

学位論文

「*RCAN1* is an important mediator of glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cells.」

(ヒト白血病細胞において *RCAN1* はグルココルチコイドによって誘導されるアポトーシスの重要なメディエーターである)

指導教授名 宮下 俊之

申請者氏名 長尾 和右

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

グルココルチコイド (GC) は一部の白血病細胞に細胞周期の停止とアポトーシスを誘導することから、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫の治療に必須の薬剤として使用されている。しかしながら、GC がどのようにしてアポトーシスを誘導するかについては不明な点が多く残されている。GC の受容体は転写因子として機能することから、その標的遺伝子がアポトーシスの誘導に必須であると考えられている。本研究では、GC 感受性のヒト前駆 B リンパ球性白血病細胞株である Nalm-6 を用いて、GC 感受性の複数の細胞株で発現の上昇が見られ、感受性をもたない細胞株では発現上昇が見られなかった *FK506 binding protein 51 (FKBP5)* 遺伝子および *regulator of calcineurin 1 (RCAN1)* 遺伝子を相位的組換えによってノックアウトした。*FKBP5* 遺伝子座の破壊は合成 GC であるデキサメサゾン (DEX) によって誘導されるアポトーシスを抑制しなかったが、*RCAN1* 遺伝子座の破壊は DEX 感受性を著明に低下させた。さらに、Nalm-6 に *RCAN1* を高発現させると DEX 感受性が上昇した。*RCAN1* ノックアウト細胞ではいくつかのアポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質の発現が上昇し、アポトーシス促進性 Bcl-2 ファミリータンパク質の発現が低下していた。*RCAN1* ノックアウトによって DEX 処理による cAMP-response element binding protein (CREB) のリン酸化と CREB 標的遺伝子の発現誘導は抑制され、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる薬剤であるフォルスコリン処理によって *RCAN1* ノックアウト細胞の DEX 感受性が上昇した。これらの結果は *RCAN1* の発現誘導とそれに続く CREB の活性化が GC 誘導アポトーシスにおいて重要な役割を演じていることを示すものである。

目次

| | |
|---|----|
| 1. 序論 | 1 |
| 2. 方法 | |
| 2-1. 細胞培養 | 3 |
| 2-2. 細胞へのアポトーシス刺激 | 3 |
| 2-3. 遺伝子ターゲティングベクターの構築 | 4 |
| 2-4. <i>FKBP5</i> ノックアウト細胞の作製 | 4 |
| 2-5. <i>RCAN1</i> ノックアウト細胞の作製 | 5 |
| 2-6. <i>RCAN1</i> 高発現細胞の作製 | 5 |
| 2-7. サザンブロットイング | 6 |
| 2-8. ウェスタンブロットイング | 6 |
| 2-9. フローサイトメトリー | 7 |
| 2-10. 定量的 RT-PCR | 8 |
| 3. 結果 | |
| 3-1. <i>FKBP5</i> ノックアウトは GC 感受性を抑制しない | 8 |
| 3-2. <i>RCAN1</i> ノックアウトは GC 感受性を著明に抑制する | 9 |
| 3-3. <i>RCAN1</i> ノックアウトは GC によって誘導されるミトコンドリア膜電位低下を抑制する | 10 |
| 3-4. <i>RCAN1</i> ノックアウトは GC による細胞周期停止には影響しない | 10 |
| 3-5. <i>RCAN1</i> ノックアウトは TRAIL および放射線照射によって誘導されるアポトーシスを抑制しない | 11 |
| 3-6. <i>RCAN1</i> 過剰発現は GC 誘導アポトーシスを促進する | 11 |
| 3-7. <i>RCAN1</i> ノックアウトは Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量を変化させる | 11 |
| 3-8. DEX によるアポトーシス誘導では CREB が活性化される | 12 |
| 4. 考察 | 13 |
| 5. 総括と今後の展望 | 15 |
| 6. 謝辞 | 16 |
| 7. 引用文献 | 16 |

| | |
|----------|---------|
| 8. 図表説明文 | -----21 |
| 9. 図表 | -----26 |

1. 序論

グルココルチコイド (GC) は副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンのうち、糖質代謝に係るステロイドおよび同様の作用をもつ合成物質を含めた総称であり、抗炎症作用や免疫抑制作用があることから様々な疾患に対する治療薬として用いられており、幼若なリンパ球や一部の白血病細胞に細胞周期の停止とアポトーシスと呼ばれる細胞死を誘導することから、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫における化学療法に必須の薬剤になっている (1, 2)。しかしながら GC によるアポトーシス誘導機序には不明な点が多く残されている。GC の作用機序は、GC が細胞膜を透過し、細胞質内に存在する GC 受容体に結合するところから始まる。GC 受容体 (GR) は Hsp90 タンパク質や p23 タンパク質と複合体を形成しているが、GC の結合によって GR の立体構造が変化し、それらのタンパク質と解離して核内へと移行する (3, 4)。核内で GR は 2 量体として GC 応答配列 (GRE: glucocorticoid responsive element) と呼ばれる特定の DNA 配列に結合して転写因子として働くほか、ほかの転写因子に対してコファクターとして作用するなどし、標的遺伝子の発現を変化させる (5-8)。2 量体形成能をもたない変異型 GR を発現するマウスでは GC 誘導アポトーシスが抑制されることから、下流で活性化される何らかの遺伝子 (標的遺伝子) がアポトーシス誘導に必須と考えられる (9)。GC によってアポトーシスが誘導される前駆 B リンパ球性白血病細胞株である 697 を用いてオリゴヌクレオチドマイクロアレイによる解析を行った結果、発現が上昇していた遺伝子が 93 個、発現が低下していた遺伝子が 28 個同定された (10)。これらの標的遺伝子の内、いずれかが GC によって誘導されるアポトーシスに関与していると考えられるが、それらの中に既知のアポトーシス関連遺伝子は見いだされなかった。

そこで本研究では、これらの標的遺伝子のうち、いずれもカルシニューリン活性化の制御に関わることが報告されている遺伝子である *FK506 binding protein 51 (FKBP5)* および *regulator of calcineurin 1 (RCAN1)* 遺伝子に注目した。*FKBP5* は FKBP51 タンパク質をコードしており、高度に保存された FKBP ファミリーの一員である。FKBP ファミリータンパク質はイムノフィリンとしても知られ、FK506 結合部位をもち、FK506、rapamycin、cyclosporine A などの免疫抑制剤と結合し、カ

ルシニューリンのセリン/スレオニン脱リン酸化酵素活性を阻害する (11)。加えて、FKBP ファミリータンパク質のうち、FKBP51 を含めて、tetratricopeptide repeat (TRP) ドメインを有するものは Hsp90 二量体を介して GR と会合し、GR の核移行を調節していることが報告されている (12)。RCAN1 は *Down syndrome critical region 1 (DSCR1)* または *modulatory calcineurin-interacting protein 1 (MCIPI)* と呼ばれ、カルシニューリンに対して阻害的に働く二つのタンパク質アイソフォームを二つの第 1 エクソン *RCAN1-1*、*RCAN1-4* の選択的スプライシングによってコードしている (13)。これら二つのタンパク質アイソフォームはそれぞれ異なったシグナルによって発現誘導される (14, 15)。合成 GC であるデキサメサゾン (DEX) 処理によって *RCAN1-1* の転写が誘導されるが *RCAN1-4* は誘導されず、*RCAN1-4* は細胞質カルシウム濃度の増加によって発現誘導される (16)。いずれのアイソフォームも RCAN1 の C 末端領域を介してカルシニューリンと相互作用し、カルシウム-カルシニューリン-NFAT シグナル伝達を調節している (17, 18)。RCAN1 タンパク質の保存されたセリン残基のリン酸化によりカルシニューリンへの結合能が変化することが報告されており、非リン酸化 RCAN1 はカルシニューリンに結合しその活性を阻害するのに対し、リン酸化 RCAN1 はカルシニューリンへの結合能がなくなり、その結果としてカルシニューリンの活性が上昇する (19)。本研究で注目したこれら 2 つの遺伝子は、遺伝子上流に GRE が存在し、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide 存在下で DEX 処理により mRNA の発現が上昇したことから、GC の直接的な標的遺伝子であると考えられる (10)。白血病細胞を含めた T 細胞において GC 誘導アポトーシスがカルシニューリンの活性化によって阻害されること、様々な前駆 Bリンパ球性白血病細胞株を用いた解析で発現誘導の程度と GC 誘導アポトーシスの程度に相関が見られること、さらには RCAN1 タンパク質が NF- κ B の抑制タンパク質である I κ B α を安定化することによって NF- κ B を介在した細胞生存シグナルを抑制すること、が報告されており、これらの理由からこれら二つの遺伝子は GC 誘導アポトーシスに関与している可能性が高いと考えられる (16, 19-21)。

遺伝子発現抑制による遺伝子機能解析において低分子干渉 RNA (small interference RNA: siRNA) を用いた手法は近年盛んに行われている方法であり、比較的簡便に目的遺伝子の発現

抑制が可能である。しかし、siRNA による発現の抑制は完全ではなく、複数の遺伝子について解析する場合に遺伝子ごとに抑制の程度が異なると比較が困難である、白血病細胞株は遺伝子導入の効率が悪く、したがって十分に遺伝子発現を抑制することは困難な場合が多い、標的遺伝子以外の類似配列をもつ遺伝子の発現が抑制される off-target 効果を必ずしも否定できない、といった欠点があり、ヒト白血病細胞株で siRNA による目的遺伝子の発現抑制を行うことは難しい (22)。その一方で、最近、ヒト前駆 B リンパ球性白血病細胞株である Nalm-6 は遺伝子ターゲティングによる遺伝子破壊が比較的効率よく行えることが報告された (23)。Nalm-6 は GC によりアポトーシスが誘導され、且つ、GC により *FKBP5* および *RCAN1* の発現が誘導される細胞株であることから、本研究では、Nalm-6 にターゲティングベクターを導入することにより、*FKBP5*、*RCAN1* 遺伝子をノックアウトした細胞株を作製し、白血病細胞における GC によるアポトーシス誘導機序の解明を試みた。

2. 方法

2-1. 細胞培養

Nalm-6 は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより入手した。Nalm-6 とその派生細胞は 10% ウシ胎児血清、50 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した RPMI1640 培地中で 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した (24)。

2-2. 細胞へのアポトーシス刺激

刺激を加える 24 時間前に細胞を 1×10^5 /ml に調製した。GC 刺激は合成 GC である DEX (Sigma-Aldrich Co. LLC.) を終濃度 1 μ M になるように培地に添加した。TRAIL 刺激は recombinant human TRAIL (R&D Systems) と anti-His₆ cross linking antibody (R&D Systems) をそれぞれ終濃度 10 ng/ml と 1 μ g/ml になるように培地に添加した。放射線刺激は MBR-1505R (Hitachi Medical Co.) を使用し、合計 10 Gy を 1 Gy/min で照射した。

