotideの CMKの増殖に対する影響

## (2) 巨核球系細胞の多倍体化の実験モデルの確立

我々は巨核球系細胞の多倍体化のモデルを確立するために、種々の巨核芽球性白血病細胞株を用いて検討を行ってきた。その結果、Meg-J細胞にヒドロキシウレアを添加し、G<sub>1</sub>期に同調させたのち、プロテインキナーゼCインヒビターの一つであるK-252aを添加して培養することにより、多倍体化する系を確立した。

### 【方法】

Meg-J細胞にヒドロキシウレア2mMを添加し15時間培養後、0.3 $\mu$ MのK252aを添加し5日間液体培養した。培養後、Propidium iodide(PI)染色し、ploidyの変化についてフローサイトメトリーを用いて検討した。また抗CD41、CD42抗体を用いて、K252a添加後のCD41、CD42の発現の変化についてフローサイトメトリーを用いて検討した。

### 【結果】

Meg-Jは4Cのploidyを有する細胞であり、16C以上の細胞はほとんど認めない。しかし、Meg-Jにヒドロキシウレアを添加し同調させたのち、K252aを添加して5日間液体培養すると、16C、32cのploidyを有する細胞が出現し、著明な多倍体化を示した(図6)。また、K252a添加により細胞のサイズの増大および、CD42の発現の明らかな発現の増強が認められた(図7)。



## 【考察】

K-252aを添加することにより巨核球系細胞の多倍体化のモデルを確立した。多倍体化に伴い血小板糖蛋白の発現の増強もみられることから、本モデルは正常の巨核球産生の過程にかなり類似している可能性が高いと思われる。今後、この系を用いて巨核球の多倍体化のメカニズムを検討する予定である。

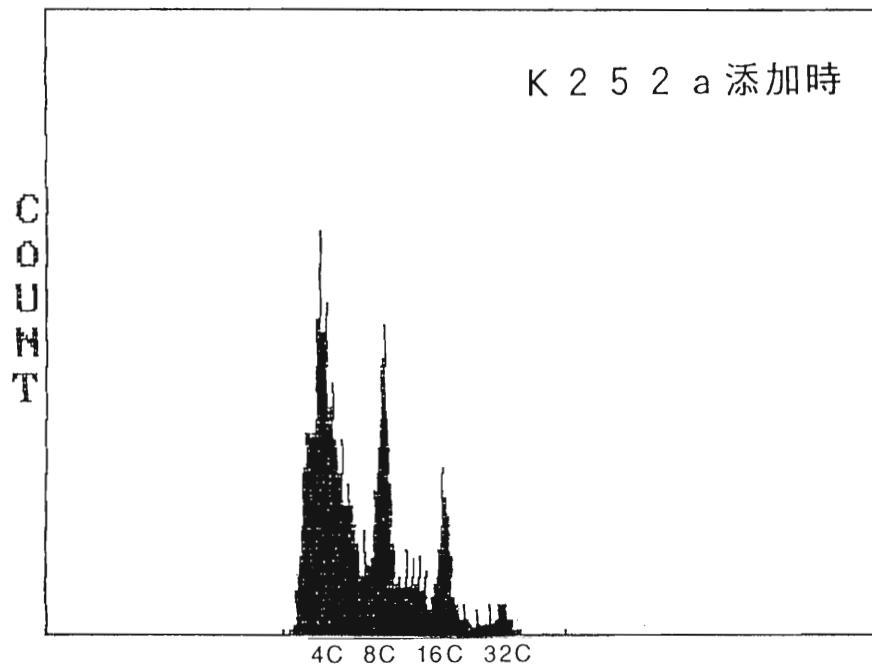
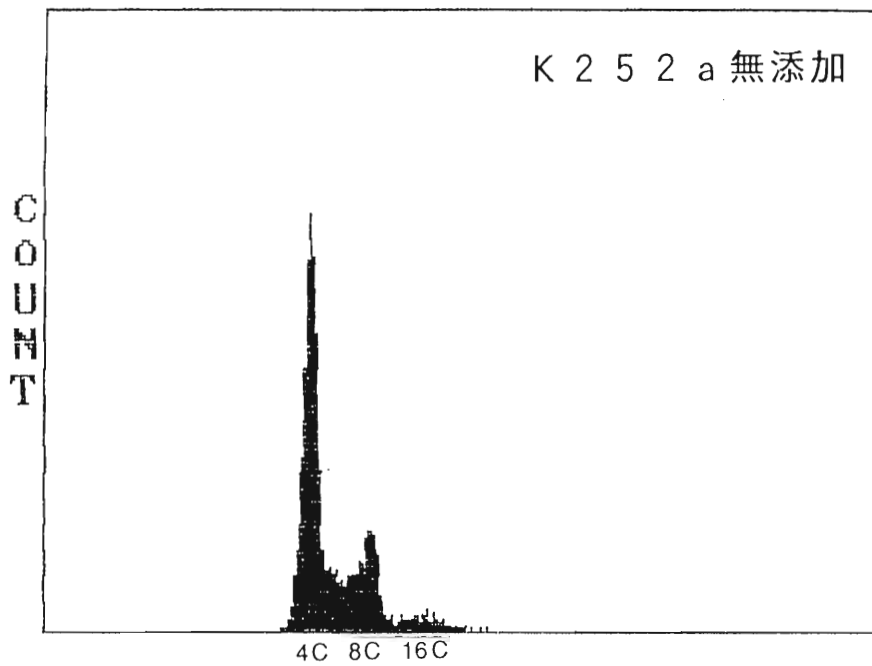


