



Immunocytochemical evaluation of abl-gene products in leukemic cell lines

北澤, 莊平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-01-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1614

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001614>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	きた ざわ そう へい 北 澤 荘 平 （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博ろ第1297号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成4年1月22日
学位論文題目	IMMUNOCYTOCHEMICAL EVALUATION OF <i>abl</i> -GENE PRODUCTS IN LEUKEMIC CELL LINES (種々の白血病細胞株における abl 遺伝子産物の免疫細胞化学的検討)

審査委員	主査 教授 前田 盛
	教授 千葉 勉 教授 伊東 宏

論文内容の要旨

〔緒言〕

ヒト細胞における *c-abl* 遺伝子は、Abelson murine leukemia virus 類似の構造を有する *src* family 癌遺伝子の1つである。この *c-abl* 融合をおこし、自己リン酸化能を有する *p210^{bcr-abl}* を蛋白を形成し、慢性骨髄性白血病や、ある種の急性リンパ性白血病の発生、腫瘍細胞増殖に関与することが知られている。本研究では、*c-abl* 遺伝子のcDNA塩基配列より推定されるアミノ酸配列のうち、tyrosine kinase 活性部位でかつ親水性の高い14個を抗原として単クローン抗体を作成し、この単クローン抗体を用いて種々の白血病細胞における *c-abl* 遺伝子産物の光顕、および電顕レベルでの発現・局在を免疫細胞化学的に検討した。

〔材料と方法〕

1) 抗原: *v-abl* 遺伝子の塩基配列をもとに *c-abl* と相同で、かつ tyrosine kinase 活性を有し、親水性の高い部分に相当する15個アミノ酸を、Applied Biosystems 社のペプチド合成装置430Aを用いて作成した。15個のアミノ酸の内、N末端にはキャリアー蛋白との結合に必要な cysteine を、さらにC末端には親水性を高めるために lysine を結合させた (C-ETMFFQESSISDE-L)。m-maleimido benzoic acid n-hydroxysuccinimide を用いて、合成したペプチドの Cysteine の硫酸残基とウシ血清アルブミンとを結合後、Sephadex G-10カラムで精製し抗原として用いた。

2) 抗体の作成: Freund's complete adjuvant と混和した抗原200 μ gを8週令の BALB/c の腹腔に投与し、1週間おきに3回 Freund's incomplete adjuvant と混和した抗原を追加投与し、最

終免疫後 3 日目に細胞融合を行った。細胞融合は、ポリエチレングリコール4000を用い、マウス P 3-X63-AG 8-U 1 形質細胞腫と、脾細胞とを 1 : 8 で混合し、Kohler, Milstein 等の方法に準じて行った。96穴の培養プレートで 2 週間培養後、ELISA 法でスクリーニングした。

3) 抗体の精製 : 培養上清, あるいは BALB/c マウス腹水より得られた抗体を protein-A Sepharose CL-4B カラムを用いて精製した。

4) 免疫沈降 : 得られた合成ペプチドに対する抗体と *c-abl* 蛋白との反応性の検定ために、³⁵S-Met hionin で対数増殖期にある K562 白血病細胞株を代謝的に標識し、細胞破碎後、作成した抗体と 4℃ で 2 時間インキュベーションして、protein-A Sepharose をもちいて免疫複合体を沈降させ、8% SDS poly-acrylamide gel にて電気泳動した。ゲル乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

5) Western Immunoblotting 法 : 種々の細胞株における *c-abl* 蛋白の発現、分子量を検討するため K562, HL60, ABPC 白血病細胞株の細胞破碎物を 8% SDS poly-acrylamide gel にて電気泳動した後、ゲルの内の分離された蛋白質をニトロセルロース膜に電氣的に転写した。ニトロセルロース膜を 2% 脱脂粉乳でブロッキング後、一次抗体として得られた抗体を用い、ビオチン化抗マウス羊血清を二次抗体として作用した後、アビジン・ビオチン・パーオキシターゼ複合体を結合させ、DAB で発色させた。