2-3. 遺伝子ターゲティングベクターの構築

ターゲティングベクター構築の模式図を図 1 に示した。ターゲティングベクターの構築は Iizumi らによって報告された方法を参考にし (25)、MultiSite Gateway® Technology (Invitrogen) を利用し、マニュアルにしたがって反応を行った。*FKBP5* ターゲティングベクターは、Nalm-6 のゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応を Expand HighFidelity PCR systems (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) を使用して増幅し、2.2 kb と 1.7 kb の PCR 産物をそれぞれ 5'-arm、3'-arm として使用した (図 1. A)。*RCAN1* ターゲティングベクターは 1.9 kb と 2.1 kb のゲノム DNA 断片を PCR で増幅し、それぞれ 5'-arm、3'-arm として使用した。ターゲティングベクター構築時に使用した PCR プライマーには MultiSite Gateway® Technology を使用するのに必要な *attB* 配列を付加した。本研究で使用したプライマー配列を表 1 に示した。PCR 産物を 0.7% アガロースゲル電気泳動し、目的のバンドを切り出して QIAEXII Gel Extraction Kit (EMD Millipore Co.) を使用して精製した。5'-arm および 3'-arm PCR 産物をそれぞれ pDONR P4-P1R および pDONR P2R-P3 と組換え、5'-arm entry clone および 3'-arm entry clone を作製した (図 1. B)。5'-arm entry clone、3'-arm entry clone、*lox-P* 配列で挟まれた hygromycin 耐性遺伝子 (*hyg^r*) または puromycin 耐性遺伝子 (*puro^r*) を保持する entry clone (それぞれ pENTR *lox-Hyg* および pENTR *lox-Puro*) と、diphtheria toxin A (DT-A) 遺伝子を保持するプラスミド (pDEST DTA-MLS) の間で組換え反応を行い、ターゲティングベクターを作製した (図 1. C)。*hyg^r* を保持する、*FKBP5*、*RCAN1* に対するターゲティングベクターをそれぞれ pFKBP-*Hyg*、pRCAN1-*Hyg* とした。*puro^r* を保持する、*RCAN1* に対するターゲティングベクターを pRCAN1-*Puro* とした。pENTR *lox-Hyg*、pENTR *lox-Puro*、pDEST DTA-MLS は横浜市立大学の足立博士から供与を受けた (25)。構築したターゲティングベクターは制限酵素 *PmeI* (New England Biolabs, Inc.) で消化して直鎖状にし、フェノール/クロロホルム抽出で精製した後、Nalm-6 への遺伝子導入に用いた。

2-4. *FKBP5* ノックアウト細胞の作製

Nalm-6 (4×10^6) に pFKBP-Hyg 4 μg を Nucleofector™ (Lonza) を使用してマニュアルに従い遺伝子導入した。24 時間培養後、0.4 mg/ml hygromycin B (Wako Pure Chemical Industries) を含む培地に交換し、96 穴プレート 2 枚に分注し、3-4 週間選別を行った。得られた hygromycin 耐性クローン細胞から QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を鋳型として FKBP5 5'-F と universal primer B、FKBP5 3'-R と universal primer A の組み合わせで PCR を行い、それぞれ 5'-arm 側と 3'-arm 側で正しく相同組換えが生じ、FKBP5 が 1 アレルノックアウトされた細胞 ($FKBP5^{+/Hyg}$) をスクリーニングした (図 1. D)。 $FKBP5^{+/Hyg}$ に Cre recombinase 発現ベクター、pEF-CRE (国立成育医療センター研究所の宮戸博士より供与) を遺伝子導入し、24 時間後に限界希釈し、同様にスクリーニングを行い hyg^r が除去されたクローン、 $FKBP5^{+/-}$ を得た。 $FKBP5^{+/-}$ にもう一度 pFKBP-Hyg を遺伝子導入し、同様にスクリーニングを行い $FKBP5^{-/Hyg}$ を得た後、再び pEF-CRE の遺伝子導入により、FKBP5 ノックアウト細胞 ($FKBP5^{-/-}$) を作製した。

2-5. RCAN1 ノックアウト細胞の作製

Nalm-6 に pRCAN1-Hyg を遺伝子導入し、得られた hygromycin 耐性クローンをスクリーニングした。PCR プライマーは RCAN1 5'-F と universal primer B、RCAN1 3'-R と universal primer A の組み合わせを用いた (図 1. D)。得られた RCAN1 1 アレルノックアウト細胞 ($RCAN1^{+/Hyg}$) に pRCAN1-Puro を遺伝子導入し、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin (Wako Pure Chemical Industries) を含む培地で選別した。得られた puromycin 耐性クローンのスクリーニングを RCAN1 5'-F と universal primer A、RCAN1 3'-R と universal primer B の組み合わせを用いた PCR で行ない、RCAN1 ノックアウト細胞 ($RCAN1^{Hyg/Puro}$) を作製した。

2-6. RCAN1 高発現細胞の作製

Nalm-6 に 4 μg の pHA-RCAN1 (Hospital Duran i Reynals の de la Luna 博士より供与) を遺伝子導入し、0.7 mg/ml G418 (Takara Bio Inc.) を含む培地で選別した。

2-7. サザンブロッティング

遺伝子ターゲティングによる *FKBP5* ノックアウトの確認として、Nalm-6、*FKBP5*^{+/+}、*FKBP5*^{-/-} から抽出したゲノム DNA 8 μg を制限酵素 *NheI* (New England Biolabs, Inc.) で消化し、0.7% アガロースゲル電気泳動によって分離した。分離したゲノム DNA を GeneScreen Plus® hybridization transfer membrane (PerkinElmer) に転写し、*FKBP5* 5'-F プライマーと *FKBP5* 5'-R プライマーを用いた PCR 産物をランダムプライム法により α -[³²P]-dATP 標識したプローブとハイブリダイズ (65°C、16 時間) した。転写膜を 2 \times SSC、0.1% SDS を用いて 5 分間 2 回室温で洗浄し、2 \times SSC、0.1% SDS を用いて 15 分間 2 回 65°C で洗浄した。シグナルの可視化は FLA2000 phosphorimager (Fujifilm) を用いた。*RCAN1* ノックアウトの確認は Nalm-6、*RCAN1*^{+Hyg}、*RCAN1*^{Hyg/Puro} から抽出したゲノム DNA を制限酵素 *HindIII* (New England Biolabs, Inc.) で消化し、プローブには *RCAN1* 5'-F プライマーと *RCAN1* 5'-R プライマーを用いた PCR 産物を α -[³²P]-dATP 標識して用いた。

2-8. ウェスタンブロッティング

細胞を遠心分離後、上清を除去し、PBS で 1 回洗浄した。上清を完全に除去し、細胞を lysis buffer (150 mM NaCl、1% Triton-X100、10 mM Tris-HCl (pH7.4)、5 mM EDTA、1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride、18 μg prot./ml aprotinin、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、1 mM benzamidin、0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin) に再浮遊させた。氷上で 30 分間静置後、15,000 \times g、10 分間、4°C で遠心後、上清を回収し、細胞溶解液とした。タンパク質量として 30 μg を SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。Preblock solution (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、5% low fat dry milk powder、150 mM NaCl、0.1% Tween 20、2% BSA) でブロッキング後、preblock solution で希釈

した 1 次抗体と一晚、4°C で反応させた。その後、ニトロセルロース膜を wash buffer (120 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 31.3 mM K₂HPO₄) で 5 分間、3 回洗浄し、preblock solution で希釈した 2 次抗体と 2 時間、室温で反応させた。再びニトロセルロース膜を wash buffer で 5 分間、3 回洗浄し、enhanced chemiluminescence immunoblotting detection reagents (GE Healthcare) を用いてシグナルを可視化した。抗 FKBP51 抗体 (Santa Cruz)、抗 RCAN1 抗体 (Santa Cruz)、抗 GR 抗体 (Santa Cruz)、抗 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体 (Enzo Life Sciences)、抗 BAX 抗体 (Medical & Biological Laboratories)、抗 Bcl-2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 Bcl-xL 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 Bim 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 CREB 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 CREB (Ser133) 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 calcineurin 抗体 (EMD Millipore Co.)、抗 Bak 抗体 (26) を 1 次抗体として用いた。2 次抗体には、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ラット IgG 抗体 (Santa Cruz)、HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Santa Cruz)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を用いた。

2-9. フローサイトメトリー

フローサイトメーターによる解析は FACScan (Becton, Dickinson and Company) を用いて行った。ヨウ化プロピジウム (PI) 取り込みによる死細胞の解析は、PI (Nacalai Tesque, Inc.) を終濃度 40 µg/ml で培地に加えて行った。アポトーシス細胞の検出は細胞を遠心分離 (750×g, 5 分) で集めた後、氷冷した PBS で 2 回洗浄し、1×10⁶/ml になるように Annexin V binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) に再懸濁した。再懸濁液 100 µl に Annexin V-PE (Becton, Dickinson and Company) と 50 µg/ml 7-AAD (Becton, Dickinson and Company) を 5 µl ずつ加え、室温で遮光して 15 分間反応させた。その後、Annexin V binding buffer を 400 µl 加えて解析した。DNA 含有量測定は細胞を遠心分離後、上清を除去し、30% EtOH を含む PBS に再懸濁し、4°C で 30 分間固定した。さらに 37°C で 20 分間反応し、遠心分離後、上清を除去した。その後、細胞を PI stain buffer (0.1% Triton-X100, 0.1 mM EDTA, 0.05 mg/ml

RNaseA、50 µg/ml PIを含むPBS) に再懸濁し、解析した。ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) は 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3), Life Technologies Co.) を終濃度 4 nM で培地に加え、5% CO₂ 存在下で 37°C、15 分間反応させ、遠心分離して上清を除去後、PBS に再懸濁して解析を行った。

2-10. 定量的 RT-PCR

TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて抽出した total RNA 5 µg を鋳型として、Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて終量 20 µl で cDNA を合成した。これを鋳型として SsoFast EvaGreen Supermix と CFX96 Real Time System (Bio-Rad Laboratories) を使用して定量的 PCR を行い、*GAPDH* 発現量で補正した。

3. 結果

3-1. *FKBP5* ノックアウトは GC 感受性を抑制しない

Nalm-6 に pFKBP5-Hyg を遺伝子導入し、hygromycin B で選別した結果、相対的組換えによって *FKBP5* 遺伝子座が 1 アレルノックアウトされた細胞、*FKBP5*^{+Hyg} が得られた (図 2. A)。*FKBP5*^{+Hyg} に pEF-CRE を遺伝子導入後、もう一度 pFKBP5-Hyg を遺伝子導入し、さらに pEF-CRE を遺伝子導入することによって、最終的に *FKBP5* 遺伝子座が 2 アレルノックアウトされた細胞、*FKBP5*^{-/-} が得られた。設計通りに *FKBP5* 遺伝子座の破壊が行われたことをサザンブロットイングによって確認し (図 2. B)、タンパク質の発現が失われたことをウェスタンブロットイングによって確認した (図 2. C)。*FKBP5* ノックアウトが GC 感受性を変化させたかどうかを解析するために、Nalm-6、*FKBP5*^{+/-}、*FKBP5*^{-/-} を 1 µM DEX で処理し、経時的に細胞を回収して Annexin V-PE 染色後、フローサイトメトリーを行った。Nalm-6 (*FKBP5*^{+/+}) では、Annexin V 陽性アポトーシス細胞は DEX 処理後 24 時間から増加し始め、48 時間では 52.9%±2.1 であったのに対し、*FKBP5*^{-/-} では 48 時間で 83.8%±1.5 であった (図 2. D)。*FKBP5*^{+/+} に比べて *FKBP5*^{-/-} で GC

感受性が上昇したという結果は予想外であったが、統計的に有意であり、アポトーシス誘導の程度を PI 取り込みによる死細胞の測定によって解析した結果でも同等であった (図 2. E)。