図6 Meg-JのK-252a添加によるploidyの変化

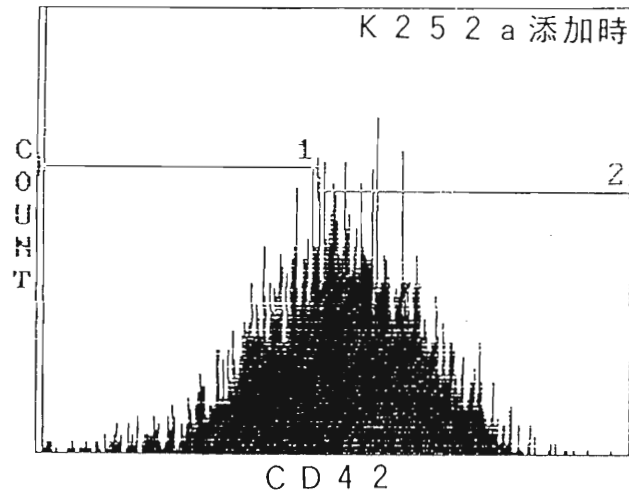
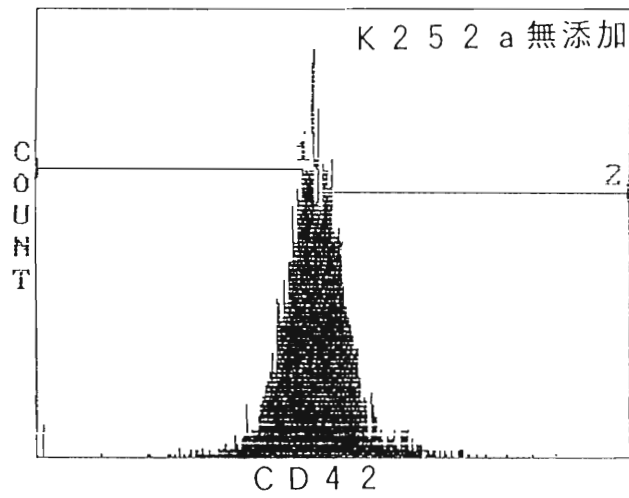
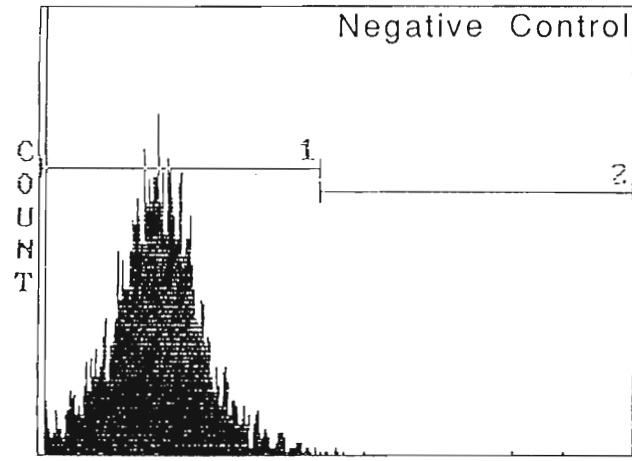


