

に欧米では、造血幹細胞移植後の造血系回復促進およびGVHD抑制を目的として、MSCを造血幹細胞と共に移植する臨床研究が行われているものの、そのメカニズムの詳細は不明である。そこで我々は、マウスMSCモデル細胞株を用いて免疫抑制や造血支持に関わる機能分子の同定を行い、科学的基盤に立脚したMSCの臨床応用を目指している。

(方法) マウスMSCモデル細胞株であるC3H10T1/2細胞とその2つの亜株、脂肪前駆細胞の性質をもったA54細胞と筋芽細胞の性質をもったM1601細胞、更にB6マウス由来のprimary MSC (B6MSC)を用いた解析を行っている。これら4種類のMSCを用いてin vitro及びin vivoで免疫抑制能を比較検討することでMSCの持つ免疫制御能力に関わる機能分子の同定と機能解析を目指した。(結果)(1) MitogenとしてConcanavalin Aの存在下にマウス脾細胞を培養しその反応系に4種のMSCを加えた。48時間後に H^3 -thymidineを加え、取り込まれた放射活性を比較することでリンパ球の増殖抑制に及ぼすMSCの効果を比較した。MSCを加えた全ての反応系においてリンパ球の増殖は抑制された。その抑制効果は反応系に加えるMSCのdoseに依存し、A54細胞とB6MSCで強力でありM1601、10T1/2では弱い傾向が観察された。(2)リンパ球の増殖抑制効果においてMSCとリンパ球のcell to cell contactとsoluble factorのどちらが重要であるかを検討するため、(1)の反応系にA54細胞から得られた種々のconditioned mediumを加えた場合とA54を直接加えた場合とでthymidineの取込みを比較した。A54は強力にリンパ球の増殖を抑制するのに比較して、Conditioned mediumを加えた反応系ではリンパ球の増殖抑制効果は殆ど観察されなかった。(3)GVHDの発症に重要とされているリンパ球のTh1分化に及ぼすMSCの効果を検討した。マウス脾細胞からCD4陽性細胞を分離しCSFE (Carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester) でマーキングした後に、Th1誘導条件下(IL-12+anti IL-4+anti CD3/28microbeads)に72時間培養し、FACSでリンパの分裂動態を観察した。Thymidine up-takeの実験結果と同様にA54

細胞とB6MSCはリンパ球のTh1分化を抑制し、更にIFN- γ の産生も強く抑制した。(4)in vivoにおけるallo-reactive T cellの増殖におけるMSCの効果を観察した。BDF1マウス(ハプロタイプb/d)にB6マウス(ハプロタイプb)の脾細胞をCSFEでマーキングした後移植し3日後にドナーのリンパ球の分裂動態をFACSで観察した。A54、B6MSC投与群においてもリンパ球の分裂増殖抑制効果は観察されなかった。(5)マウスGVHD反応におけるMSCの効果をin vivoで観察するため組織適合性の異なる異系マウス間(BALB/C VS B6, BALB/C VS C3H)で骨髄移植を行い、脾細胞を加えることで効率良くGVHDを発症する実験系を確立した。このマウスGVHDモデルを用いて10T1/2由来細胞株のGVHD抑制効果を検討したところ、生存率に及ぼす有意な効果は今までのところ観察されていない。

(考察) 以上の結果をまとめると、MSCはin vitroの実験系においてリンパ球の増殖を抑制し、その抑制効果の発現には、MSCの産生する液性因子よりもリンパ球とMSCの直接の接触が重要であると思われた。またGVHDの発症に重要と考えられているリンパ球のTh1分化においてもリンパ球の増殖を抑制しIFN- γ の産生を抑えることより、in vivoにおけるGVHDの抑制に有効である可能性が示唆されたが、これまで使用したマウスGVHDモデルにおける治療実験では有効性の確認には至っていない。今後の更なる解析が必要である。

活性型FKHRL1によるCML治療薬イマチニブ耐性克服に向けての基礎的検討

地域医療学系専攻3年 菊池 悟

イマチニブは慢性骨髄性白血病chronic myeloid leukemia (CML)の病因となるBCR-ABLチロシンキナーゼを選択的に阻害する分子標的薬剤で、CML治療における第一選択薬である。しかし、近年不応症例や耐性化症例が認められるようになり、その耐性克服が新たな課題となっている。

