

主論文の要旨

**Wnt signaling is associated with cell survival in
the interaction between acute myeloid leukemia
cells and stromal cells**

Wnt シグナル経路は急性骨髄性白血病細胞とストローマ細胞との
細胞間相互作用における細胞生存に関連している

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
臨床薬物情報学講座 医療薬学分野

(指導：山田 清文 教授)

丹羽 洋介

【緒言】

本研究は骨髄ストローマ依存性白血病細胞株 TRL-01 を骨髄ストローマ細胞株 HTS と共培養する系を用い、白血病細胞の生存・増殖に関与する細胞間因子の探求を目的としている。

TRL-01 は治療関連性急性骨髄性白血病細胞を NOD/SCID mouse with IL-2R γ C^{-/-} (NOG mouse) に継代移植することで樹立したストローマ依存性白血病細胞株である。TRL-01 はマウスの生体内、あるいは骨髄ストローマ細胞と共培養することで維持されるが、単独培養での長期維持は困難である(Supplementary Figure 1a-c)。単独培養条件下での TRL-01 は GM-CSF、SCF、G-CSF の添加、あるいはファイブロネクチンと接着させることで短期間の培養が可能であるが、いずれの場合も生存・増殖を完全にサポートすることはできず、ストローマ由来の何らかの因子が TRL-01 の生存・増殖をサポートしていることが示唆される。

Wnt は分子量 40,000 の分泌性糖タンパク質であり、哺乳動物では 19 種類が同定されている。Wnt は細胞表面の受容体 Fz への結合によって細胞内へシグナルが伝達されるが、この Wnt シグナル経路は beta-catenin 経路 (canonical 経路)、PCP 経路、Ca²⁺経路 (non-canonical 経路) の 3 つのシグナル伝達経路から構成され、細胞の増殖・分化、胎生期の体軸形成・器官形成など様々な細胞機能を調節していると考えられる。近年、Wnt シグナル経路の詳細な機能が解明されつつあり、造血幹細胞の未熟性維持や増殖促進に Wnt シグナル経路が関与しているという報告や、悪性腫瘍と Wnt シグナル経路の異常との関連性が多く報告されるようになった。

今回、TRL-01 の生存・増殖をサポートする因子として、Wnt シグナル経路に着目して検討を行った。また、AML 臨床検体を用いて Wnt シグナル経路との関連性を同様に検討した。

【材料及び方法】

細胞培養

TRL-01 は Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)、10% fetal bovine serum (FBS)、100 IU/ml penicillin-G、100 μ g/ml streptomycin を使用し、HTS と共培養した。

HS-5 は Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、10% FBS、100 IU/ml penicillin-G、100 μ g/ml streptomycin を使用して培養した。Hela は MEM with Earle's Salts and L-Gln、10% FBS、100 IU/ml penicillin G、1% pyruvic acid を使用して培養した。Primary AML 骨髄細胞は RPMI、10% FBS、100 IU/ml penicillin-G、100 μ g/ml streptomycin を使用し、ヒト骨髄ストローマ細胞株 HS-5 と共培養した。細胞培養は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件にて行った。

Wnt 阻害因子、Wnt recombinant protein の作用の検討

TRL-01、HTS 共培養条件における Wnt 阻害因子の作用の検討

24-well culture plate を用いて HTS 1 \times 10⁵ cells/well を培養し、HTS が容器底面に付着し

た後、TRL-01 1×10^5 cells/well を加え 72hr 培養後、sFRP1 (0.5、1.5、4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Dkk1 (0.1、0.3、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Y27632 (3、10、30 μM)を加え、36hr 培養後に TRL-01 を回収しアポトーシスを測定した。

TRL-01 単独培養条件における Wnt5A、5B、9A recombinant protein の作用の検討

24-well culture plate を用いて TRL-01 1×10^5 cells/well を培養し、Wnt5A、5B、9A recombinant protein (それぞれ 1、10、100 ng/mL)を加え、2 日間培養後に TRL-01 を回収しアポトーシスを測定した。

白血病臨床検体における Wnt 阻害因子の作用の検討

24-well culture plate を用いて HS-5 1×10^5 cells/well を培養し、HS-5 細胞が容器底面に付着した後、Primary AML 骨髄細胞と Y27632 (10、30、50 μM)を加え、36hr 培養後に Primary AML 骨髄細胞を回収しアポトーシスを測定した。