図7 Meg-JのK-252a添加によるCD42の変化

### (3) 巨核球系細胞のTPAによる成熟機構の作用機序についての検討

#### 【方法】

CMK細胞にTPA(12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate)、Staurosporin、Calphostin C、Herbimycin Aを単独あるいは同時に添加して液体培養を行い、CD41の発現の変化についてフローサイトメトリーを用いて検討した。また、CMK細胞にBrdUを取り込ませた後、FITC結合抗BrdU抗体でDNA中のBrdUを染色し、さらにPropidium iodide (PI) 染色によりDNA総量をフローサイトメトリーで検討することにより、TPA、Staurosporin、Calphostin C、Herbimycin Aの細胞周期およびploidyの変化について検討した。

#### 【結果】

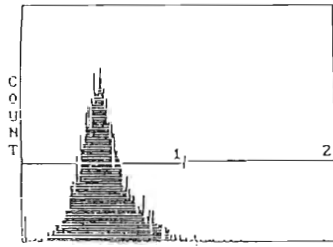
CMK細胞にTPAを添加するとCD41の発現の増強が認められた。このTPAによるCD41の発現の増強は、Staurosporin (図8)、あるいはHerbimycin A (図9) を同時に添加することにより減弱した。しかしCalphostin AをTPAとともに添加しても不変であった (図10)。

TPA添加によりS期の細胞の比率が低下し、G<sub>2</sub>/M期(8N)の細胞の比率が増加した。さらに16N以上のploidyの比率が増加した。このTPAによる細胞周期の変化は、Staurosporinにより一部キャンセルされた (図11)。すなわち、TPAとStaurosporinを同時に添加すると、S期の比率の増加傾向、G<sub>2</sub>/M期(8N)の細胞の比率の低下が認められた。しかし、Herbimycin A、あるいはCalphostin CをTPAとともに添加しても、明らかな変化は認められなかった (図12,13)。また、TPAによる16N以上のploidyを有する細胞の比率は、Staurosporin、Calphostin C、Herbimycin Aのいずれを添加しても変化し

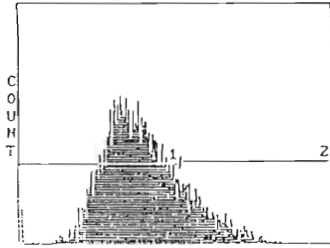
なかった（図11,12,13）。

#### 【考察】

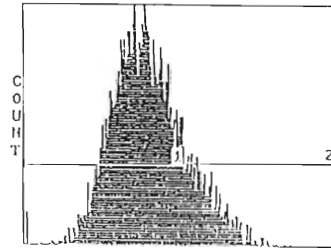
CMKのTPA添加によるCD41発現の増強は、Staurosporin、あるいは特異性の高いチロシンキナーゼ阻害剤であるHerbimycin Aを同時に添加すると減弱したが、プロテインキナーゼC阻害剤であるCalphostin Cを添加しても阻害されなかった。以上の結果より、CMKのTPA添加によるCD41発現の増強の機序は、少なくともチロシンキナーゼを介するものであることが示唆された。TPAによる細胞周期に対する作用は、一部Staurosporinにより解除されたが、Calphostin C、Herbimycin Aでは解除されず、プロテインキナーゼC、チロシンキナーゼのいずれの機序によるものか明らかにできなかった。また、TPAによるploidyの増加については、今回用いた3つのキナーゼ阻害剤では変化が認められなかった。今後、他のキナーゼ阻害剤を用いてさらに検討する予定である。