3-2. *RCANI* ノックアウトは GC 感受性を著明に抑制する

Nalm-6 細胞に p*RCANI*-Hyg を遺伝子導入し、hygromycin B で選別した結果、*RCANI* が 1 アレルノックアウトされた細胞、*RCANI*^{+Hyg} を得た (図 3. A)。さらに、*RCANI*^{+Hyg} に p*RCANI*-Puro を遺伝子導入し、puromycin で選別することで *RCANI* ノックアウト細胞、*RCANI*^{Hyg/Puro} を樹立した。*RCANI* 遺伝子座のノックアウトをサザンブロッティングで確認し (図 3. B)、タンパク質の発現が失われたことをウェスタンブロッティングで確認した (図 3. C)。樹立した細胞を用いて annexin V-PE 染色によるフローサイトメトリーを行ったところ、*FKBP5*^{-/-} とは対照的に、*RCANI*^{+Hyg} では DEX 処理 72 時間でもアポトーシス陽性細胞は 22.8%±0.7 であり、*RCANI*^{Hyg/Puro} では 0.7%±2.3 と、*RCANI*^{+/+} (同時間で 63.5%±8.3) に比べ、著明にアポトーシスが抑制されていた (図 4. A)。DEX 処理 144 時間においてもアポトーシス陽性細胞の割合はわずかに 8.6%±3.8 であった (*RCANI*^{+/+} は同時間で 71.8%±1.3、data not shown)。この結果は PI 取り込みによる死細胞解析でも確認された (図 4. B)。GC 誘導アポトーシスは GR によって媒介されるため、GR の発現量が GC 誘導アポトーシスにとって重要である (27, 28)。そのため、*RCANI*^{Hyg/Puro} における GR 発現量をウェスタンブロット法によって解析したが、*RCANI*^{+/+} と同程度の発現が認められた (図 4. C)。従って *RCANI* ノックアウトは GR 発現量に影響を与えず、*RCANI* ノックアウトによる GC 誘導アポトーシスの抑制が GR 発現量低下によるものではないことが示された。また、poly (ADP-ribose) polymerase はアポトーシス誘導によって活性化されたカスパーゼの主要な基質であり、カスパーゼの活性化によって限定分解を受けることがわかっている。*RCANI*^{+/+} では DEX 処理によって PARP の限定分解が見られたが、*RCANI*^{Hyg/Puro} では著明に抑制されていた (図 4. D)。

3-3. *RCANI* ノックアウトは GC によって誘導されるミトコンドリア膜電位低下を抑制する

アポトーシスは主に 2 つの経路によって誘導される。1 つめは *intrinsic pathway* と呼ばれるミトコンドリア依存性の経路であり、もう 1 つは *extrinsic pathway* と呼ばれるミトコンドリア非依存性で Fas などのデス受容体を介する経路である (29)。GC 誘導アポトーシスは、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) 低下を伴い、ミトコンドリア上で機能しアポトーシスを抑制するタンパク質である Bcl-2 の高発現によって細胞死と $\Delta\Psi_m$ 低下が完全に抑制されることから、*intrinsic pathway* を用いて実行されると考えられる (30, 31)。そこで、*RCANI* ノックアウト細胞において $\Delta\Psi_m$ 低下が抑制されているかを解析した。*RCANI*^{+/+} は DEX 処理後 24 時間から $\Delta\Psi_m$ 低下が認められ、72 時間では 68.8%±0.8 の細胞において $\Delta\Psi_m$ 低下が認められた (図 4. E)。それに対し、*RCANI*^{Hyg/Puro} では同時間で $\Delta\Psi_m$ 低下が見られた細胞は 5.2%±5.4 であり、*RCANI* ノックアウトによって $\Delta\Psi_m$ 低下が抑制されることが確認された。この結果は *RCANI* がミトコンドリアよりも上流で機能していることを示唆している。

3-4. *RCANI* ノックアウトは GC による細胞周期停止には影響しない

GC は一部のリンパ球細胞にアポトーシスを誘導するとともに細胞周期の停止を誘導することが知られている (32)。そのため、*RCANI* ノックアウトが細胞周期に与える影響を解析した。PI 染色により細胞あたりの DNA 含有量をフローサイトメトリーで解析した。その結果、annexin V による解析と一致して、DEX 処理によって *RCANI*^{+/+} ではアポトーシス細胞を示す sub G₀/G₁ 期の細胞の割合が増加しており、*RCANI*^{Hyg/Puro} では増加が認められなかった (図 5. A)。それに対し、*RCANI*^{+/+}、*RCANI*^{Hyg/Puro} ともに S 期および G₂/M 期の細胞の割合は著明に減少し、それに伴って G₀/G₁ 期の割合が増加した。このことは *RCANI* ノックアウトが GC によるアポトーシスを抑制するのに対し、GC によって誘起される細胞周期停止には影響を与えないことを示している。

3-5. *RCAN1* ノックアウトは TRAIL および放射線照射によって誘導されるアポトーシスを抑制しない

次に *RCAN1* ノックアウト細胞で認められたアポトーシス抑制が GC 誘導アポトーシスに特異的なものかを解析するために、TRAIL 処理および γ 線照射によって誘導されるアポトーシスを解析した。TRAIL はデス受容体の一つである TRAIL 受容体のリガンドであり、代表的な extrinsic pathway 活性化刺激である。 γ 線による DNA 損傷誘導アポトーシスは intrinsic pathway を介しているが、p53 欠損マウス由来胸腺細胞が γ 線照射に著明な抵抗性を示すのに対し、GC 誘導アポトーシスに対しては野生型マウス由来胸腺細胞と同様に感受性があることから、GC 誘導アポトーシスとは一部は別経路を介すると考えられている (33)。TRAIL によるアポトーシスは *RCAN1*^{+/+} と *RCAN1*^{Hyg/Puro} で同程度に誘導され (図 5. B)、 γ 線照射によるアポトーシスは *RCAN1*^{Hyg/Puro} において部分的に抑制された (図 5. C)。これらの結果から、*RCAN1* ノックアウトは、他のミトコンドリア依存性アポトーシスには一部影響する可能性があるが、ミトコンドリア非依存性の extrinsic pathway を介するアポトーシスには影響を与えないことが示された。

3-6. *RCAN1* 過剰発現は GC 誘導アポトーシスを促進する

RCAN1 が GC 誘導アポトーシスでメディエーターとして機能しているならば、その過剰発現はノックアウトとは逆にアポトーシスを促進すると予想される。そこで、Nalm-6 にヘマグルチニン (HA) 標識 *RCAN1* 発現ベクターを構成的に遺伝子導入した *RCAN1* 過剰発現細胞 3 クローンを作製し、得られたクローンにおいて GR の発現量に変化がないことを確認した (図 6. A)。これらのクローンを用いて GC 誘導アポトーシスを解析したところ、作製した 3 クローンすべてでアポトーシスが促進され、GC 感受性が上昇していた (図 6. B)。これらの結果は *RCAN1* が GC 誘導アポトーシスのメディエーターであることを更に支持するものである。

3-7. *RCAN1* ノックアウトは Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量を変化させる

RCAN1 ノックアウトにより GC による $\Delta\Psi_m$ 低下が抑制されたことから、ミトコンドリア依存性アポトーシスを制御する Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量を解析した (図 7)。*RCAN1*^{+/+} では DEX 処理によってアポトーシスに促進的に働く Bax、Bak、Bim の発現量が増加した (図 7. A-C)。これらの変化は、一部が統計的に有意でないものの、*RCAN1*^{Hyg/Puro} では抑制されていた。逆にアポトーシスに抑制的に働く Bcl-2 と Bcl-xL の発現量は *RCAN1*^{Hyg/Puro} において最大で 2 倍程度誘導が見られた (図 7. D, E)。これらのタンパク質の発現上昇が、転写レベルで生じているかを解析するために、定量的 RT-PCR による解析を行った。*RCAN1*^{+/+} における *BIM* mRNA 発現と *RCAN1*^{Hyg/Puro} における *BCL-xL* mRNA 発現は DEX 処理による誘導が見られたものの (図 8. C, E)、他の Bcl-2 ファミリー遺伝子、*BAX*、*BAK*、*BCL2* では mRNA 発現量に変化は認められず (図 8. A, B, D)、これらのタンパク質量は転写後に調節されていることが示唆された。以上のことから、GC 処理した *RCAN1*^{Hyg/Puro} における $\Delta\Psi_m$ 低下の抑制は Bcl-2 ファミリータンパク質発現量の変化によって説明できると考えられた。

3-8. DEX によるアポトーシス誘導では CREB が活性化される

cAMP response element-binding protein (CREB) はよく知られた転写因子であり、cAMP に応答し、cAMP 依存性プロテインキナーゼもしくは Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼによる Ser133 残基のリン酸化を介して活性化され、cAMP response element (CRE) への結合を介して *NR2A*、*AREG*、*CREM*、*CFOS* などの標的遺伝子の転写を制御する (34-38)。ヒト前駆 B 細胞を cAMP で処理すると、また、ヒト羊膜細胞、CHO 細胞に CREB を過剰発現させると、アポトーシスが誘導されることが報告されている (39, 40)。最近、副腎髄質褐色細胞腫由来細胞株 PC12 細胞に *RCAN1* タンパク質を過剰発現させると、アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリン処理によって誘導される CREB のリン酸化が亢進されることが報告された (41)。そこで、DEX 処理した *RCAN1*^{Hyg/Puro} における CREB 経路の活性化について解析した。*RCAN1*^{+/+} では DEX 処理によって CREB Ser133 残基のリン酸化が誘導されたが、*RCAN1*^{Hyg/Puro} ではそれが

一部阻害された (図 9. A)。これと一致して、*RCAN1*^{+/+} では CREB 標的遺伝子、*AREG*、*CREM* および *CFOS* の転写が上昇したが、*RCAN1*^{Hyg/Puro} では上昇が見られなかった (図 9. B)。これらの結果は DEX 処理による *RCAN1* の発現誘導に続いて CREB の活性化が起こることを示している。そこで、フォルスコリン存在下で DEX 処理を行い、CREB のリン酸化と活性化が促進された状況下でアポトーシス誘導が促進されるかどうかを解析した。フォルスコリン単独で細胞を処理すると、*RCAN1*^{+/+}、*RCAN1*^{Hyg/Puro} ともにアポトーシスが同程度誘導された。さらに、フォルスコリン存在下で DEX 処理を行うと、フォルスコリン単独処理あるいは DEX 単独処理に比べ、*RCAN1*^{+/+}、*RCAN1*^{Hyg/Puro}、どちらの細胞でもアポトーシス誘導がより促進された (図 9. C)。これらの結果から、GC 誘導アポトーシスは *RCAN1* 発現上昇に続いて CREB リン酸化を介していることが示された。ラット PC12 細胞では CREB リン酸化は *RCAN1* 過剰発現によって亢進され、FK506 および cyclosporine A (CsA) 処理によるカルシニューリン抑制によっても亢進される (41)。また、T 細胞ハイブリドーマ BOG8 では、FK506 処理によって GC 誘導アポトーシスが促進される (20)。そこで、*RCAN1*^{+/+}、*RCAN1*^{Hyg/Puro} における GC 誘導アポトーシスを FK506 および CsA 存在下で解析した。その結果、Nalm-6 は他の前駆 B リンパ球性白血病細胞株と同様にカルシニューリンを発現しているものの (図 10. A)、FK506 または CsA、あるいはその両方の存在下、非存在下に関わらず、*RCAN1*^{+/+}、*RCAN1*^{Hyg/Puro} ともにアポトーシス誘導の程度に変化が認められなかった (図 10. B)。このことから、少なくとも Nalm-6 では、カルシニューリン非依存的に CG によるアポトーシスが誘導されていることが示された。

4. 考察

GC 感受性細胞株 Nalm-6 において遺伝子ターゲティング法で機能的な *RCAN1* 遺伝子座を破壊した本研究の結果は、*RCAN1* が白血病細胞における GC 誘導アポトーシスの重要なメディエーターであることを明らかにした。本研究により明らかとなった GC 誘導アポトーシスの機序とその考察を図 11 にまとめて示した。

本研究では遺伝子ターゲティング法を用いて *FKBP5* および *RCAN1* をノックアウトしたヒト前駆 B リンパ球性白血病細胞株 Nalm-6 を作製し、これらを用いて GC によるアポトーシス誘導機序の解明を試みた。親株である Nalm-6 (*FKBP5*^{+/+}) を DEX 処理すると 72 時間で 73.8%±2.4 がアポトーシス陽性となったのに対し、*FKBP5*^{-/-} は 89.0%±3.8 であり、DEX 感受性はむしろ軽度に上昇していた。*FKBP5* によってコードされる FKBP51 はカルシニューリンの活性を抑制する機能以外に、Hsp90、p23 とともに GR と複合体を形成し GR の核移行を抑制する機能を持つことが報告されている (42, 43)。*FKBP5* ノックアウトにより DEX に対する感受性が増加したことは予期しなかった結果であるが、FKBP51 の非存在下で、GR が効率よく核に移行した結果と考えられる。