FKHRL1は胚形成、分化、腫瘍発生などに関連する転写因子で、CML細胞のBCR-ABLからのリン酸化シグナル伝達経路の下流にリン酸化された不活化状態で存在している。CML細胞ではイマチニブ投与によりFKHRL1は脱リン酸化されて核内へ移行し、転写因子としての活性を持ちアポトーシスが誘導される。これに対しイマチニブ耐性CML細胞ではアポトーシスの誘導は観察されず、FKHRL1のリン酸化も解除されないことから、FKHRL1が脱リン酸化を受けずに転写因子としての活性を持たないことがイマチニブ耐性機序の一つではないかと仮定し、イマチニブ耐性CML細胞において活性型FKHRL1を核内へ誘導することによりアポトーシスを誘導できるかを検討した。

FKHRL1のリン酸化部位に変異を加え、エストロゲンレセプターを結合した活性型FKHRL1-TMERをイマチニブ耐性CML細胞株K562/SR, KCL22/SR, KU812/SRに遺伝子導入し、stable cloneを得てtamoxifenによる活性型FKHRL1の核内発現誘導系を樹立した。これらの細胞はtamoxifen濃度に依存して細胞増殖が抑制され、細胞周期がG0/G1で停止した後、アポトーシスが誘導された。また、この際にFKHRL1の標的遺伝子の一つであるTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)の発現亢進がReal-Time PCR, Western blott法で確認された。TRAILの発現亢進はCML細胞にイマチニブを投与した際にも認められ、イマチニブ耐性CML細胞では認められなかった。そこでTRAIL発現ベクターを作成し、イマチニブ耐性CML細胞に遺伝子導入してTRAILを発現させるとアポトーシスが誘導された。またこの際にcaspase-3, caspase-9, PARPの活性化が認められたが、caspase-8の活性化は認められず、TRAILとデスレセプターの結合を介した既知の経路とは別のシグナル伝達経路によるものと推察された。

以上より、FKHRL1を介したTRAILの発現がイマチニブの作用機序のひとつであることが明らかとなった。またFKHRL1が脱リン酸化を受けずに活性化されないことがイマチニブ耐性機序の一つと考えられ、活性型FKHRL1を用いることによりイマチニブ耐性を克服できる

可能性がある。

成人T細胞性白血病の大規模DNAチップ解析による病期進展機構解明

人間生物学系専攻3年 崔 永林

成人T細胞白血病(ATL)は最も難治性なヒト悪性腫瘍の一つであり、比較的症状の乏しい「くすぶり型」、「慢性型」と、腫瘍細胞の全身臓器への浸潤など多彩な症状を呈する「急性型」とに分けられる。一旦急性型へと移行したATLは極めて予後不良であるが、この病期進展メカニズムは殆ど不明のままである。DNAチップを中心としたゲノミクス技術はATLの発症および病期進展機構の解明の上でも重要な役割を果たすと期待される。しかしながらDNAチップ解析はその鋭敏な感度のため偽陽性結果を生じることも多い。効率の良いATLのゲノミクス解析のためには、各病期のATL患者末梢血より分化レベルの揃ったATL細胞のみを純化して比較することが重要であろう。

我々は慢性型、急性型ともに末梢血CD4陽性分画の殆どがATLクローンによって占められることに着目し、これら病期の患者末梢血よりCD4陽性分画のみを純化するATL細胞バンク事業を開始した。本バンクに属する慢性型19例、急性型22例の純化細胞をアフィメトリクス社HGU133A&B DNAチップを用いて解析し、約3万3千種類のヒト全遺伝子発現量を測定した。さらに同様に純化した健康人末梢血CD4陽性細胞3例、およびそれぞれをPHA刺激により活性化させた3例についてもDNAチップ解析を行った。これら計47例のデータセットよりATL慢性型と急性型とを最も区別する遺伝子セットを抽出し、同遺伝子群の発現パターンより作成した仮想空間にサンプルを投射したところ、両病期のサンプルは乖離した場所に位置することが明らかになった。すなわち慢性型と急性型のATLは遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが示された。

一方急性型特異的に発現する遺伝子を抽出したところ、成長因子受容体をコードする遺伝子