6) 光顕的免疫細胞化学 : 光顕レベルの発現、局在を K562, KU812, HL60, CTV, KG-1, ML-2, HEL, KMOE, K3D, ABPC 等の種々の白血病培養細胞株において検討した。集細胞の後、エーテル、エタノール 1 : 1 混合液にて固定した。細胞は Vectastain ABC キットによる免疫染色法で検討した。染色強度は、-, ±, +, ++ の 4 段階に判定した。

7) 電顕的免疫細胞化学 : 光顕レベルでの発現が確認された細胞について、*c-abl* 蛋白の細胞内局在の超微形態的検討を行った。培養細胞を PBS にて洗浄後、PLP 固定液で 10 分間固定し、冷 PBS でさらに 3 回洗浄後、4℃ で 30 分一次抗体と反応させた。洗浄後、2% グルタルアルデヒドで固定し、DBA で 5 分間発色反応を行い、2% オスミウム液で後固定し、エポン 812 に包埋し、超薄切片を作成し電顕で観察した。

[結果]

1) 抗体の作成とその評価 : 2 回細胞融合の結果約 3000 クローンの hybridoma を得た。その内、ELISA 法で 4 種の安定株を選択した。この 4 種の抗体で免疫沈降法を行った結果、2 種の抗体、A-2-3, A-3-3 が K562 細胞において 210kD の p210^{bcr-abl} 蛋白に相当するバンドを得た。Immunoblotting 法では、A-2-3 が K562 において p145^{c-abl}, p210^{bcr-abl} 蛋白を認識し、さらに ABPC マウス細胞において p150^{c-abl} 蛋白を認識した。この A-2-3 は IgG2a に属し、以下の光顕、電顕レベルの免疫細胞化学に用いた。

2) 光顕的免疫細胞化学 : 染色強度で、K562, K3D, ABPC が ++ を示し、KU812, HEL が +, KMOE が ±, HL60, CTV, KG-1, ML-2 が - を示した。CML で Ph 1 染色体陽性の細胞、赤白血病細胞が陽性を示す結果で、ノーザン法で、従来報告されてきた傾向に一致するものであった。

3) 電顕的免疫細胞化学：光顕レベルでの発現が確認されたK562, K3D, KU812, HEL, KMOEの免疫電顕法による検索では、Ph¹染色体陽性群と赤白血病群とで差が見られた。つまり、K562, KU812細胞では、c-*abl* 蛋白が細胞膜、粗面小胞体に線状に分布しているのに対して赤白血病細胞であるK3D, HEL, KMOEでは発芽状あるいは顆粒状に分布していた。

[考察]

合成ペプチドを抗原として c-*abl* 蛋白に対する単クローン抗体を作成した。この抗体を用いた免疫沈降では、K562細胞で53kDに一致して共沈する蛋白が見られた。Western Immunoblotting では、53kDの蛋白は検出されず、*abl*蛋白に対する関連蛋白の存在が示唆された。近年、*abl*蛋白に関する多くの生化学的解析がなされてきた。特に、in vitro の磷酸化反応を利用した検討では、白血病化に対する*abl*蛋白の役割の重要性を示している。しかし、*abl*蛋白の形態学的検討、特に細胞内の局在、分布に関しては、これまでほとんど検討されてこなかった。

今回の私共の免疫細胞化学的検討では、主として2種類の細胞、つまりPh¹陽性の慢性骨髄性白血病細胞と赤白血病細胞に*abl*蛋白の発現を認めた。Ph¹陽性の慢性骨髄性白血病細胞では、融合蛋白である *bcr-abl* が形成されており、これらの細胞における免疫染色は、主として p210*bcr-abl* 蛋白に由来するものと推測される。一方、赤白血病に於いては、ノーザン法、今回の Western Immunoblotting 法にても異常*abl*蛋白は検出されていない。よって、赤白血病細胞における免疫染色は正常*abl*蛋白の過剰発現に由来しているものと推定される。また、融合蛋白 *bcr-abl* が、細胞膜、粗面小胞体に線状に分布しているのに対して正常 c-*abl* 蛋白の過剰発現では、発芽状あるいは顆粒状に分布しており、融合蛋白 *bcr-abl* が生化学的に自己磷酸化能を獲得するなどの違いのみならず、その超微的な存在様式も異なっていることが明らかとなった。

[結語]