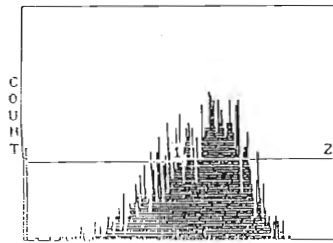
Control



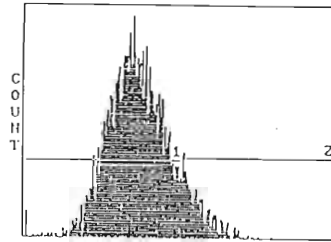
無添加



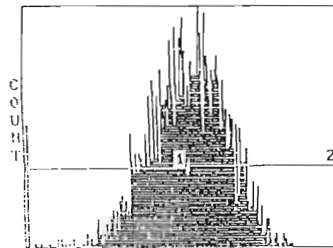
Staurosporin 1nM



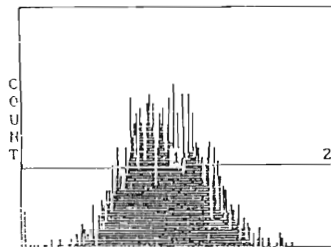
TPA



Staurosporin 10nM

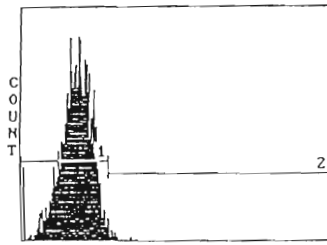


TPA+Staurosporin 1nM

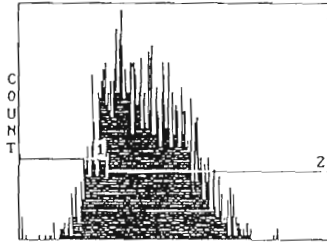


TPA+Staurosporin 10nM

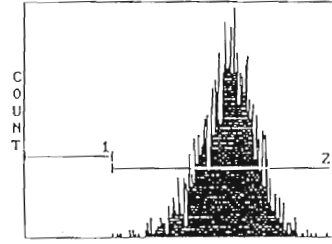
図8 TPAおよびStaurosporin のCD41発現に対する影響



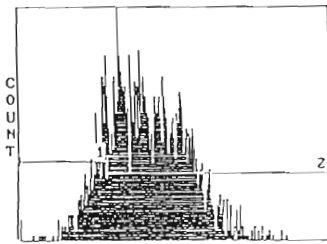
Control



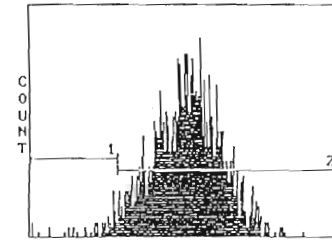
無添加



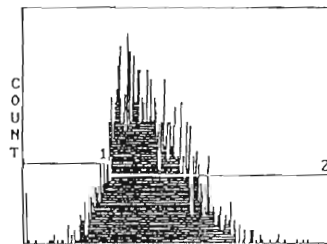
TPA



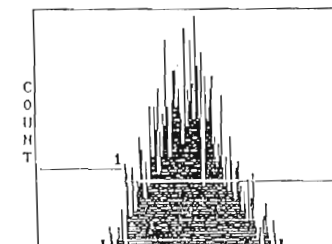
Herbimycin A 0.1μM



