



ヒト慢性骨髄性白血病に対する遺伝子組換え型ヒトインターフェロン α -2bの作用の基礎的検討

阿部, 則雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-06-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1652

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001652>

※ 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）	あ べ のり お 阿 部 則 雄 （滋賀県）
博士の専攻 分野の名称	博 士（医学）
学位記番号	博ろ第1314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6月10日
学位論文題目	ヒト慢性骨髄性白血病に対する遺伝子組換え型ヒトインター フェロン α -2bの作用の基礎的検討

審 査 委 員	主査 教授 前 田 盛
	教授 伊 東 宏 教授 山 口 延 男

論 文 内 容 の 要 旨

〔緒 言〕

ヒト慢性骨髄性白血病（CML）に対するヒトインターフェロン α （human Interferon- α 以下 hIFN- α と略す）の臨床応用に関する報告の中で最も注目されることは、hIFN- α 投与により Philadelphia 染色体（Ph⁺染色体）陽性細胞の減少が認められることである。CMLにおけるPh⁺染色体では9番目の染色体の *c-abl* 遺伝子が22番目の染色体の breakpoint cluster region (*bcr*) に転座していわゆる *bcr-abl* 融合遺伝子が形成される。そのため正常の *c-abl* 遺伝子由来の6 kb, 7 kbの m-RNAの代わりに8.5 kbの m-RNAがつくられ、この融合型の m-RNA からつくられる蛋白、すなわち p210 が tyrosine kinase 活性を有し、そのことがCMLにみられる白血病細胞の自律性増殖と密接な関係を有しているのではないかと考えられている。一方、hIFN- α はある種の腫瘍由来細胞株に対しては、class-I major histocompatibility complex (MHC) 抗原遺伝子の発現を増殖させる効果を有していることはよく知られており、hIFN- α が免疫系に何らかの作用をしていることが示唆されている。そこで本研究では、遺伝子組換え型（recombinant 以下 r）hIFN α -2bのヒトCML細胞株やCML患者末梢血白血病細胞の増殖抑制機序を明らかにするため、*bcr-abl* 融合遺伝子及び class-I MHC 抗原遺伝子の発現を中心に検討した。

〔材料と方法〕

1. 液体培養法による増殖の検討

Ph⁺染色体陽性ヒトCML細胞株K-562, K-562-J（K-562より分離された赤芽球分化しやす

い亜株), KU-812, BV-173の4種の細胞株を用いた。ヒトCML細胞株を $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml濃度で, 20%FCS添加のRPMI1640培地にて, 最終濃度100~10000IU/mlのrhIFN α -2bの存在下に, 37°C, 5%CO₂加湿潤空气中で24穴平底プレートにて4日間培養し, トリパンブルー色素排除法により生細胞数を計測した。

2. 軟寒天コロニー形成法による増殖の検討

患者白血病細胞としてPh⁺染色体陽性CML3症例より得た末梢血白血病細胞を用いた。ヒトCML細胞株については, 20%FCS添加のRPMI1640培地に最終濃度100~10000IU/mlのrhIFN α -2bを含む0.5%寒天層(下層)に, 下層と同一の培地及び1000個の細胞を含む0.3%軟寒天層(上層)を重ねしプラスチック培養皿(35×10mm)を用いて37°C, 5%CO₂加湿潤空气中で培養した。培養6~10日目に倒立位相差顕微鏡にてK-562細胞, K-562-J細胞の場合には約100細胞以上の, またKU-812細胞の場合には約30細胞以上の細胞集団をコロニーと判定し, その数を計測した。CML患者末梢血白血病細胞については, 20%FCS添加のMcCoy5A培地に最終濃度50CFU/mlの遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子(rhG-CSF)あるいは遺伝子組換え型ヒトインターロイキン3(rhIL-3)を加えて, 細胞株と同様に軟寒天培養した。培養17~19日目に倒立位相差顕微鏡にて約20細胞以上のコロニー数をカウントした。

3. Northern blot 法

ヒトCML細胞株を $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml濃度で, 20%FCS添加のRPMI1640培地にて, 最終濃度5000IU/mlのrhIFN α -2b存在下に, 37°C, 5%CO₂加湿潤空气中でプラスチック培養皿(100×20mm)に1日及び3日間培養した。これらの細胞を集めグアニジンチオシアン酸・塩化セシウム法にて総RNAを抽出した。その15 μ gをホルムアルデヒド含1.2%アガロースゲルで電気泳動しナイロン膜に写しとった。³²Pで標識したヒト*bcr*, ヒトHLA-B7及びマウス β -actinのフラグメントをプローブとして, ナイロン膜上でRNAとハイブリダイズした。オートラジオグラフィ法で, *bcr-abl*融合遺伝子, class-I MHC抗原及び β -actin遺伝子のm-RNAを検出した。

[結 果]