FKBP5 とは対照的に、*RCAN1* 遺伝子座の破壊は DEX 感受性を著明に低下させた。更に GC 誘導アポトーシスにおいて、CREB が *RCAN1* 依存的にリン酸化されることが本研究により示され、これはラット PC12 細胞において *RCAN1* が CREB リン酸化を促進させるという報告と一致する (41)。ラット PC12 細胞では *RCAN1* 発現による CREB リン酸化は *RCAN1* によるカルシニューリン抑制に依存して生じる。しかしながら、Nalm-6 はカルシニューリンを発現しているものの、カルシニューリン阻害剤である FK506 あるいは cyclosporine A (CsA) で処理してもアポトーシスが誘導されず、また、FK506、CsA 存在下での DEX 処理によるアポトーシス誘導も促進されなかった。それゆえ、*RCAN1* 発現による CREB 活性化におけるカルシニューリン依存性は細胞の種類により異なり、Nalm-6 において *RCAN1* は他の分子、あるいは他のシグナル伝達系とのクロストークを通じて、CREB のリン酸化および活性化を誘導していると思われる。

さらに本研究によって、*RCAN1* 遺伝子座の破壊によって Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量が変化することが示された。DEX 感受性のヒト急性 T リンパ球性白血病由来細胞株である CEM-C7-14 において、DEX 処理により *RCAN1-1* および *BIM* が発現誘導され、CEM-C7-14 の DEX 抵抗性サブクローンである CEM-C1-15 では誘導されないことが報告されている (44, 45)。*BIM* 遺伝子のプロモーター領域には完全な cAMP response element (CRE) は存在しないものの、4 カ所の不完全な CRE が存在することが報告されている (46)。また、ヒト急性骨髄性白血病細胞株 IPC-81

を cycloheximide 存在下で protein kinase A (PKA) 特異的活性化剤 N⁶-MB-cAMP で処理すると *BIM* の転写が上昇することから、*BIM* は CREB の直接の標的遺伝子であることが示唆される (47)。Nalm-6 で DEX 処理により *BIM* の発現誘導が見られたのに対し、*RCAN1* ノックアウト細胞では *BCL-xL* の発現が誘導され、この発現誘導は Nalm-6 では見られなかった。*RCAN1* はカルシニューリン非依存的な機構によって I κ B α タンパク質の安定性を上昇させ、*cyclooxygenase-2* などの NF- κ B 標的遺伝子の発現を減少させることが報告されている (21)。*BCL-xL* は NF- κ B の標的遺伝子の一つであることから (48)、*RCAN1* ノックアウト細胞における *BCL-xL* 発現誘導には上記の機構が関与しているかもしれない。いくつかの Bcl-2 ファミリータンパク質では mRNA レベルでの発現誘導が見られず、転写後調節によって発現が制御されていることが示唆された。少なくとも Bcl-2 に関しては、乳がん由来細胞株を用いた研究から、Bcl-2 が PKA によってリン酸化され、その後プロテアソームによる分解を受けることが報告されており (49)、本研究でタンパク質レベルでの発現上昇が見られた Bax、Bak といった他の Bcl-2 ファミリータンパク質に関しても同様の機構によって転写後レベルで発現調節が行われている可能性がある。いずれにせよ、本研究によって示された Bcl-2 ファミリータンパク質発現量の変化は、*RCAN1* ノックアウト細胞において GC による $\Delta\Psi$ m 低下が抑制された結果と一致し、CG 誘導アポトーシスにおいて intrinsic pathway が Bcl-2 ファミリータンパク質によって制御されていることを示している。

ラット神経細胞の組織培養およびヒト T リンパ球性白血病細胞株を用いて GC 感受性と *RCAN1* 発現の相関を示した報告がなされた (44, 50) が、これらは本研究結果を支持するものである。

5. 総括と今後の展望

本研究によって、Nalm-6 細胞において *RCAN1* 遺伝子をノックアウトした結果、DEX 感受性が著明に低下することが示されるとともに、GC 処理による *RCAN1* 発現誘導に伴って CREB のリン酸化が生じることが示された。本研究は白血病や悪性リンパ腫の治療に用いられる GC の薬効機序の一部を明らかにした意義のある研究である。Nalm-6 を用いて他のシグナル伝達系の活性化に

ついて解析したところ、少なくとも GSK-3 β および Akt のリン酸化が認められ (data not shown)、CREB 以外に他のシグナル伝達系とのクロストークによって GC 誘導アポトーシスが実行されている可能性を示唆している。これらの現象が他の GC 感受性細胞株でも生じているのかを解析する必要があるが、血球細胞は遺伝子導入効率に乏しく、また、細胞レベルでの遺伝子ターゲティングによる遺伝子破壊が容易ではないことから、複数細胞株を用いた解析が困難である。しかしながら最近になって、細菌の獲得免疫システムを利用して細胞内で目的ゲノム DNA 配列の切断を可能とする技術が登場し注目を集めている。そこで、このシステムを使用して、Nalm-6 以外の細胞株を用いて *RCANI* 遺伝子をノックアウトし、DEX 感受性に与える影響を解析することを検討している。

6. 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御指導賜りました、本学分子遺伝学宮下俊之教授に厚く御礼申し上げます。

7. 引用文献

1. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002; **9**:6-19.
2. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2003; **17**: 17-25.
3. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 1997; **18**: 306-60.
4. Simons SS, Jr., Sistare FD, Chakraborti PK. Steroid binding activity is retained in a 16-kDa fragment of the steroid binding domain of rat glucocorticoid receptors. *J Biol Chem.* 1989; **264**: 14493-7.
5. Necela BM, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc.* 2004; **1**: 239-46.
6. Newton R, Holden NS. Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol Pharmacol.* 2007; **72**: 799-809.

7. Riccardi C, Cifone MG, Migliorati G. Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GITR and GILZ, two dexamethasone-induced genes. *Cell Death Differ.* 1999; **6**: 1182-9.
8. Rogatsky I, Ivashkiv LB. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens.* 2006; **68**: 1-12.
9. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 1998; **93**: 531-41.
10. Yoshida NL, Miyashita T, U M, Yamada M, Reed JC, Sugita Y, et al. Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **293**: 1254-61.
11. Baughman G, Wiederrecht GJ, Campbell NF, Martin MM, Bourgeois S. FKBP51, a novel T-cell-specific immunophilin capable of calcineurin inhibition. *Mol Cell Biol.* 1995; **15**: 4395-402.
12. Davies TH, Ning YM, Sanchez ER. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 4597-600.
13. Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X. Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the *DSCR1* (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics.* 1997; **44**: 358-61.
14. Poppek D, Keck S, Ermak G, Jung T, Stolzing A, Ullrich O, et al. Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of *RCAN1* and oxidative stress. *Biochem J.* 2006; **400**: 511-20.
15. Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, et al. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res.* 2000; **87**: E61-8.
16. U M, Shen L, Oshida T, Miyauchi J, Yamada M, Miyashita T. Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia.* 2004; **18**: 1850-6.
17. Martinez-Martinez S, Genesca L, Rodriguez A, Raya A, Salichs E, Were F, et al. The RCAN carboxyl end mediates calcineurin docking-dependent inhibition via a site that dictates binding to substrates and regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; **106**: 6117-22.
18. Seo SR, Kim SS, Chung KC. Activation of adenylate cyclase by forskolin increases the protein stability of RCAN1 (DSCR1 or Adapt78). *FEBS Lett.* 2009; **583**: 3140-4.
19. Liu Q, Busby JC, Molkenin JD. Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point. *Nat Cell Biol.* 2009; **11**: 154-61.
20. Zhao Y, Tozawa Y, Iseki R, Mukai M, Iwata M. Calcineurin activation protects T cells from glucocorticoid-induced apoptosis. *J Immunol.* 1995; **154**: 6346-54.

21. Kim YS, Cho KO, Lee HJ, Kim SY, Sato Y, Cho YJ. Down syndrome candidate region 1 increases the stability of the I κ B α protein: implications for its anti-inflammatory effects. *J Biol Chem.* 2006; **281**: 39051-61.
22. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003; **21**: 635-7.
23. Adachi N, So S, Iizumi S, Nomura Y, Murai K, Yamakawa C, et al. The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA Cell Biol.* 2006; **25**: 19-24.
24. Luo Y, Hara H, Haruta Y, Seon BK. Establishment of ascitic tumor of human pre-B acute lymphoblastic leukemia in nonconditioned nude mice. *Cancer Res.* 1989; **49**: 706-10.
25. Iizumi S, Nomura Y, So S, Uegaki K, Aoki K, Shibahara K, et al. Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. *Biotechniques.* 2006; **41**: 311-6.
26. Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1996; **56**: 2422-7.
27. Pazirandeh A, Xue Y, Prestegard T, Jondal M, Okret S. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. *FASEB J.* 2002; **16**: 727-9.
28. Reichardt HM, Umland T, Bauer A, Kretz O, Schutz G. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol Cell Biol.* 2000; **20**: 9009-17.
29. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays.* 2003; **25**: 888-96.
30. Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvesen GS, Reed JC, Inoue T, et al. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* 1998; **5**: 1034-41.
31. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood.* 1993; **81**: 151-7.
32. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998; **60**: 601-17.
33. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature.* 1993; **362**: 849-52.
34. Boutillier AL, Barthel F, Roberts JL, Loeffler JP. β -adrenergic stimulation of cFOS via protein kinase A is mediated by cAMP regulatory element binding protein (CREB)-

- dependent and tissue-specific CREB-independent mechanisms in corticotrope cells. *J Biol Chem.* 1992; **267**: 23520-6.
35. Conkright MD, Guzman E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, Montminy M. Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol Cell.* 2003; **11**: 1101-8.
 36. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* 1991; **252**: 1427-30.
 37. Xie H, Rothstein TL. Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J Immunol.* 1995; **154**: 1717-23.
 38. Xu W, Kasper LH, Lerach S, Jeevan T, Brindle PK. Individual CREB-target genes dictate usage of distinct cAMP-responsive coactivation mechanisms. *EMBO J.* 2007; **26**: 2890-903.
 39. Myklebust JH, Josefsen D, Blomhoff HK, Levy FO, Naderi S, Reed JC, et al. Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. *J Cell Physiol.* 1999; **180**: 71-80.
 40. Saeki K, Yuo A, Suzuki E, Yazaki Y, Takaku F. Aberrant expression of cAMP-response-element-binding protein ('CREB') induces apoptosis. *Biochem J.* 1999; **343 Pt 1**: 249-55.
 41. Kim SS, Seo SR. The regulator of calcineurin 1 (RCAN1/DSCR1) activates the cAMP response element-binding protein (CREB) pathway. *J Biol Chem.* 2011; **286**: 37841-8.
 42. Tatro ET, Everall IP, Kaul M, Achim CL. Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. *Brain Res.* 2009; **1286**: 1-12.
 43. Wochnik GM, Ruegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 4609-16.
 44. Hirakawa Y, Nary LJ, Medh RD. Glucocorticoid evoked upregulation of RCAN1-1 in human leukemic CEM cells susceptible to apoptosis. *J Mol Signal.* 2009 ;**4**: 6.
 45. Zhao YN, Guo X, Ma ZG, Gu L, Ge J, Li Q. Pro-apoptotic protein BIM in apoptosis of glucocorticoid-sensitive and -resistant acute lymphoblastic leukemia CEM cells. *Med Oncol.* 2011; **28**: 1609-17.
 46. Zhang L, Insel PA. The pro-apoptotic protein Bim is a convergence point for cAMP/protein kinase A- and glucocorticoid-promoted apoptosis of lymphoid cells. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 20858-65.
 47. Huseby S, Gausdal G, Keen TJ, Kjaerland E, Krakstad C, Myhren L, et al. Cyclic AMP induces IPC leukemia cell apoptosis via CRE- and CDK-dependent Bim transcription. *Cell Death Dis.* 2011; **2**: e237.