TPA+Herbimycin A 0.1μM



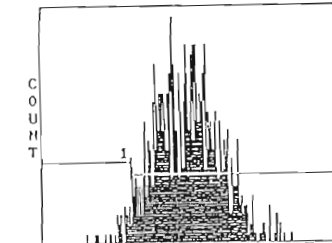
Herbimycin A 0.5μM



TPA+Herbimycin A 0.5μM

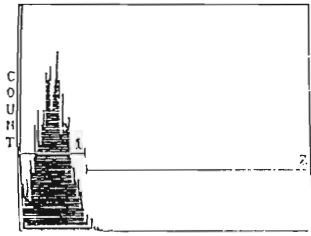


Herbimycin A 1μM

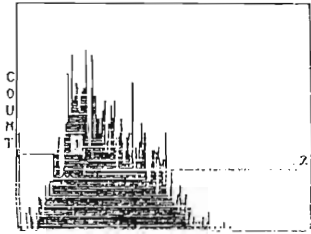


TPA+Herbimycin A 1μM

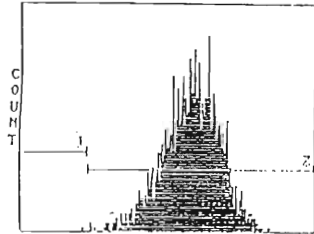
図9 TPAおよびHerbimycin AのCD41発現に対する影響



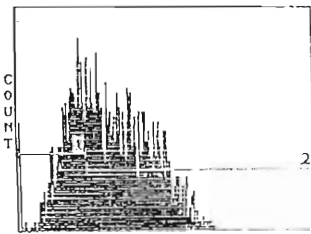
Control



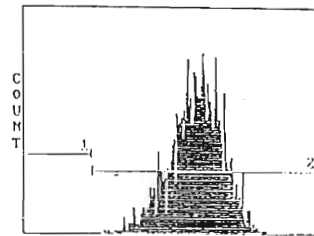
無添加



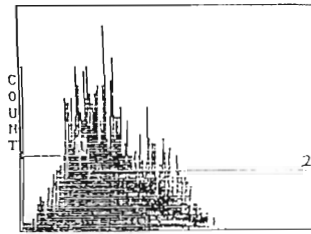
TPA



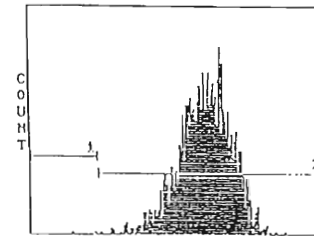
Calphostin C 0.1 $\mu$ M



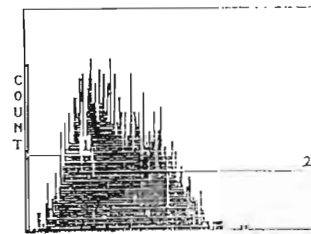
TPA+Calphostin C 0.01 $\mu$ M



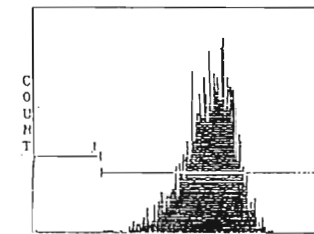
Calphostin C 0.01 $\mu$ M



