

## 学位論文題名

## Deffective calcium influx in rat myelomonocytic leukemia cells which are resistant to differentiation-inducing effects of lipid A

(Lipid A の分化誘導効果に抵抗性を示すラット骨髄単球性白血球細胞におけるカルシウム流入機構の欠陥)

## 学位論文内容の要旨

目的) Lipid A は、lipopolysaccharide (LPS) の活性部位であり、抗腫瘍活性、単球の活性化、endotoxic shock の誘導など多彩な活性を有している。さらに Lipid A が、ある種の白血球細胞の分化を誘導することも知られている。最近 Kobayashi らは、lipid A による分化誘導がカルシウム依存性の kinase である calmodulin kinase の阻害剤によっても阻害されることを報告した。また、細胞内遊離カルシウム濃度の上昇が Lipid A の細胞内シグナル伝達機構に関与することがすでに報告されている。以上の事実は、Lipid A による白血球細胞の分化誘導機構に細胞内遊離カルシウム濃度の上昇が関与する可能性を示している。本研究では、Lipid A によって分化するラット骨髄単球性白血球細胞と Lipid A の分化誘導効果に抵抗性を示す亜株を用いて、Lipid A 処理後の細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を測定し、Lipid A の分化誘導に細胞内遊離カルシウム濃度の上昇が関与する可能性を検討した。さらに、カルシウムイオンフォアによって細胞内にカルシウムイオンを強制的に流入させることによって分化誘導抵抗性細胞の分化が誘導されるか否かを検討した。

材料と方法) Lipid A の誘導体である ONO-4007 および  $^{14}\text{C}$  標識 ONO-4007 は小野薬品工業株式会社より供与された。カルシウム indicator である Fura-2/AM は同仁化学研究所より、Ionomycin および LPS は Sigma Chemical より、Psitectrigenin は Kyowa Medix Co. Ltd. より、Calphostin C および W-7 は BIOMOL Research Laboratories Inc. より購入した。LPS によってマクロファージ様細胞に分化するラット骨髄単球性白血球細胞株 c-WRT-7 (P2) 株および P2 を LPS にて処理後分化しなかった細胞より樹立した LR 株を用いた。LR 株は、LPS によって分化せず、また増殖も阻害されない。①細胞増殖に対する ONO-4007 の効果は、 $10^4$  個の細胞を段階希釈した ONO-4007 とともに  $100\ \mu\text{l}$  の RPMI-1640 培地にて 3 日間培養し、最後に 6 時間  $500\ \mu\text{g/ml}$  の MTT 試薬を添加して培養後、 $100\ \mu\text{l}$  の Isopropanol を添加して

ELIZA readerにて測定した。②分化誘導効果は、latex beads と2日間培養後、5個以上の beads を貪食した細胞の比率を算定した。③Lipid A receptor は、FITC 標識 LPS を用いた FACS にて検討した。特異的結合は、非標識 LPS および非標識 Lipid A を FITC 標識 LPS の50倍加えた時との比較にて判定した。また、ONO-4007 および  $^{14}\text{C}$  標識 ONO-4007 を用いて Scatchard plot analysis を行い receptor 数および結合平衡定数を求めた。④細胞内遊離カルシウム濃度は、 $10\ \mu\text{M}$  Fura-2/AM を細胞に負荷後、fetal calf serum を添加した測定 buffer (Hepes buffer containing  $1\ \text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) に  $2 \times 10^6/\text{ml}$  にて浮遊させ、Hitachi fluorescence spectrophotometer にて測定した。⑤ONO-4007 と Ionomycin の併用による分化誘導効果は、ONO-4007 を非添加もしくは  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  添加し、Ionomycin を  $0, 0.1, 0.5, 1\ \mu\text{M}$  添加して P2 細胞および LR 細胞の beads を貪食した比率を算定した。

⑥種々のシグナル伝達阻害剤による ONO-4007 の分化誘導阻害効果は、段階希釈したシグナル伝達阻害剤と  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の ONO-4007 を同時に添加して、P2 細胞および LR 細胞の beads を貪食した比率を算定した。

結果) ①P2 細胞は、ONO-4007 によって用量依存性に増殖が阻害されたが、LR 細胞は阻害されなかった。②P2 細胞は、ONO-4007 によって用量依存性に分化が誘導されたが、LR 細胞の分化は誘導されなかった。③P2 細胞、LR 細胞ともに Lipid A receptor を保有しており、それぞれ  $8.167 \times 10^7$  個および  $3.39 \times 10^7$  個の receptor を持ち、平衡定数は  $114.3\ \text{nM}$  および  $66.76\ \text{nM}$  であった。④P2 細胞では、ONO-4007 添加後1分以内に細胞内遊離カルシウム濃度の急激な上昇が認められたが、LR 細胞では認められなかった。⑤P2 細胞で認められた ONO-4007 添加後の細胞内遊離カルシウム濃度の急激な上昇は、細胞外液中のカルシウムを EGTA にてキレートすると認められなくなった。⑥ONO-4007 と Ionomycin を併用すると、LR 細胞でも Ionomycin の濃度依存性に分化が誘導された。⑦Psitectrigenin と Calphostin C は ONO-4007 による分化誘導を阻害しなかったが、Calmodulin kinase の阻害剤である W-7 とカルシウムのキレート剤である EGTA によって用量依存性に ONO-4007 による分化誘導を阻害した。