48. Khoshnan A, Tindell C, Laux I, Bae D, Bennett B, Nel AE. The NF- κ B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4⁺ lymphocytes. *J Immunol.* 2000; **165**: 1743-54.
49. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1998; **18**: 3509-17.
50. Sun X, Wu Y, Chen B, Zhang Z, Zhou W, Tong Y, et al. Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) facilitates neuronal apoptosis through caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 2011; **286**: 9049-62.

8. 図表説明文

図 1. ターゲティングベクター構築とノックアウト細胞スクリーニングの模式図

(A) *attP* との組換えに必要な *attB* 配列を付加したプライマーを用いて Nalm-6 から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、5'-arm、3'-arm を調製した。(B) PCR 産物を entry clone vector との間で組換え反応を行い、5'-arm entry clone、3'-arm entry clone を作製した。(C) 5'-arm entry clone、3'-arm entry clone、pENTR-lox-Hyg または pENTR-lox-Puro、pDEST DTA-MLS との間で組換え反応を行い、遺伝子ターゲティングベクター pFKBP5-Hyg、pRCAN1-Hyg、pRCAN1-Puro を作製した。(D) 遺伝子ターゲティングベクターを遺伝子導入後、抗生物質 (hygromycin もしくは puromycin) によるスクリーニングを行い、得られた抗生物質耐性クローン細胞からゲノム DNA を抽出した。これを鋳型として図に示したプライマーの組み合わせで PCR を行い、5'-arm と 3'-arm で正しく相同的組換えが生じたクローンをスクリーニングした。

図 2. 遺伝子ターゲティングによる *FKBP5* 遺伝子座の破壊とアポトーシスに及ぼす影響。

(A) 標的とした *FKBP5* 遺伝子座とターゲティングベクターの模式図。ヒト *FKBP5* 遺伝子のエクソン 3 をターゲティングにより *hyg^r* に置換した (targeted locus)。その後、Cre リコンビナーゼ発現ベクターを遺伝子導入することによって *hyg^r* を除いた ((-) locus)。(B) サザンブロットによる *FKBP5* ノックアウトの確認。NheI 消化したゲノム DNA を解析した。サザンブロットに使用したプローブの位置を (A) に示した。(C) ウェスタンブロットによる *FKBP51* 発現の解析。*FKBP5^{+/+}*、*FKBP5^{+/-}*、*FKBP5^{-/-}* を 10^{-6} M DEX で図に示した時間処理後、細胞溶解液を調製し、抗 *FKBP51* 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。(D, E) DEX 処理による細胞死の解析。Nalm-6、*FKBP5^{+/+}*、*FKBP5^{-/-}* を 10^{-6} M DEX で処理し annexin V-PE 染色後 (D) あるいは 40 μ g/ml PI 添加後 (E)、フローサイトメトリーによって解析した。(D, E) エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。* は *FKBP5^{+/+}* に対して有意差のある値を示す ($p<0.01$)。

図 3. 遺伝子ターゲティングによる *RCAN1* 遺伝子座の破壊。

(A) 標的とした *RCAN1* 遺伝子座とターゲティングベクターの模式図。ターゲティングにより *RCAN1* のエクソン 6 を *hyg^r* または *puro^r* に置換した。(B) サザンブロットによる *RCAN1* ノックアウトの確認。HindIII 消化したゲノム DNA を解析した。サザンブロットに使用したプローブの位置を (A) に示した。(C) ウェスタンブロットによる *RCAN1* 発現の解析。*RCAN1^{+/+}*、*RCAN1^{+Hyg}*、*RCAN1^{Hyg/Puro}* を 10^{-6} M DEX で図に示した時間処理後、細胞溶解液を調製し、抗 *RCAN1* 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。

図 4. *RCAN1* 遺伝子座破壊は GC 誘導アポトーシスを抑制した。

(A) DEX 処理によるアポトーシス誘導。*RCAN1^{+/+}*、*RCAN1^{+Hyg}*、*RCAN1^{Hyg/Puro}* を 10^{-6} M DEX で図に示した時間処理し、アポトーシス陽性細胞の割合を annexin V-PE 染色を用いたフローサイトメトリーによって解析した。M1 でゲートした細胞集団をアポトーシス細胞として下のグラフに示した。(B) *RCAN1^{+/+}*、*RCAN1^{+Hyg}*、*RCAN1^{Hyg/Puro}* を 10^{-6} M DEX で処理し、40 μ g/ml PI を添加後、PI で染色された死細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。(C) ウェスタンブロットによる GR の発現確認。図に示した時間 10^{-6} M DEX 処理した細胞から細胞溶解液を調製し、抗 GR 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。(D) PARP の切断。図に示した時間 10^{-6} M DEX 処理した細胞から細胞溶解液を調製し、抗 PARP 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。(E) *RCAN1^{+/+}*、*RCAN1^{Hyg/Puro}* を 10^{-6} M DEX で図に示した時間処理し、DiOC₆(3) 染色後、フローサイトメトリーによる解析を行った。(A, B, E) エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。* は *RCAN1^{+/+}* に対して有意差のある値を示す ($p<0.01$)。

図 5. RCAN1 発現の細胞周期とアポトーシスに及ぼす影響。

(A) フローサイトメトリーによる DEX 処理後の細胞あたりの DNA 含有量解析。DNA 含有量のヒストグラムを上に表示した。細胞を sub G₀/G₁、G₀/G₁、S、G₂/M でゲートし、その割合を下グラフに表示した。グラフは独立した 3 回の実験結果の平均値で表されている。(B, C) 10 ng/ml TRAIL と 1 μg/ml cross linking anti-His₆ 抗体による処理 (B) または 10 Gy の線量を放射線照射した (C) *RCAN1*^{+/+}、*RCAN1*^{Hyg/Puro} を経時的に回収し、annexin V-PE 染色後、フローサイトメトリーによる解析を行った。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。* は *RCAN1*^{+/+} に対して有意差のある値を示す (p<0.05)。

図 6. RCAN1 高発現細胞は DEX 感受性が増加した。

(A) HA 標識 RCAN1 の強制発現。pHA-RCAN1 を Nalm1-6 に遺伝子導入し、G418 で選別を行った。得られた 3 クローンについて、抗 HA 抗体と抗 GR 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。(B) HA 標識 RCAN1 高発現クローンにおける DEX 誘導アポトーシス。Nalm-6 と RCAN1 高発現細胞 3 クローンを 10⁻⁶ M DEX で図に示した時間処理し、annexin V-PE 染色後フローサイトメトリーによる解析を行った。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。* は *RCAN1*^{+/+} に対して有意差のある値を示す (p<0.05)。

図 7. *RCAN1* ノックアウトは Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量を変化させた。

(A) 10⁻⁶ M DEX で処理した *RCAN1*^{+/+}、*RCAN1*^{Hyg/Puro} を経時的に回収し、調製した細胞溶解液を抗 Bax 抗体、抗 Bak 抗体、抗 Bim 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 Bcl-xL 抗体を用いてウェスタンブロットで解析した。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。(B-F) 各バンドを定量し、BAX (B)、BAK (C)、BIM (D)、Bcl-2 (E)、Bcl-xL (F) の発現量をグラフ化した。今回用いた抗体では 3 つの BIM アイソフォーム (BIME_L、BIM_L、BIM_S) が検出されるため、

各アイソフォームについて定量した。各タンパク質の発現量は α -tubulinの発現量で補正した。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。* は同処理時間における $RCANI^{+/+}$ に対して有意差のある値を示す ($p<0.05$)。

図 8. $RCANI$ ノックアウトは BIM と $Bcl-xL$ の mRNA 発現量を変化させた。

$RCANI^{+/+}$ 、 $RCANI^{Hyg/Puro}$ を 10^{-6} M DEX で図に示した時間処理し、total RNA を抽出した。これを鋳型として cDNA を合成後、定量的 RT-PCR により BAX (A)、 BAK (B)、 BIM 各アイソフォーム (C)、 $BCL2$ (D)、 $BCL-xL$ (E) の発現量を解析し、各 mRNA の発現量は $GAPDH$ の発現量で補正した。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。 (C) * は同処理時間で $RCANI^{+/+}$ における同一アイソフォームに対して有意差のある値を示す ($p<0.01$)。 (E) * は同処理時間で $RCANI^{+/+}$ に対して有意差のある値を示す ($p<0.05$)。

図 9. GC は Nalm-6 で CREB を活性化する。

(A) 10^{-6} M DEX 処理した $RCANI^{+/+}$ 、 $RCANI^{Hyg/Puro}$ から細胞溶解液を調製し、抗 CREB 抗体および抗リン酸化 CREB (Ser133) 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。(B) 10^{-6} M DEX 処理した $RCANI^{+/+}$ 、 $RCANI^{Hyg/Puro}$ から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、CREB 標的遺伝子である $AREG$ 、 $CREM$ 、 $CFOS$ に対するプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。* は同処理時間における $RCANI^{+/+}$ に対して有意差のある値を示す ($p<0.01$)。 (C) $RCANI^{+/+}$ 、 $RCANI^{Hyg/Puro}$ を $10 \mu\text{M}$ フォルスコリン (FK) で処理し、1 時間後に 10^{-6} M DEX を加えて経時的に回収し、PI 取り込みによる死細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。* は同処理時間における FK 処理を行わなかった対照に対して有意差のある値を示す ($p<0.05$)。

図 10. Nalm-6 における GC 誘導アポトーシスに対するカルシニューリン阻害剤の影響。

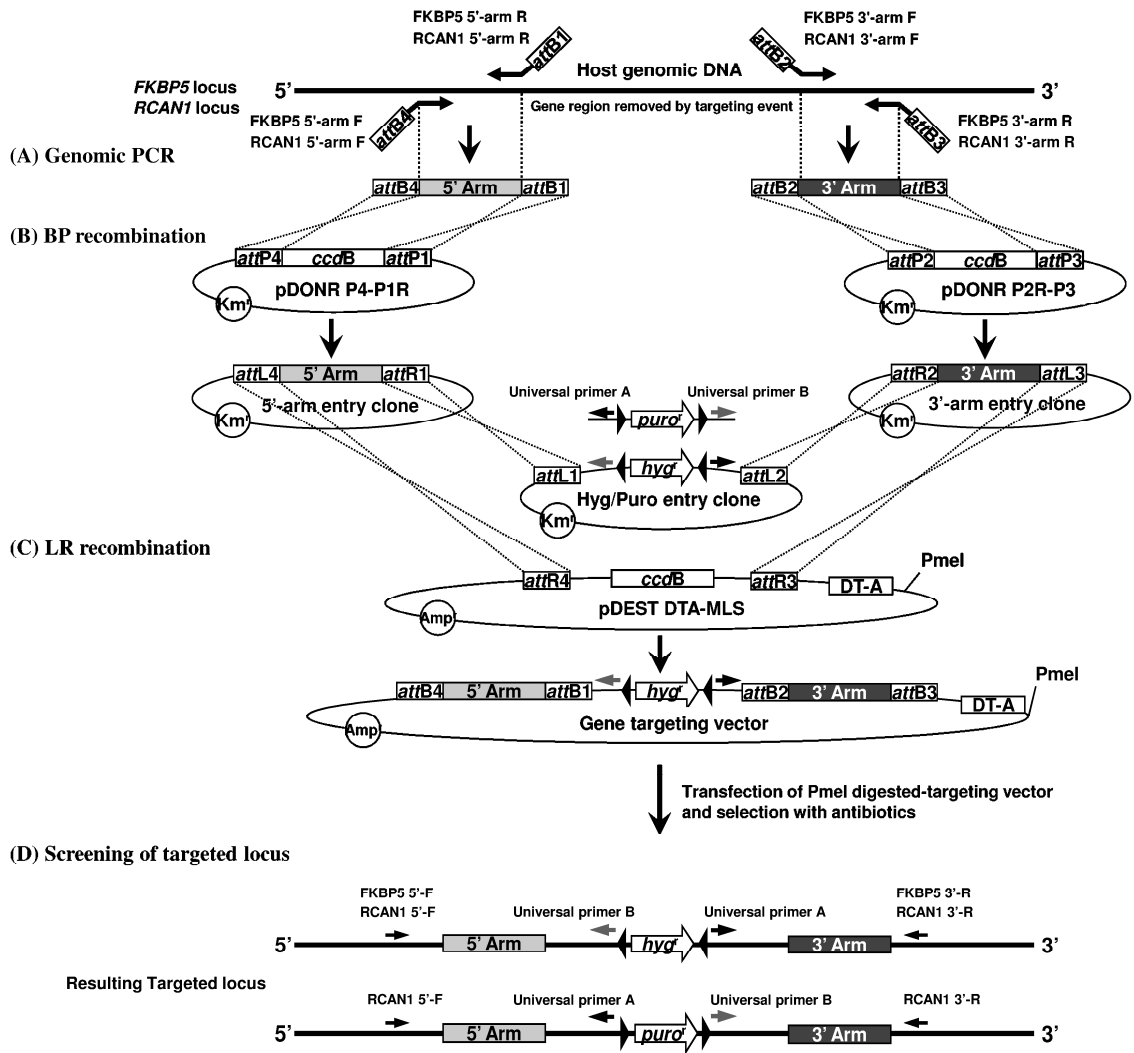
(A) ヒト T 細胞株およびヒト B 細胞株におけるカルシニューリン発現。各細胞株から抽出したタンパク質 30 μg を用いてウェスタンブロッティングを行い、抗 calcineurin 抗体で検出した。ローディングコントロールとして抗 tubulin 抗体を用いた。(B) *RCANI*^{+/+}、*RCANI*^{Hyg/Puro} を 50 ng/ml cyclosporine A (CsA) あるいは 50 nM FK506、もしくはその両方で処理し、1 時間後に 10^{-6} M DEX を加えて経時的に回収しアポトーシス陽性細胞の割合を annexin V-PE 染色を用いたフローサイトメトリーによって解析した。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。