TPA+Calphostin C 0.05 $\mu$ M



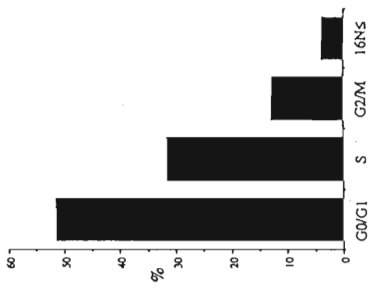
Calphostin C 0.05 $\mu$ M



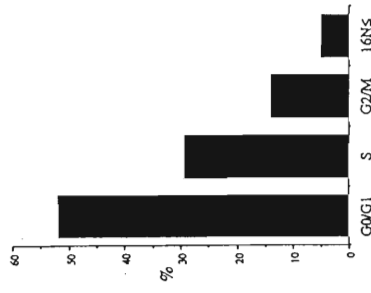
TPA+Calphostin C 0.1 $\mu$ M

図10 TPAおよびCalphostin CのCD41発現に対する影響

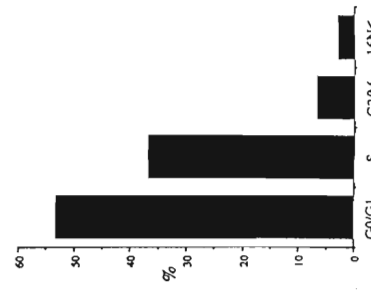




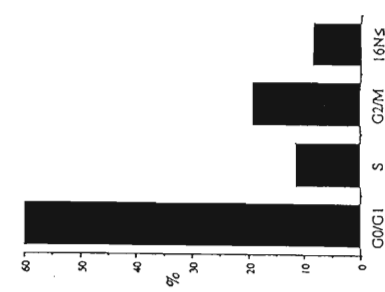
Staurosporin 10nM



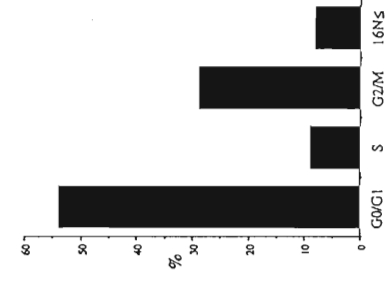
Staurosporin 1nM



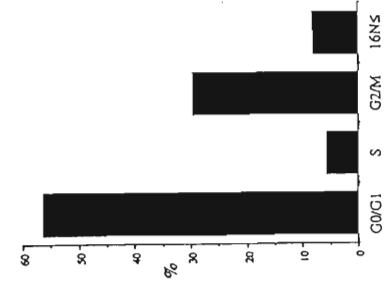
Control



TPA+Staurosporin 10nM

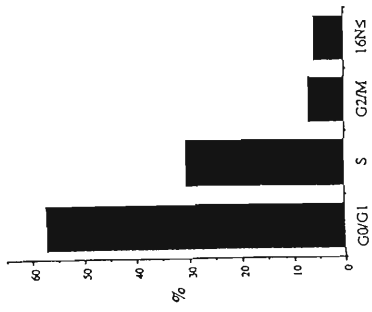


TPA+Staurosporin 1nM

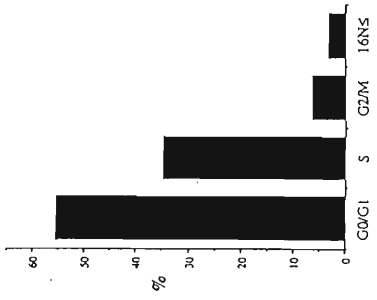


TPA

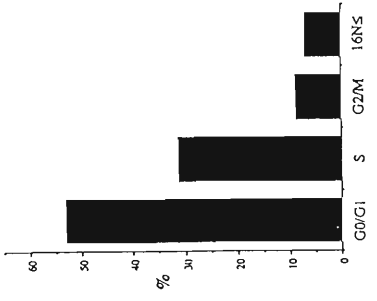
図11 TPAおよびStaurosporinの細胞周期およびploidyに対する影響