考案) 本研究にて、P2 細胞の Lipid A による分化誘導において、細胞外カルシウムの流入による細胞内遊離カルシウムの上昇が重要な役割を果たしていること、LR 細胞では細胞外カルシウム流入機構に欠陥があるために Lipid A の分化誘導効果に抵抗性を示すことが示唆された。しかしながら、Ionomycin 単独では P2 細胞および LR 細胞の分化は誘導されず、分化誘導には細胞内遊離カルシウムの上昇以外のシグナル伝達分子も必要と考えられた。Kobayashi らは、P2 細胞の ONO-4007 による分化誘導が tyrosine kinase の阻害剤である Herbimycin によって抑制されることを報告しており、tyrosine kinase を介したシグナル伝達経路が必要と考えられる。LPS が作用を示す際のカルシウムイオンの役割については現在でも確定していないが、LPS によって遊離カルシウムイオンの上昇が認められるとする報告は数多くある。最近、カルシウムイオノフォアによって Friend erythroleukemia cell が分化すること、細胞内

遊離カルシウムイオンの上昇によって c-myb mRNA 発現が抑制されることが報告された。この事実および本研究の結果は、白血病細胞の分化にカルシウムイオンの上昇が second messenger として重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 政 樹  
副 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

## Deffective calcium influx in rat myelomonocytic leukemia cells which are resistant to differentiation-inducing effects of lipid A

(Lipid A の分化誘導効果に抵抗性を示すラット骨髄単球性白血病細胞におけるカルシウム流入機構の欠陥)

申請者は、分化誘導剤による癌治療法（分化誘導療法）の発展を期して、Lipid A による分化誘導シグナル伝達機構を理解することを目的に、分化誘導抵抗性株を樹立し、抵抗性獲得の機序を検討した。以前 Kobayashiらは、Lipid Aによる分化誘導がカルシウム依存性のkinaseであるcalmodulin kinaseの阻害剤により阻害されることを報告している。申請者はその報告に着目し、Lipid Aによる白血病の分化誘導機構に細胞内遊離カルシウム濃度の上昇が関与する可能性を考えた。本研究では、Lipid Aによって分化するラット骨髄単球性白血病細胞株と、Lipid Aの分化誘導効果に抵抗性を示す亜株を用いて、Lipid A処理後の細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を測定し、Lipid Aの分化誘導に細胞内遊離カルシウムの上昇が関与するのかを検討した。さらに、カルシウムイオノファによって細胞内に強制的にカルシウムイオンを流入させることによって、分化誘導抵抗性細胞の分化が誘導されるか否かを検討した。その結果、分化誘導感受性株では、Lipid Aの添加後 1分以内に細胞内遊離カルシウム濃度の急激な上昇が認められたが、分化抵抗性株では認められなかった。また、分化誘導感受性株で見られたLipid A添加後の細胞内遊離カルシウムの急激な上昇は、細胞外液のカルシウムをEGTAにてキレートすると認められなくなった。Lipid Aによる分化誘導抵抗性株は、Lipid Aとカルシウムイオノファを併用することで、Lipid Aおよびカルシウムイオノファの用量依存的に分化が誘導された。また、分化感受性株のLipid Aによる分化は、細胞外液のカルシウムをキレートすると認められなくなった。

以上の結果を基に、申請者は、Lipid Aによる白血病細胞の分化誘導において、細

胞外カルシウムの流入による細胞内遊離カルシウムの上昇が second messengerとして重要な役割を果たしていることを示唆した。また、Lipid Aの分化誘導効果に対する抵抗性獲得の機序の一つとして、細胞外カルシウム流入の欠陥があると考えた。しかしながら、カルシウムイオノファによって強制的に細胞内にカルシウムイオンを流入させても分化が誘導されなかったことから、Lipid Aによる分化誘導には細胞内遊離カルシウムの上昇とは無関係の別のシグナル伝達経路も存在すると推測した。

以上の学位論文内容を申請者はおよそ13分に渡って発表示した。その後の質疑応答では、カルシウムイオノファ以外に、分化誘導抵抗性株の分化を誘導することはできないのかと言う質問に対し、申請者は1994年のKobayashiらの論文を引用し、oxygen radical による分化誘導の可能性を示唆した。また、分化抵抗性株のLipid Aとカルシウムイオノファの併用による分化誘導効果が30%程度であることにどのような見解をもっているのか、と言う質問に対して申請者は、クローニングされた抵抗性株にある種の heterogeneity が存在し、カルシウムに対する域値、感受性が異なるため、分化誘導効果が30%という低値となったものと考えられる、と回答した。さらに、その他の分化抵抗性癌細胞においても同様の機序により抵抗性を獲得しているのか、と質問された。申請者は、他の分化抵抗性細胞について調べてはいないが、フレンド白血病細胞 (Friend erythroleukemia cell) の分化に細胞内遊離カルシウム濃度の上昇が関与するという報告 (1993) があり、異なる癌細胞の分化誘導機構においても細胞内カルシウムの上昇が重要な役割を果たしている可能性が考えられるので、抵抗性獲得の樹序としてカルシウムイオンの流入機構の欠陥は異なる細胞でも十分に考えられると思う、と回答した。分化の指標を貪食能のみで判断することに問題はないか、分化誘導機構においてカルシウム上昇の下流にあるシグナル伝達経路についてどのような分子を想定できるのか、と質問があった。申請者は、多段階の分化過程を有するマクロファージへの分化を貪食能のみで判断するのは確かに不十分であり、分化誘導療法を根底に研究を進めるのであれば、少なくとも分化誘導に伴う細胞増殖抑制あるいはアポトーシスの誘導を確認すべきであった。また、カルシウム下流のシグナル伝達経路に関しては、Calmodulin Kinase Inhibitor W7により分化誘導効果が抑制されたことから、カルシウム下流に Calmodulin Kinaseが関与すると考えられるが、それ以上のことは現時点では推測がつかない、と回答した。

この論文は、Experimental Cell Research (1996) に掲載された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。