図 11. 本研究によって示された CG 誘導アポトーシス機序の模式図

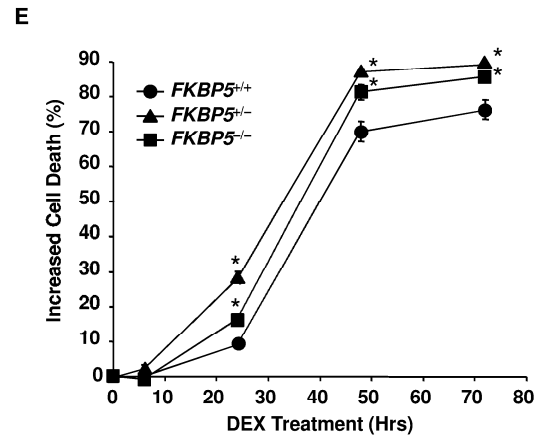
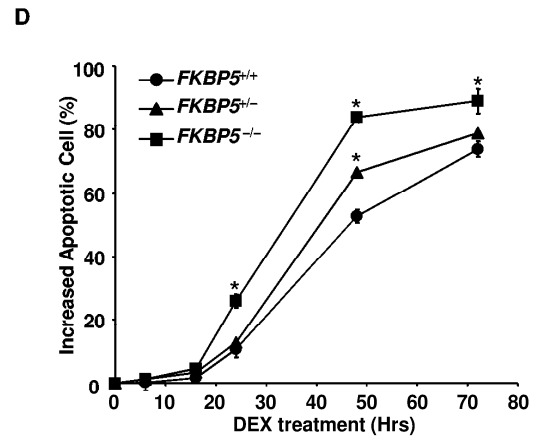
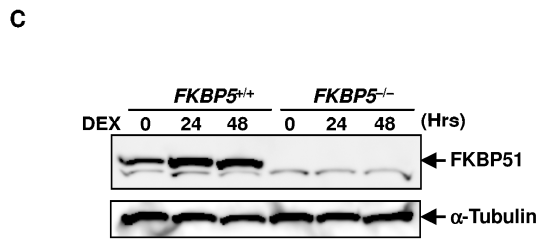
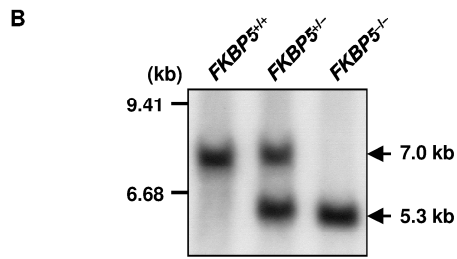
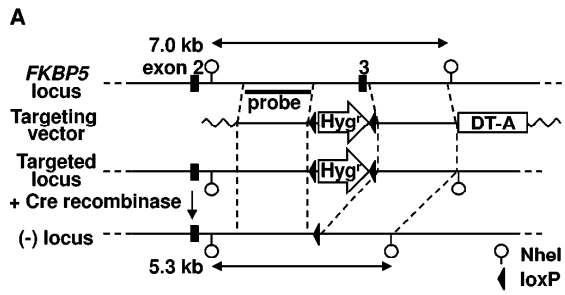
本研究によって明らかとなった箇所を四角で囲んだ。

9. 図表

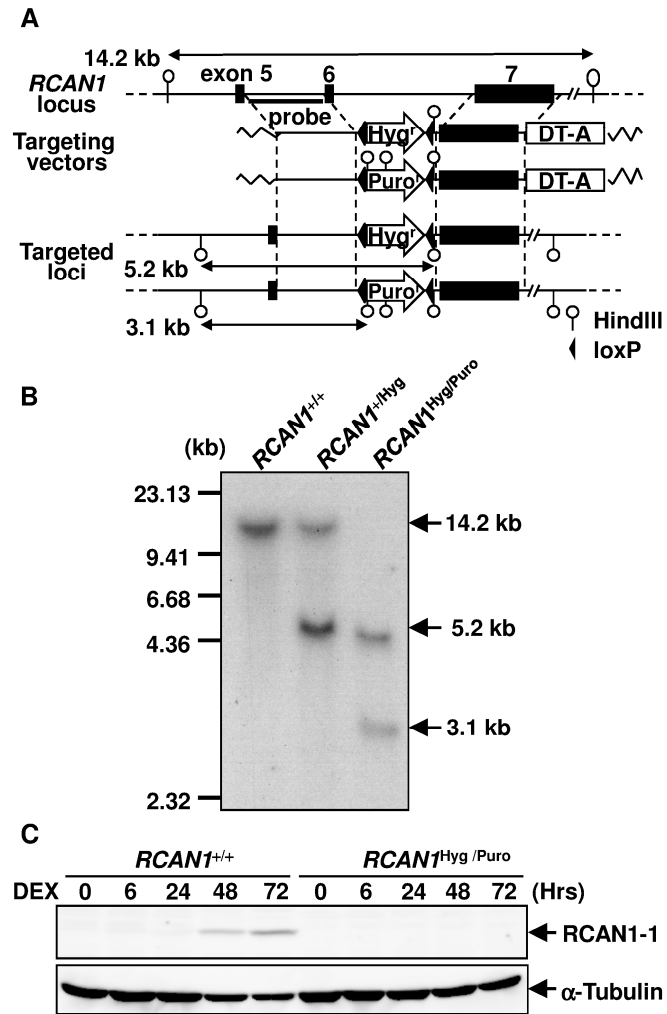
図 1.



2.

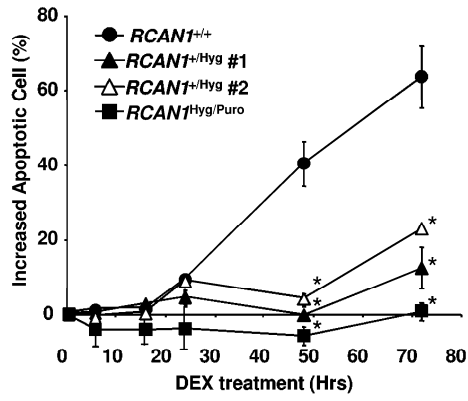
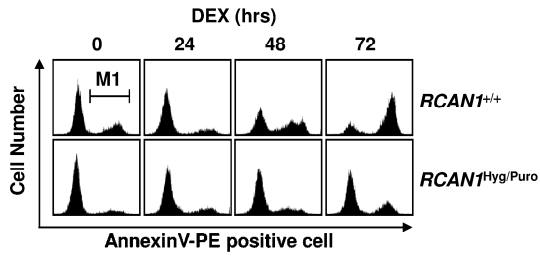


3.

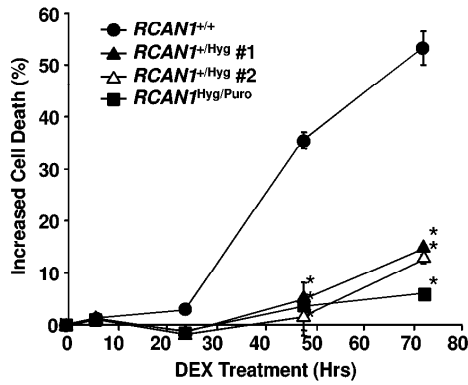


4.