1. ヒトCML細胞株の増殖に及ぼすrhIFN α -2bの影響(液体培養法)

rhIFN α -2bは1000IU/ml~10000IU/ml 4日間処理にてK-562細胞とKU-812細胞に対してはほぼ同程度の弱い増殖抑制効果を示した。一方, K-562-J細胞及びBV-173細胞に対してはK-562細胞及びKU-812細胞より強い増殖抑制効果を示した。

2. ヒトCML細胞株及び患者白血病細胞の増殖に及ぼすrhIFN α -2bの影響(軟寒天コロニー形成法)

1) ヒトCML細胞株に対する影響

rhIFN α -2bは1000~10000IU/ml 6~10日間処理にてK-562細胞, K-562-J細胞及びKU-812細胞の3種の細胞株に対してはほぼ同程度のかなり強いコロニー形成抑制効果を示した。

2) CML患者末梢血白血病細胞に対する影響

症例Y.MのrhIL-3添加群でコロニー形成が認められなかった以外、いずれの症例とも rhG-CSF またはrhIL-3添加により明らかなコロニー形成の促進が認められた。rhIFN α -2bは1000IU/ml17~19日間処理にて3症例いずれに対しても著明なコロニー形成抑制効果を示した。

3. rhIFN α -2bの *bcr-abl* 融合遺伝子とclass-IMHC抗原遺伝子の発現に及ぼす影響

K-562細胞及びBV-173細胞ではいずれも *bcr-abl* 融合遺伝子の過剰発現が認められた。これらの細胞をrhIFN α -2b (5000IU/ml) で1日及び3日間処理した。その結果、*bcr-abl* 融合遺伝子の発現は、K-562細胞では変化しなかったのに対してBV-173細胞ではrhIFN α -2b 1日及び3日間処理によって発現抑制が認められた。一方、class-IMHC抗原遺伝子の発現は、K-562細胞、BV-173細胞ともrhIFN α -2b 1日及び3日間処理によっていずれも増強される傾向を示した。またコントロールとして β -actin遺伝子の発現に対する影響も検討したが、いずれの場合においてもrhIFN α -2bによる変化は認められなかった。

【考 察】

rhIFN α -2bのヒトCML細胞株に対する増殖抑制能を検討した結果、軟寒天コロニー形成法の方が液体培養法より感受性が高いことが判明した。両者の方法でこのような感受性の違いがでた理由として、1つには、軟寒天コロニー形成法での軟寒天中は細胞にとってより培養環境が厳しく、このことが結果としてrhIFN α -2bによる増殖抑制効果を受けやすくしたためと考えられた。また、軟寒天コロニー形成法の方がrhIFN α -2bの処理日数が長いことも理由の1つと考えられた。rhIFN α -2bのCML患者末梢血白血球細胞に対するコロニー形成抑制効果は、3症例いずれに対しても著明でありrhIFN α -2bがCMLにとって有用な治療薬になりうることが示唆された。次に、rhIFN α -2bにより増殖抑制効果の認められた2種のヒトCML細胞株を用いて、rhIFN α -2bの *bcr-abl* 融合遺伝子及び class-IMHC 抗原遺伝子の発現におよぼす影響を検討した。その結果、*bcr-abl* 融合遺伝子の発現は、K-562細胞では変化を受けなかったのに対し、BV-173細胞では抑制される傾向を示した。一方、class-IMHC 抗原遺伝子の発現は、K-562細胞、BV-173細胞ともに増強される傾向を示した。このように、rhIFN α -2bによりclass-IMHC抗原遺伝子の発現増強効果が認められたことは、BV-173細胞で見られた *bcr-abl* 融合遺伝子の発現抑制が、単に増殖抑制に伴って起こる可能性がある遺伝子全体の発現低下の一生理的現象ではなく、*bcr-abl* 融合遺伝子に特異的な作用である可能性を示唆するものである。また、BV-173細胞においてのみrhIFN α -2bによる *bcr-abl* 融合遺伝子の発現抑制効果が認められたことは、CML患者のうちの小数においてのみrhIFN α -2b投与によりPh⁺染色体陽性細胞の減少が認められるという報告と合致し、さらにPh⁺染色体陽性細胞の減少が見られる場合には、Ph⁺染色体上の *bcr-abl* 融合遺伝子に直接rhIFN α -2bが作用している可能性を示唆するものである。

【結 語】

ヒトCMLに対するrhIFN α -2bの作用の基礎的検討を行った。その結果、rhIFN α -2bはヒト

CML細胞に対して直接的な増殖抑制作用を有し、さらにBV-173細胞に対してはPh⁺染色体上の *bcr-abl* 融合遺伝子に直接作用している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

