

主論文の要旨

**BLNK is a selective target of repression by PAX5-PML
in the differentiation block that leads to the
development of acute lymphoblastic leukemia**

〔 BLNKはPAX5-PMLによる分化ブロックが誘導する
白血病発症における選択的な標的遺伝子である 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

井本 直人

【緒言】

PAX5 は pro B 細胞から mature B 細胞にまで発現して B 細胞の分化維持をつかさどる転写因子であり、PML は腫瘍増殖の抑制・アポトーシスの促進に働く因子である。PAX5-PML の融合遺伝子は急性リンパ性白血病 (ALL) において t(9;15)(p13;q24) の染色体転座として認められている。我々はこれまでに PAX5-PML が PAX5 の転写活性を用量依存性に抑制し、また PML の nuclear bodies(NBs)を破壊することで PML の機能を障害すること、亜ヒ酸が PML NBs の再構成をすることでアポトーシスを誘導することを細胞株での強制発現系の実験で報告した。今回我々は正常な B 細胞に PAX5-PML を導入してマウスへ移植することでマウスに ALL を発症させることを試み、また作成された白血病マウスを用いて PAX5-PML による分化障害の機序を解明し、PML 機能の障害が白血病発症へ関与するのか、亜ヒ酸の治療効果があるのか検討を行った。

【方法と結果】

最初にマウスの造血前駆細胞へ PAX5-PML を導入する事を試みた。C57BL/6 マウスの骨髄細胞を取り出し、レンチウイルスで PAX5-PML と GFP を導入して、放射線照射をした同系統マウスへの移植を行った。その結果は、PAX5-PML を導入していない細胞を移植したコントロール群では GFP 陽性細胞の中で B 細胞のマーカーとしての B220 を発現した細胞が 20%程度認められたが、PAX5-PML を導入した群では B220 陽性の B 細胞の生存は認められなかった (Figure1)。

PAX5-PML を造血幹細胞に導入することはリンパ球の発生そのものを障害してしまう可能性があると考え、Pro B 細胞への PAX5-PML の導入を試みた。BALB/c マウスの胎児肝細胞を取り出し、B220 陽性、c-kit 陽性の pro B 細胞分画をソートして OP9 上で共培養した。そこにレトロウイルスを用いて PAX5-PML を導入し、2Gy の放射線照射した NOD/SCID マウスに移植を行った。

移植後のマウスから骨髄細胞と脾臓細胞を採取し、GFP を標識とした移植細胞の CD43, B220 の発現状態を見る事でリンパ球分化段階の解析を行った。コントロールとして GFP のみを遺伝子導入した Pro B 細胞は、7 日目にはマウスの骨髄に存在し、14 日目には mature B に分化して脾臓へ移行し、その後 21 日目には消失していた (Figure2A.2C)。一方で PAX5-PML を導入した pro B 細胞は 56 日目になってもマウスの骨髄にとどまり、生存を続ける様子が認められ、PAX5-PML は B 細胞の分化をブロックすることが示唆された (Figure2B.2C)。

PAX5-PML を導入した pro B 細胞を移植したマウスはすべて 63-158 日の間に死亡した。それらのマウスでは骨髄と脾臓で GFP 陽性の Pro B 細胞が著明に浸潤しており (Figure3A.3B)、その細胞を、放射線照射をした BALB/c マウスに継代していくと、代を重ねるごとにより早期に死亡するようになった (Figure3C)。これらのことから Pro B 細胞に PAX5-PML を導入するとマウスで ALL が発症することが示唆された。この白血病細胞をソートして細胞株 (P-PAL) を樹立した (Figure4A.4B)。

白血病マウスの脾臓細胞・P-PAL の免疫染色を行うことで、PML NBs が破壊されて

いるかの確認を行ったが、いずれの細胞もコントロールと比較して PML NBs の破壊は認められなかった(Figure5A.5B)。また白血病マウスに亜ヒ酸の投与を行っても PML NBs の再構成、腫瘍細胞の減少は起こらず、白血病マウスの生存も延長しなかった(Figure5A.5B.6A.6B)。PAX5-PML はこのシステムでは PML の機能障害は起こさず、また PML 機能の障害は白血病発症には必須ではないことが示唆された。

ウェスタンブロットでこの白血病細胞の PAX5-PML の発現を調べたところ、mRNA での PAX5-PML の発現は RT-PCR にて確認できたが(Figure5C)、蛋白の発現は免疫沈降を行った後にウェスタンブロットを行う頃でかろうじて認められる程度の非常に低いものであり(Figure5D)、このように蛋白発現が低いレベルに抑えられていることが PML 機能の障害が十分にできていない原因なのではないかと考えられた。

次に PAX5 の側からの機能解析を試みた。今回の白血病細胞を用いて、PAX5 の転写標的として知られる CD19、CD79a、BLNK・CD72 の mRNA の発現量を定量 RT-PCR で検討した。正常マウス B 細胞での発現を 1 としたときの mRNA の発現を比較したところ、今回の白血病細胞では BLNK が特に強く抑制されており、BLNK の発現抑制が分化ブロックに重要であることが示唆される結果であった(Figure7A)。CD19 の mRNA 発現には抑制がかからず BLNK には抑制がかかるのは PAX-PML の標的プロモーターへの結合に差があるのではないかと考えたが、ゲルシフトアッセイでは、PAX5 は CD19 にも BLNK にも同程度に結合し、PAX5-PML はどちらのプロモーターにも結合しないという結果であり、その 2 つへの結合に選択性はないことが示唆された(Figure7C)。ゲルシフトアッセイと同じ配列を組み込んだレポータージーンを使用したルシフェラーゼアッセイでも、PAX5 による CD19 プロモーターおよび BLNK プロモーターの転写活性化を PAX5-PML は同じように抑制しており、PAX5-PML の作用にプロモーターの選択性は認められなかった(Figure7D)。

次に BLNK の発現低下が PAX5-PML による白血病発症に重要であるかどうかについて検討した。レトロウイルスベクターで PAX5-PML/GFP と BLNK/hCD8 を導入した Pro B 細胞をマウスに移植したところ、day28 の解析では GFP⁺hCD8⁻ の細胞のみが生存し、GFP⁺hCD8⁺ の細胞はほとんど生存していなかった。BLNK が発現することで PAX5-PML による分化ブロックが起こらなかった結果と考えられた。一方で BLNK を導入せず PAX5-PML/GFP と hCD8 のみを導入した Pro B 細胞を移植したマウスでは GFP⁺hCD8⁺ の細胞も多く生存が認められた。PAX5-PML を導入せず BLNK のみを導入した細胞を移植したマウスでは day28 に移植細胞の生存は確認できなかった(Figure8)。これらの結果より BLNK を強制発現させることは PAX5-PML の分化ブロックや生存を抑制することが示唆された。

【考察】

PAX5 の標的遺伝子の中で BLNK を抑制することが PAX5-PML による分化ブロックに重要であることが示唆された。今回のシステムでは PML 機能の障害は PAX5-PML が白血病発症させるのに必須ではなく、アポトーシス抑制、細胞増殖には別のセカンドヒッ

トが寄与していることが考えられた。そのセカンドヒットを同定していくことが、白血病の多段階発癌のメカニズムにつながると考えられる。

【結語】

我々は本研究によって PAX5-PML の腫瘍原性を確認した。また PAX5-PML による B 細胞の分化ブロックの機序として BLNK の発現抑制が重要であることを示した。