

# 安東 恒史 論文内容の要旨

## 主 論 文

High expression of 67-kDa laminin receptor relates to the proliferation of leukemia cells and increases expression of GM-CSF receptor

ラミニンレセプター高発現は白血病細胞の増殖と  
GM-CSF レセプター発現に関連している

安東恒史、宮崎泰司、澤山靖、富永信也、松尾江美、山崎励至、井上順子、岩永正子、今西大介、対馬秀樹、福島卓也、今泉芳孝、田口潤、吉田真一郎、波多智子、朝長万左男

(Experimental Hematology 2011年 掲載予定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻  
(主任指導教員：宮崎 泰司 教授)

### (緒言)

造血幹細胞の自己複製, 増殖分化には幹細胞と造血微小環境との接着が重要である。造血微小環境は、骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞といった細胞成分とそれらを取り巻く laminin, collagen, fibronectin, などの細胞外基質から成り、近年、白血病幹細胞の生存、増殖との関連が注目されている。ラミニンレセプター (LR) は、種々の造血細胞に発現し、細胞外基質との接着に関与する分子の一つであるが、LR の白血病幹細胞における役割は十分に解析されていない。LR はさまざまな癌腫に高発現し、laminin との結合による細胞増殖や細胞外基質との結合を介した細胞遊走、転移など、細胞の腫瘍化や病状進展への関与が報告されている。一方で白血病細胞株では、LR が GM-CSF と GM-CSF レセプターとの結合を調節することで血球の分化、増殖、生存などに関与することが報告されており、血液細胞においてはサイトカインシグナルを介した LR のユニークな作用機序が想定される。そこで、我々は、白血病細胞における LR 発現とその生物学的意義を検討する目的で研究を計画した。

### (対象と方法)

1. AML 患者初診時骨髄より CD34 陽性細胞を単離し LR の細胞表面への発現をフローサイトメトリーにて測定し、臨床病態との比較を行う。
2. GM-CSF 依存性白血病細胞株 TF-1 を用いて LR 過剰発現株 (TF-1LR)、siRNA による発現低下株 (TF-1si) を作製する。
3. これらの細胞株を用いて、WST-1 assay や半固形培地を用いたコロニー形成能にて増殖力に対する LR 発現の関連を検討する。
4. BrdU assay を用いて LR 発現に伴う細胞周期の変化について検討する。
5. 低濃度 GM-CSF 下にて培養し、AnexinV 発現をフローサイトメトリーにて測定し、

LR 発現と抗アポトーシスの関連を明らかにする。

6. 増殖シグナルの一つである stat5 のリン酸化と LR 発現の相関について検討する。
7. TF-1LR、TF-1si とコントロール細胞株を用い、LR と GM-CSFR $\alpha$  の発現の相関をフローサイトメトリーにて検討する。
8. AML 臨床検体を用いて同様に LR と GM-CSFR $\alpha$  の発現について検討を行う。

#### (結果)

1. AML 患者において LR 発現が 25%未満を LR 低発現グループ、25%以上を LR 高発現グループとして 2 群間の比較を行ったところ、LR 高発現群では低発現群に比べ白血球数、骨髄有核細胞数が増加していた。LR 高発現グループは LR 低発現グループに比べて有意に生存率の低下を認めた (それぞれ 20%と 54%,  $p=0.01$ )。
2. 野生株 TF-1 の LR 発現率 64%に対して、LR 過剰発現による高発現株 TF-1LR (発現率が 92%) と、siRNA を用いた低発現株 TF-1si (発現率 36%) を作成した。
3. WST-1 assay、半固形培地を用いたコロニー形成能による増殖力の比較において、コントロールと比較してそれぞれ、TF-1LR では有意な増強、TF-1si では有意な減弱を認めた。
4. BrdU assay による細胞周期の比較において TF-1LR では有意な S 期細胞の増加、TF-1si では有意な G0/G1 期の増加が見られた。
5. 細胞増殖に関するリン酸化シグナル (stat5) は、TF-1LR ではコントロールに比べ有意に増強、TF-1si では有為に減弱していた。
6. AnnexinV 発現によるアポトーシスの検討では TF-1LR はアポトーシス細胞の減少を、逆に TF-1si はアポトーシスの増加を示した。
7. 免疫沈降法にて LR と GM-CSFR $\alpha$  が蛋白複合体を形成することが確認された。細胞株では GM-CSFR $\alpha$  の発現は LR 発現レベルによって調節されている可能性が示された。
8. AML 臨床検体を用いた解析でも、LR と GM-CSFR $\alpha$  の発現は相関することが示された。

#### (考察)

白血病細胞株 TF-1 を用いた実験において、LR はその発現レベルによって GM-CSFR $\alpha$  発現を調節し GM-CSF シグナルを調整することで、白血病細胞の増殖促進や抗アポトーシスに関連している可能性が示された。

AML の臨床検体を用いた解析において、LR 高発現と白血球数増加や予後不良との関連が示唆された。

これらの解析より、白血病細胞においては LR 発現が GM-CSFR $\alpha$  発現を調整し、細胞の増殖亢進や抗アポトーシスに寄与することで、予後不良の一因子となっている可能性が示された。