

学 位 論 文 要 旨

氏 名 長尾 和右  印

論 文 題 目

「*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 承 認 印

宮下 俊之



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)

氏名 長尾 和右

グルココルチコイド (GC) は生体内で産生されるホルモンであり、その多様な生理活性から様々な疾患に対する治療薬としても用いられ、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となっている。GC は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よばれる細胞死を誘導することが知られており、これが抗がん剤としての作用と考えられるが、その詳細な機序には不明な点が多く残されている。GC は細胞膜を通過し、細胞質に存在する GC 受容体と結合する。その結果、受容体は核へと移行したのちゲノム上の特定の DNA 配列に結合し、その下流にある遺伝子の転写を活性化する。このように GC 受容体は転写因子として働くほか、ほかの転写因子と結合し、それらの活性化因子、抑制因子として働くことも報告されている。転写活性化能のない変異型受容体にはアポトーシス誘導能がないことから、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。最近マイクロアレイを用いて GC の標的候補遺伝子が多数報告されるようになったが、それらの中のいずれがアポトーシス誘導に関与しているかは明らかになっていない。そこで本研究では、GC 標的候補遺伝子であり、複数の論文でアポトーシスへの関与が示唆されている *FKBP5* および *RCAN1* 遺伝子に注目した。遺伝子ターゲティング法による遺伝子ノックアウトはノックアウトマウス作製時に頻繁に用いられる手法であるが、培養細胞では相同的組換えの頻度が低いため目的とするクローンがなかなか得られない。しかし、近年になってヒト B 前駆細胞由来白血病細胞株 Nalm-6 を用いると比較的容易に遺伝子ターゲティングが行えることが報告された。Nalm-6 が合成 GC であるデキサメサゾン (DEX) 処理によってアポトーシスを誘導できる細胞株であることから、本研究では Nalm-6 を用いて遺伝子ターゲティング法により *FKBP5* もしくは *RCAN1* 遺伝子のノックアウト細胞株を作製し、DEX に対する感受性を解析した。*FKBP5* ノックアウト細胞は DEX に対する感受性に有意な差が認められなかった。その一方で *RCAN1* ノックアウト細胞では顕著にアポトーシス誘導が抑制された (DEX 処理 72 時間後において野生型 $63.5 \pm 8.3\%$ vs *RCAN1* ノックアウト $0.67 \pm 2.30\%$)。また、ヘマグルチニン標識 *RCAN1* 発現ベクターを構成的に遺伝子導入した *RCAN1* 高発現 Nalm-6 は DEX 感受性が上昇していた。*RCAN1* ノックアウト細胞は DEX 処理によって G₀/G₁ 期での細胞周期停止を起こした。また放射線および TRAIL によって誘

導されるアポトーシスでは *RCAN1* ノックアウト細胞と野生型 Nalm-6 との間に有意差は認められなかった。これらの結果から、*RCAN1* は GC 誘導アポトーシスに特異的に機能する遺伝子であると考えられた。DEX 誘導アポトーシスはミトコンドリア膜電位の低下を伴うことからミトコンドリア経路を介していると考えられている。*RCAN1* ノックアウト細胞ではミトコンドリア膜電位の低下が起こらなくなったことから、*RCAN1* はミトコンドリアよりも上流で機能していると示唆された。BCL-2 ファミリータンパク質の発現量を調べたところ、*RCAN1* ノックアウト細胞ではアポトーシス促進的に働く BAX、BAK、BIM の発現量が低下し、アポトーシス抑制的に働く BCL-2、BCL-xL の発現量が増加していることが明らかとなった。一部の細胞株で CREB の過剰発現および CREB 活性化剤である cAMP 処理によってアポトーシスが誘導されること、*RCAN1* の過剰発現が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る CREB 活性化を促進することが報告されている。そこで、*RCAN1* ノックアウト細胞を用いて CREB 活性化について解析を行った。野生型 Nalm-6 では DEX 処理によって CREB のリン酸化が誘導され、CREB 標的遺伝子である *NR2A*、*AREG*、*CREM*、*CFOS* の発現が誘導された。しかしながら、*RCAN1* ノックアウト細胞では CREB のリン酸化も標的遺伝子の発現誘導も起こらなかった。フォルスコリン存在下で DEX 処理を行ったところ、野生型 Nalm-6、*RCAN1* ノックアウト細胞の両方でアポトーシス誘導が促進された。これらの結果から、GC 処理による *RCAN1* の発現誘導を通じて CREB のリン酸化と活性化がおこり、GC 誘導アポトーシスを仲介していると考えられた。