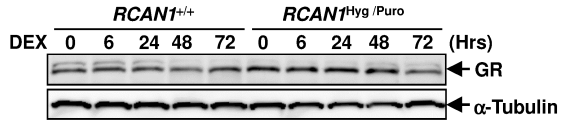
A



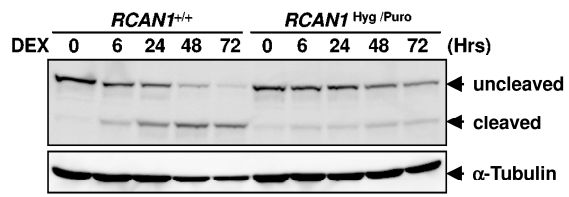
B



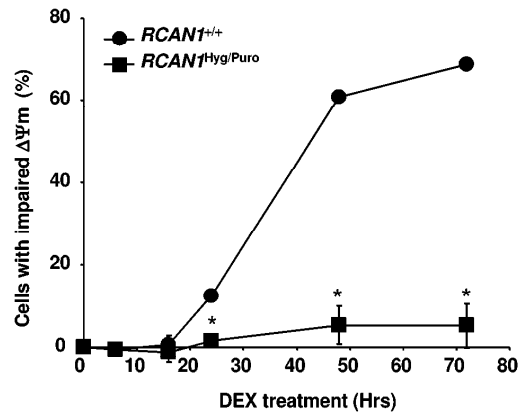
C



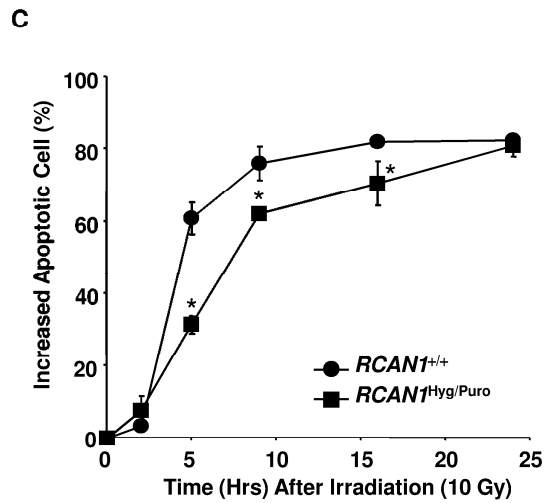
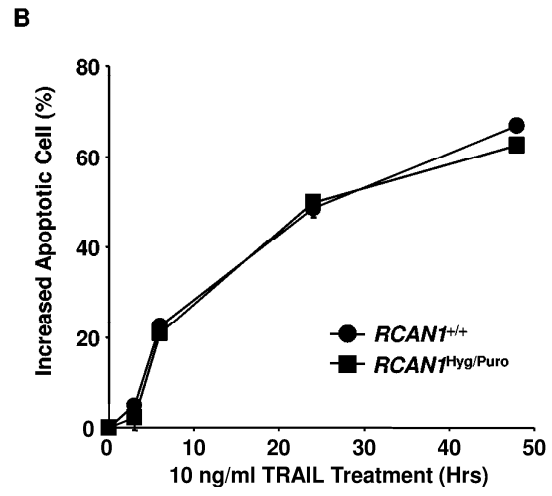
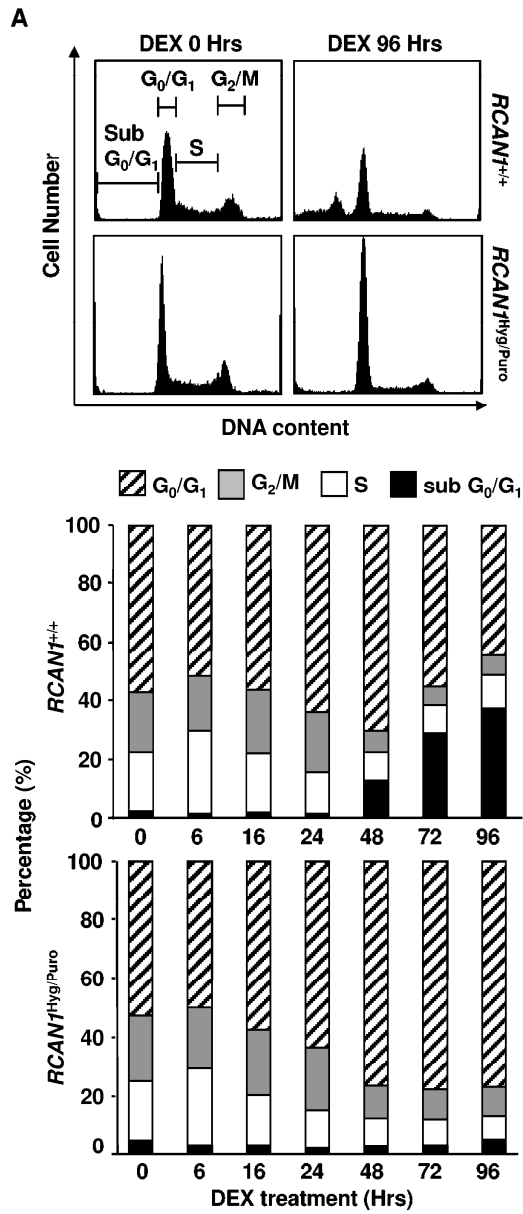
D



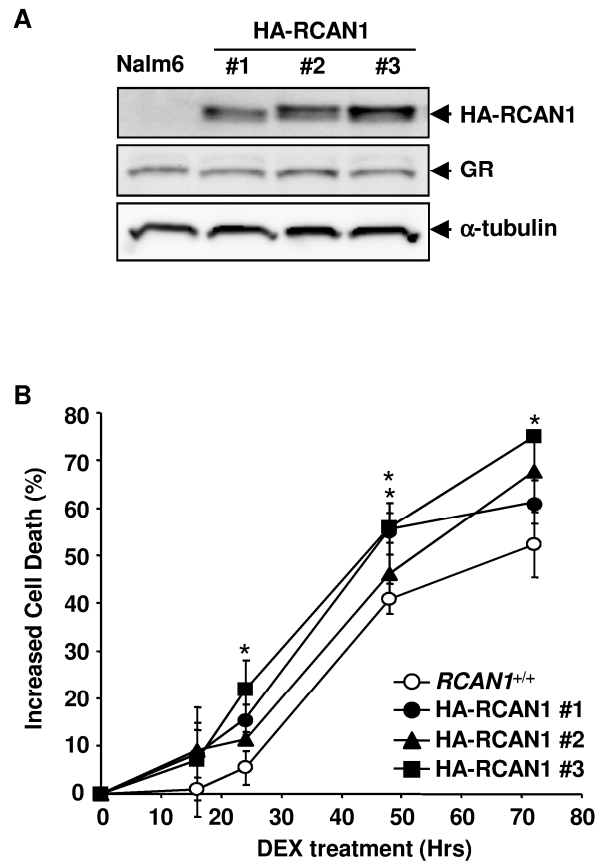
E



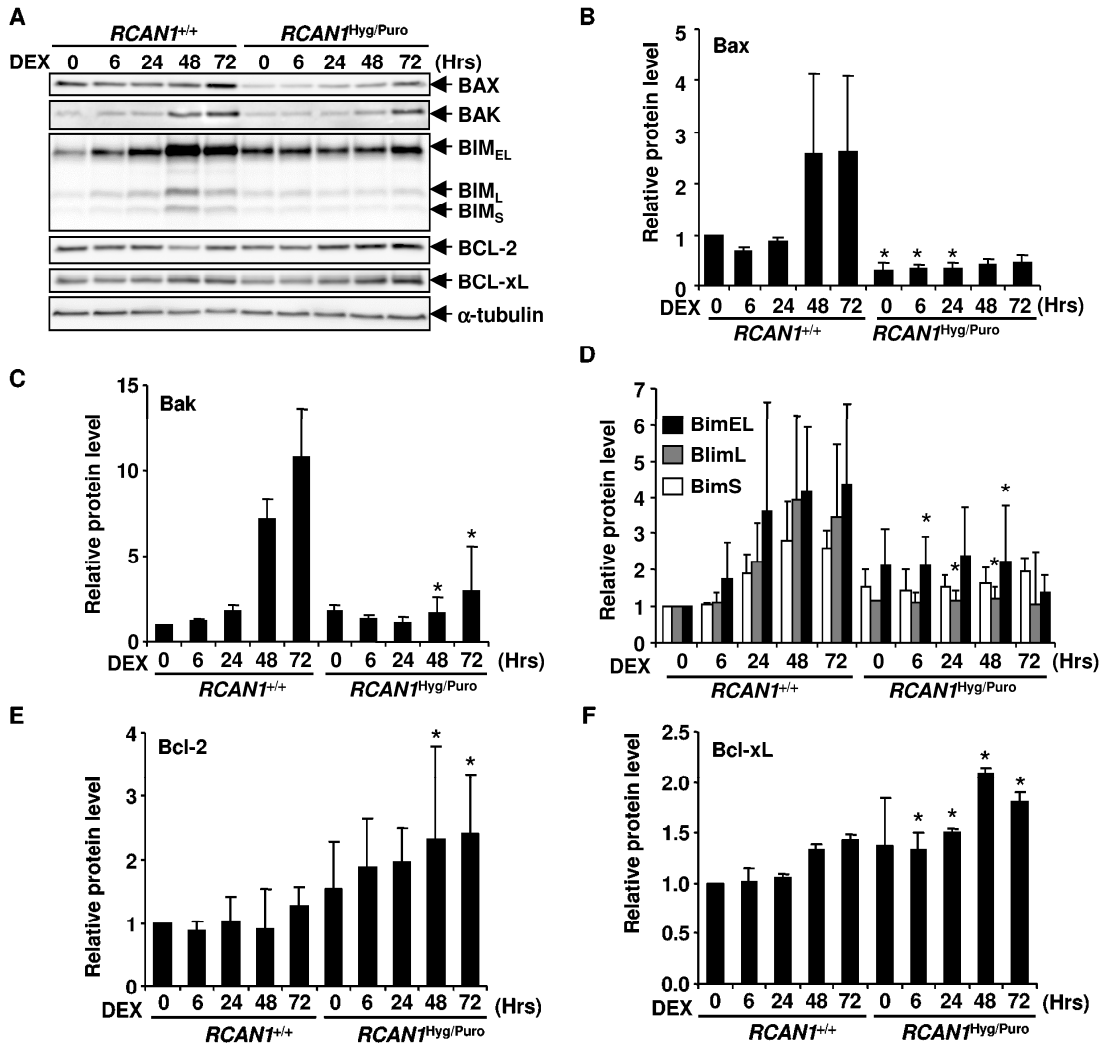
5.



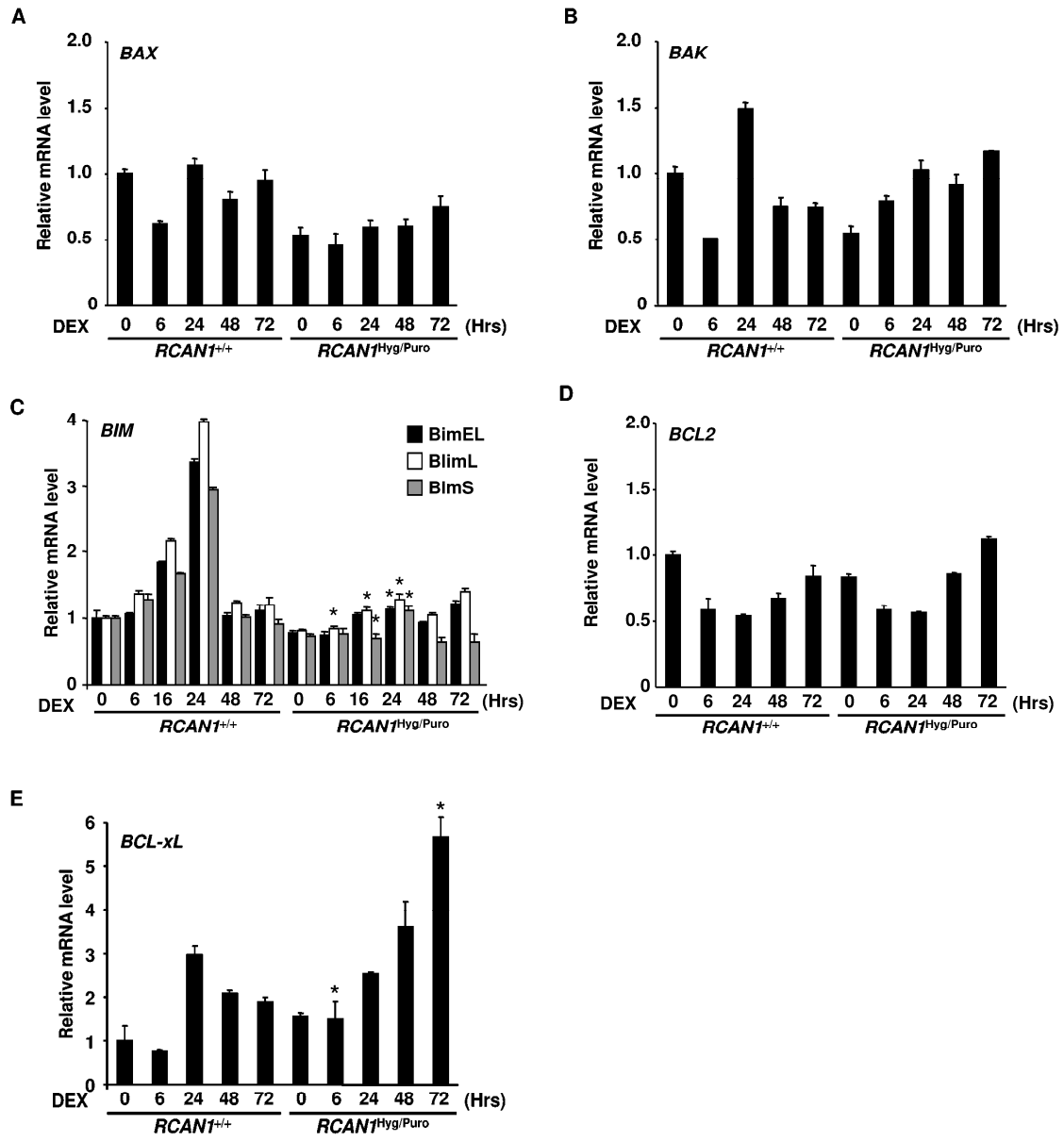
☒ 6.