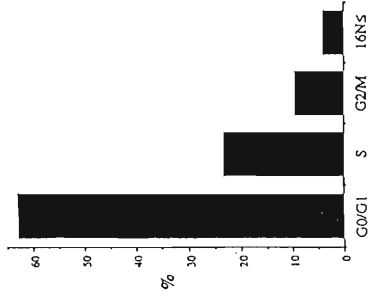
Control



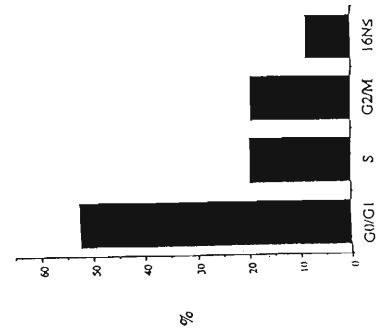
Herbimycin 0.1μM



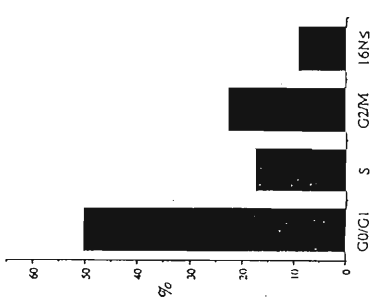
Herbimycin 0.5μM



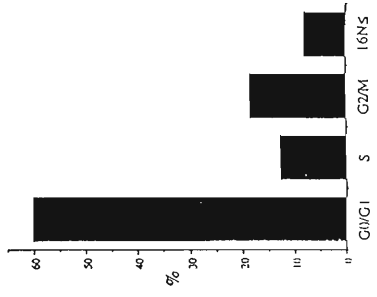
Herbimycin 1μM



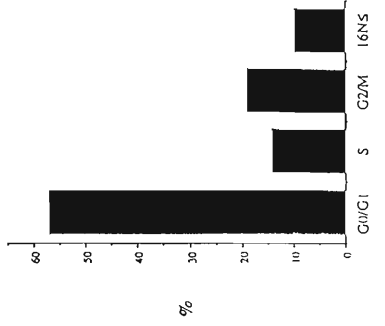
TPA



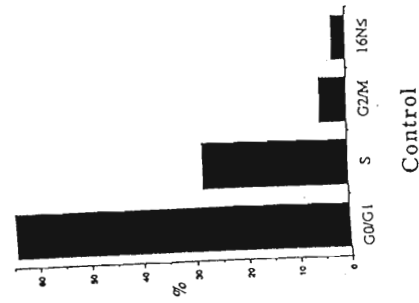
TPA+Herbimycin 0.1μM



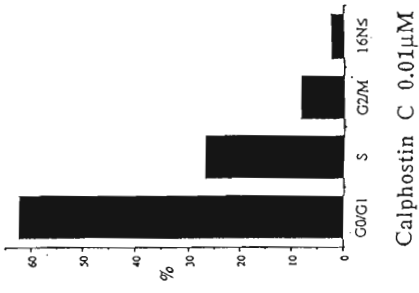
TPA+Herbimycin 0.5μM



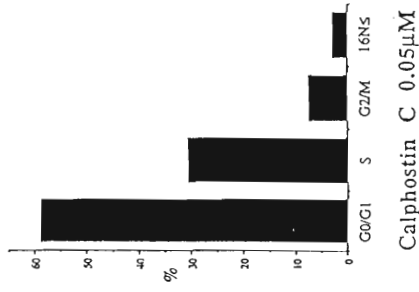
TPA+Herbimycin 1μM



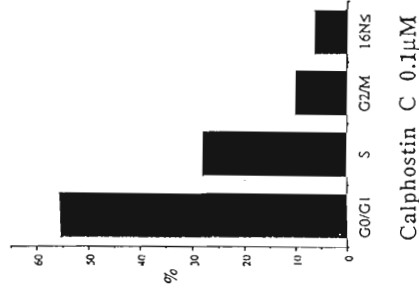
Control



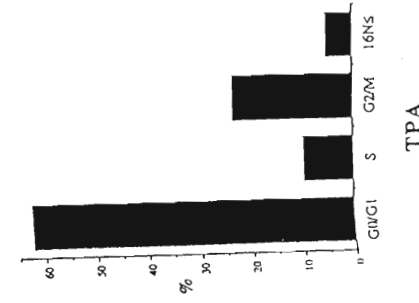
Calphostin C 0.01 $\mu$ M



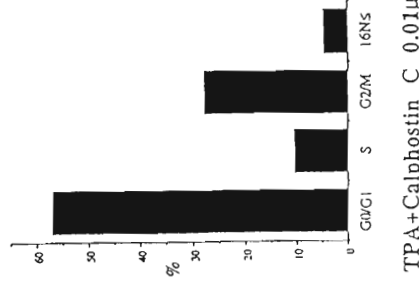
Calphostin C 0.05 $\mu$ M



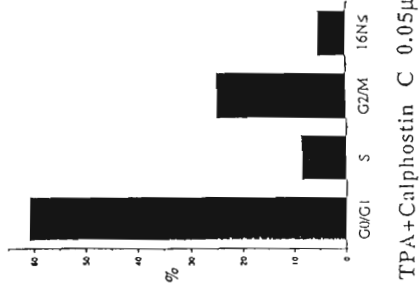
Calphostin C 0.1 $\mu$ M



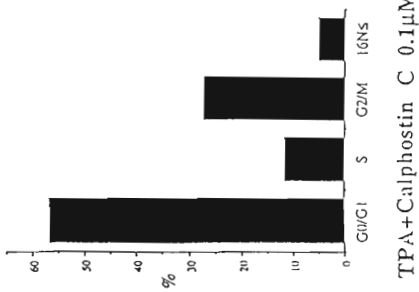
TPA



TPA+Calphostin C 0.01 $\mu$ M



TPA+Calphostin C 0.05 $\mu$ M



TPA+Calphostin C 0.1 $\mu$ M

図13

TPAおよびCalphostin Cの細胞周期およびploidyに対する影響