In Vitro 実験系は、種々の研究でのモデルとして再現性良く研究できる等の利点を有する。インターフェロンは、種々の癌に対する治療効果が期待されたが、当初予想されたほどの効果を発揮せず、限定した疾患に有用であることが明らかになってきた。腎癌等と同様に、慢性骨髄性白血病(CML)や Hairy cell leukemia 等にインターフェロン- α が有効とされているが、その作用機構は明らかでない。CMLにおけるPh⁺染色体では9番目の染色体の *c-abl* 遺伝子が22番目の染色体の breakpoint cluster region (*bcr*) に転座していわゆる *bcr-abl* 融合遺伝子が形成される。そのため正常と異なり8.5kbのm-RNAがつくられ、この融合型のm-RNAから作られる蛋白、すなわちp210が tyrosine kinase 活性を有し、そのことがCMLにみられる白血病細胞の自律性増殖と密接な関係を有しているのではないかと考えられている。そこで本研究者は、遺伝子組換え型ヒトインターフェロンのCML細胞株やCML患者末梢血白血病細胞の増殖抑制機序を明らかにするため、in vitro の系を用いて検討した。

【方 法】

1. Ph⁺染色体陽性CML細胞株K-562, K-562-J (K-562より分離された赤芽球分化しやすい亜株), KU-812, BV-173の4種の培養細胞株を用いて、100~10000IU/mlの recombinant human Interferon α -2b (以下rhIFN α と略す)添加時の細胞増殖を液体培養法でのトリパンブルー色素排除法と、軟寒天コロニー形成法によるコロニー数カウントで検討した。また、患者白血病細胞としてPh⁺染色体陽性CML3症例より得た末梢血白血病細胞を用いて、遺伝子組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子(rhG-CSF)あるいは遺伝子組換え型ヒトインターロイキン3(rhIL-3)を加えて、rhIFN α の添加時の細胞増殖を細胞株と同様に軟寒天培養した。

2. Northern blot 法

CML細胞株を最終濃度5000IU/mlのrhIFN α 存在下に培養し、*bcr-abl* 融合遺伝子、class-I MHC 抗原及び β -actin遺伝子のm-RNAを検出した。

【結 果】

1. CML細胞株の液体培養法での増殖に及ぼすrhIFN α の影響

rhIFN α は1000IU/ml~10000IU/ml 4日間処理にてK-562細胞とKU-812細胞に対してはほぼ同程度の弱い増殖抑制効果を示した。一方、K-562-J細胞及びBV-173細胞に対してはK-562細胞及びKU-812細胞より強い増殖抑制効果を示した。

2. CML細胞株及び患者白血病細胞増殖の軟寒天コロニー形成法でのrhIFN α の影響

1) 細胞株に対する影響

rhIFN α は1000~10000IU/ml 6~10日間処理にてK-562細胞、K-562-J細胞及びKU-812細胞の3種の細胞株に対してはほぼ同程度のかなり強いコロニー形成抑制効果を示した。

2) 患者末梢血白血病細胞に対する影響

症例Y.MのrhIL-3添加群でコロニー形成が認められなかった以外、いずれの症例ともrhG-CSFまたはrhIL-3添加により明らかなコロニー形成の促進が認められた。rhIFN α は1000IU/ml 17~19日間処理にて3症例いずれに対しても著明なコロニー形成抑制効果を示した。

3) rhIFN α の *bcr-abl* 融合遺伝子と class-IMHC 抗原遺伝子の発現に及ぼす影響

K-562細胞及びBV-173細胞ではいずれも *bcr-abl* 融合遺伝子の過剰発現が認められた。これらの細胞をrhIFN α (5000IU/ml) で処理した結果、*bcr-abl* 融合遺伝子の発現は、K-562細胞では変化しなかったのに対してBV-173細胞ではrhIFN α 1日及び3日間処理によって発現抑制が認められた。一方、class-IMHC 抗原遺伝子の発現は、K-562細胞、BV-173細胞ともrhIFN α 1日及び3日間処理によっていずれも増強される傾向を示した。

[考 察]

rhIFN α のCML細胞株に対する増殖抑制能を検討した結果、軟寒天コロニー形成法の方が液体培養法より増殖抑制効果が高かった。軟寒天コロニー形成法での軟寒天中は細胞にとってより培養環境が厳しく、このことが結果としてrhIFN α による増殖抑制効果を受けやすくしたためと考えられた。また、軟寒天コロニー形成法の方がrhIFN α の処理日数が長いことも理由の1つと考えられた。rhIFN α のCML患者末梢血白血病細胞に対するコロニー形成抑制効果は、3症例いずれに対しても著明であった。更に、*bcr-abl* 融合遺伝子の発現は、K-562細胞では変化を受けなかったのに対し、BV-173細胞では抑制される傾向を示した。一方、class-IMHC 抗原遺伝子の発現は、K-562細胞、BV-173細胞ともに増強される傾向を示した。従って、BV-173細胞で見られた *bcr-abl* 融合遺伝子の発現抑制が、単に増殖抑制に伴って起こる可能性がある遺伝子全体の発現低下の一生理的現象ではなく、*bcr-abl* 融合遺伝子に特異的な作用である可能性を示唆するものである。

以上、本研究者はインターフェロンの制癌効果機構について、その作用機序を培養系を用いて研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった *bcr-abl* 融合遺伝子の発現抑制による治療効果をもたらす可能性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。