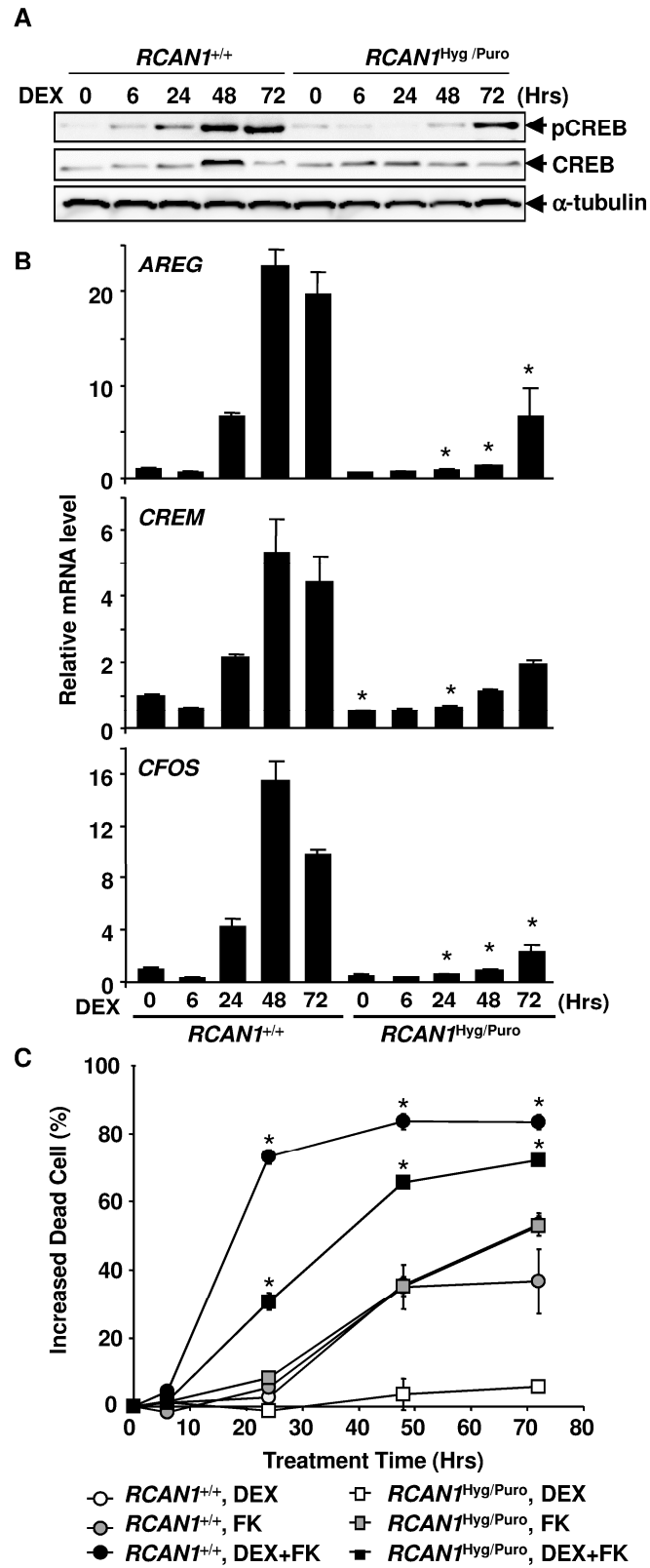


7.

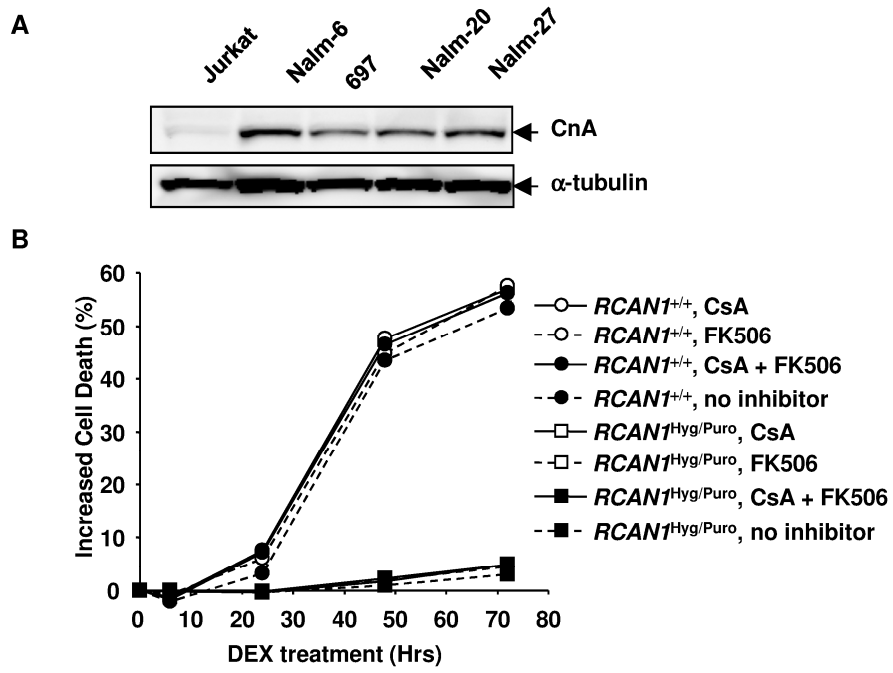


8.





☒ 10.



☒ 11.

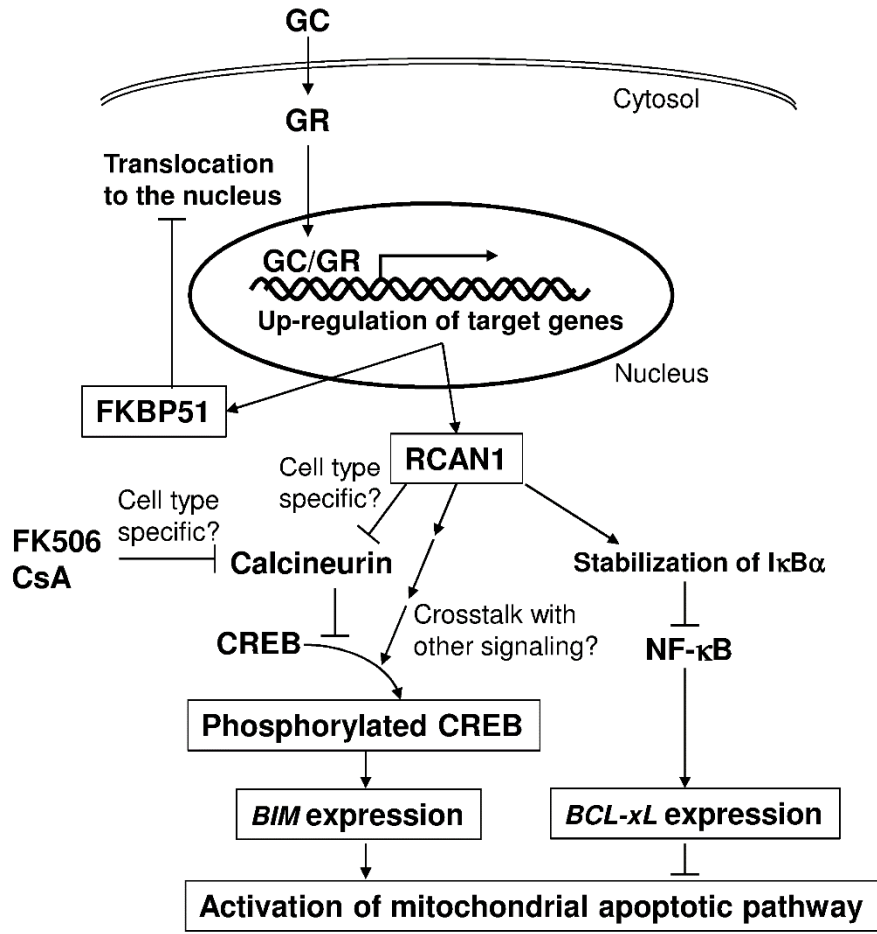


表 1. 本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマーの配列

| ターゲティングベクター構築で使用したプライマー | |
|-------------------------------------|--|
| RCAN1 5'-arm F | 5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGTTGGGTTTCATTGCTATGCATG-3' |
| RCAN1 5'-arm R | 5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGAAGCACAGGTCAGTTGTTGCCA-3' |
| RCAN1 3'-arm F | 5'-GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGACTTGTCTGAGTGACCCTGCG-3' |
| RCAN1 3'-arm R | 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCATCACAGTAGCATCTACCTGT-3' |
| FKBP5 5'-arm F | 5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGAACAGCCTTGGGCAGGTCCTC-3' |
| FKBP5 5'-arm R | 5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGCTACTGCCCTTCTAGGACTTCA-3' |
| FKBP5 3'-arm F | 5'-GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGGTAAGAGGGTATTTTTTTGAG-3' |
| FKBP5 3'-arm R | 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCGAGCCAGACATGGTGGCATGC-3' |
| 相同的組換えによるノックアウト細胞のスクリーニングで使用したプライマー | |
| universal primer A | 5'-AATAATGGTTTCTTAGACGTGCG-3' |
| universal primer B | 5'-AGGTTCACTAGTACTGGCCATTG-3' |
| RCAN1 5'-F | 5'-CGAGTCAGAATAAACTTCAG-3' |
| RCAN1 3'-R | 5'-CCAGGAAGGTCACCACCATT-3' |
| FKBP5 5'-F | 5'-CTACTGCACTGCAGTCACAG-3' |
| FKBP5 3'-R | 5'-TGGGCTATTATTCCTACAAG-3' |
| RCAN1 5'-F2 | 5'-GTTGGGTTTCATTGCTATGCATG-3' |
| RCAN1 5'-R2 | 5'-AAGCACAGGTCAGTTGTTGCCA-3' |
| FKBP5 5'-F2 | 5'-AACAGCCTTGGGCAGGTCCTC-3' |
| FKBP5 5'-R2 | 5'-CTACTGCCCTTCTAGGACTTCA-3' |
| 定量的 RT-PCR で使用したプライマー | |
| GAPDH, forward | 5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG-3' |
| GAPDH, reverse | 5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3' |
| BIM, S form, forward | 5'-GACAGAGCCACAAGCTTCCAT-3' |
| BIM, L form, forward | 5'-GACAGAGCCACAAGACAGGA-3' |
| BIM, EL form, forward | 5'-CTGCTGTCTCGATCCTCCAGT-3' |
| BIM reverse | 5'-TACCCTCCTTGCATAGTAAG-3' |
| BCL2, forward | 5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC-3' |
| BCL2, reverse | 5'-TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC-3' |
| BCL2L1, forward | 5'-GGTCGCATTGTGGCCTTT-3' |
| BCL2L1, reverse | 5'-TCCGACTCACCAATACCTGCAT-3' |
| BAX, forward | 5'-GCTGTTGGGCTGGATCCAAG-3' |
| BAX, reverse | 5'-TCAGCCCATCTTCTCCAGA-3' |
| BAK, forward | 5'-GAACAGGAGGCTGAAGGGGT-3' |
| BAK, reverse | 5'-TCAGGCCATGCTGGTAGACG-3' |
| CFOS, forward | 5'-AAAAGGAGAATCCGAAGGGAAA-3' |
| CFOS, reverse | 5'-GTCTGTCTCCGCTTGGAGTGTAT-3' |
| CREM, forward | 5'-ATGTCTGGAGAGCCGAGTTG-3' |
| CREM, reverse | 5'-GCAACTATACATGCTGCCTTCAG-3' |
| AREG, forward | 5'-GGAGTCACTGCCAAGTCATAG-3' |
| AREG, reverse | 5'-CCTTCGTGCACCTTTATATACAGA-3' |