合成ペプチドを抗原として c-*abl* 蛋白に対する単クローン抗体を作成し、免疫細胞科学的にPh¹陽性細胞と赤白血球細胞における c-*abl* 蛋白の発現、局在につき検討した。

論文審査の結果の要旨

染色体異常と発癌の関係については多くの研究が行なわれたが、杉山らによる Long-Evans ラット白血病での#2トリソミーを中心とした恒常的染色体異常は実験モデルとして先駆的役割を果たした。1981年以来、転座型染色体異常が癌遺伝子の活性化を介して発癌に至ることが明らかになり、ラットの系でも赤芽球性白血病培養株K3Dの転座型染色体異常 t(3;12)が*abl*癌遺伝子の活性化をもたらすことが当教室で明らかにした。以上の研究に引き続いて、本研究者は*abl*癌遺伝子産物の分子病理学的研究を行なった。c-*abl* 遺伝子は、Abelson murine leukemia virus 類似の構造を有する src family 癌遺伝子の1つで、慢性骨髄性白血病や、急性リンパ性白血病Ph¹染色体転座によって

bcr-abl 融合を起こし、腫瘍細胞増殖に関与することが知られている。本研究では、*c-abl* 遺伝子のアミノ酸配列のうち、tyrosine kinase 活性部位でかつ親水性の高い1部分を抗原として単クローン抗体を作成し、白血病細胞株における *c-abl* 遺伝子産物の光顕、および電顕レベルでの発現・局在を免疫細胞化学的に検討した。

[材料と方法]

*abl*癌遺伝子の tyrosine kinase 活性を有し、親水性の高い部分に相当する15個の合成ペプチドを抗原にマウスを免疫、細胞融合法で多数の hybridoma からスクリーニングした。安定に抗体を産生する細胞の選別後、抗体の精製、免疫沈降、Western Immunoblotting 法等の検定後、ヒト、マウス、ラット白血病細胞株での *abl*癌遺伝子産物、光顕、電顕レベルでの局在などを免疫細胞化学的に検討した。

[結果]

2回の細胞融合の結果、約3000クローンの hybridoma から4種の安定株を選別、更に IgG2a サブクラスに属するA-2-3、A-3-3抗体を得た。これら抗体はK562細胞で従来報告されていると同一のバンドパターンが得られ、*abl*を認識していることが確認された、A-2-3抗体を以下の研究に使用した。光顕免疫染色では、*abl*の発現に応じた陽性所見が得られた。電顕的免疫細胞化学ではPh⁺細胞陽性群では*abl*蛋白が細胞膜、粗面小胞体に線状に分布し、赤白血病細胞では顆粒状に分布していた。

[考察]

近年、*abl*蛋白に関する多くの生化学的解析が慢性骨髄性白血病を中心に行われてきた。特に、*in vitro* の磷酸化反応を利用した検討では、白血病化に対する*abl*蛋白の役割の重要性を示めしていたが、*abl*蛋白の形態学的検討、特に細胞内の局在、分布に関しては、これまでほとんど検討されてこなかった。今回本研究者は合成ペプチドを抗原として *c-abl* 蛋白に対する単クローン抗体を作成した。更に、免疫細胞化学的検討では、主として2種類の細胞、つまりPh⁺陽性の慢性骨髄性白血病細胞株と赤白血病細胞株に*abl*蛋白の発現を認めた。Ph⁺陽性の慢性骨髄性白血病細胞では、融合蛋白である *bcr-abl* が形成されており、これらの細胞における免疫染色は、主として p210*bcr-abl* 蛋白に由来するものと推測される。一方、赤白血病細胞における免疫染色は正常*abl*蛋白の過剰発現に由来しているものと推定される。また、融合蛋白 *bcr-abl* が、細胞膜、粗面小胞体に線状に分布しているのに対して正常 *c-abl* 蛋白の過剰発現では、発芽状あるいは顆粒状に分布しており、融合蛋白 *bcr-abl* が生化学的に自己磷酸化能を獲得するなどの違いのみならず、その超微的な存在様式も異なっていることが明らかとなった。

以上、本研究は*abl*癌遺伝子産物について、抗体の作成とその白血病細胞における異常や局在を研究したものであるが、従来殆ど行なわれなかった各種白血病での分子形態学的研究について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。