アポトーシスの測定

TRL-01、Primary AML 骨髄細胞を回収後、細胞を 0.2% TritonX-PBS(-)で懸濁し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propidium Iodide (PI)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase を添加。PI 染色後の細胞浮遊液を 5 mL Polystyrene Tube に移し、FACS CaliburTM を用いて DNA 量による細胞周期ヒストグラムを測定した。測定結果を CELLquest software を用いて解析し、アポトーシスの割合を算出した。

Reverse transcription (RT)-PCR による Wnts、Fzs、LRPs の検出

TRL-01、HTS、Primary AML 骨髄細胞、HS-5 から RNA を抽出し cDNA を作成した。

RT-PCR 反応条件は Fzs, LRPs; preheat 95°C 6 min、denaturation 94°C 30 sec、annealing 58°C 30 sec、elongation 72°C 30 sec、38 cycle、final elongation 72°C 7 min とした。

Wnts; preheat 95°C 6 min、denaturation 94°C 30 sec、annealing 58°C 30 sec、elongation 72°C 30 sec、30 cycle、final elongation 72°C 7 min とした。

Western blotting

Hela、TRL-01、HTS、HS-5 を PBS(-)で洗浄後、Protease inhibitor、Phosphatase inhibitor を加えた lysis buffer で lysate を作成した。Lysate のタンパク濃度を合わせた後、Western sample buffer、1% 2-mercaptoethanol を加え 95°C 5min 加熱し、SDS/PAGE を行った。

泳動後 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane に転写し、5% skim milk Tris-buffered saline (TBS) 0.1% Tween 20 (TBS-T)を用いて室温で 1hr ブロッキングした。一次抗体として anti-Wnt5A 抗体、anti-beta-actin 抗体を 4°Cで一晩インキュベートし、二次抗体として HRP-linked whole anti-rabbit IgG 抗体を室温で 1hr インキュベートした。ECL Western blot detection kit を用いて PVDF 膜上のタンパクを検出した。

【結果】

TRL-01 と HTS を共培養し、Wnt の阻害因子である sFRP1 を加えると TRL-01 のアポトーシスが誘導された。さらに、Wnt non-canonical 経路を阻害する Rho kinase inhibitor Y27632 を加えることによってもアポトーシスが誘導された。一方、Wnt の canonical 経路特異的な阻害因子である Dkk1 を加えた場合には TRL-01 のアポトーシスは誘導されなかった(Figure 1a)。TRL-01 及び HTS の Wnt 関連遺伝子の発現を RT-PCR によって調べたところ、HTS において Wnt5A、5B、9A 転写産物の特徴的な発現が認められた(Figure 1b)。また、HTS における Wnt5A タンパクの発現は Western blotting によっても確認されたが、TRL-01 では Wnt5A タンパクの発現は確認されなかった(Supplementary Figure 1d)。

TRL-01 単独培養条件下に Wnt5A、5B、9A recombinant protein を加えると、Wnt5A、9A を加えた場合にアポトーシスが抑制された(Figure 1c)。

Primary AML 骨髄細胞及び HS-5 に関しても同様に Wnt 関連遺伝子の発現を調べたところ、HS-5 においては Wnt5A、9A 転写産物の発現が認められたが、Primary AML 骨髄細胞では Wnt5A、9A はごく微量しか発現していなかった(Figure 1d)。さらに、Primary AML 骨髄細胞と HS-5 を共培養下に Y27632 を加えると、Primary AML 骨髄細胞のアポトーシスが誘導された(Supplementary Figure 1e)。

【考察】

今回の結果から、TRL-01 は HTS 由来の Wnt5A、9A による non-canonical 経路を介したアポトーシスの抑制効果を受けている可能性が示唆される。

また、Wnt シグナル経路は Primary AML 骨髄細胞とストローマ細胞の細胞間相互作用における細胞生存効果との関連性が示唆された。

【結語】

アポトーシス抑制の詳細な機序に関して、更なる探索が必要である。アポトーシス抑制の機序解明は白血病細胞と骨髄ストローマ細胞間のインタラクションをターゲットにした治療アプローチにも有用と考えられる。こうした分子機構の解明は新規薬剤の開発にも繋がり、基礎研究と臨床の両側面から今後注目すべき分野と考えられる。