

氏 名	林 嘉宏
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第 668 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位授与年月日	平成 2 5 年 3 月 7 日
学位論文題目	C/EBP β promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion (C/EBP β は BCR-ABL による骨髄系細胞増殖と白血病幹細胞の枯渇を促す)
審査委員	主査 教授 醍醐 弥太郎 副査 教授 平田 多佳子 副査 教授 小笠原 一誠

論文内容要旨

※整理番号	673	(ふりがな) 氏名	はやし よしひろ 林 嘉宏
学位論文題目	C/EBP β promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion (C/EBP β は BCR-ABL による骨髓系細胞増殖と白血病幹細胞の枯渇を促す)		
<p>【研究の目的】</p> <p>慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia, CML) は 9 番、22 番染色体の相互転座の結果生じる BCR-ABL 融合タンパクの有する恒常的チロシンキナーゼ活性が原因である。分化・成熟を伴う骨髓系細胞の過剰産生を特徴とする慢性期から、芽球増加が見られる急性転化へと病期が進行すると予後は極めて不良である。CML の治療成績は Imatinib を始めとした ABL 特異的チロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosin kinase inhibitor, TKI) の出現により飛躍的に改善した。しかし、治療抵抗性の出現や、多くの場合に休薬困難である点など、克服すべき課題は多い。最近になり CML の病態形成における CML 幹細胞の存在が注目されている。CML 幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、TKI に対しても低感受性であるため治療後も体内に残存し、再発や新たな遺伝子異常蓄積による病期移行の原因となる。CML 幹細胞の性状と制御機構の解明がこれらの課題克服において重要である。</p> <p>一方で、感染症等で顆粒球造血が亢進する状態は類白血病反応と呼ばれ、慢性期 CML と類似している。感染に应答して骨髓系細胞の産生が亢進する際には転写因子 CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBPβ) が必須であるが、慢性期 CML における C/EBPβ の関与については全く解明されていない。本研究では、慢性期 CML における C/EBPβ の発現制御機構および機能的意義を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>慢性期 CML 患者および健常人ドナーの骨髓細胞検体は AllCells 社より購入した。マウス造血幹細胞の細胞株である EML 細胞は Dr.Tsai 氏 (Utha 大学) より分与して頂いた。細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスを用いた。細胞表面抗原解析、細胞ソーティングには FACSCantoII および FACS Aria を使用した。mRNA の発現はリアルタイム RT-PCR 法、タンパクの発現はウエスタンブロット法で解析した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

慢性期 CML 患者の骨髄細胞から細胞ソーティングにより純化した造血幹細胞、骨髄系前駆細胞の全分画において、C/EBP β mRNA の発現が健常人ドナーより亢進していた。BCR-ABL を導入した EML 細胞 (EML-BCR-ABL) では、C/EBP β mRNA およびタンパクの発現がコントロールに比べて有意に亢進した。この発現亢進は、Imatinib および BCR-ABL の下流に存在する STAT5 の阻害剤の添加で抑制された。優性阻害型 STAT5 変異体を導入した際にも同様に C/EBP β の発現亢進が抑制された。一方、EML 細胞に恒常活性型 STAT5 変異体を導入すると C/EBP β の発現が亢進した。

BCR-ABL によって惹起される骨髄系細胞の増殖亢進における C/EBP β の意義を解明するため、C/EBP β knockout (KO) マウスの骨髄細胞に BCR-ABL を遺伝子導入し、*in vitro* でのコロニー形成法、*in vivo* での骨髄移植実験を行い、野生型マウスの結果と比較した。コロニー形成法において、C/EBP β KO 細胞は野生型に比べて小さなコロニーを形成し、コロニー形成細胞の c-Kit 陽性率が高く、CD11b 陽性率は低く、増殖のみならず分化の遅延が見られた。野生型細胞は 3 回以上のリプレーティングは不可能であったが、C/EBP β KO 細胞は 4 回以上可能であった。C/EBP β KO 細胞を移植したマウスは、野生型細胞を移植したマウスよりも白血球増加と脾腫の進行が遅延し、生存期間が有意に延長した。一次移植レシピエントから骨髄細胞を採取し、新たに放射線照射したマウスに移植する二次移植において、移植細胞数と発症頻度から白血病再構築能を有する細胞の頻度を計算したところ、野生型では CML 幹細胞の頻度が 1 : 1,404,129 であったのに対し、C/EBP β KO 細胞を移植したマウスでは、約 2 倍の 1 : 683,773 であった。

【考察】

C/EBP β の発現は BCR-ABL により亢進し、そこには STAT5 の関与が示唆された。C/EBP β は BCR-ABL による骨髄系細胞の分化・増殖を促し、慢性期 CML の病態形成に深く関与することが示された。さらに、C/EBP β は分化・増殖の誘導によって CML 幹細胞を減少させる作用を持つことが示唆された。本研究の結果は、C/EBP β の制御により CML 幹細胞を枯渇に導くという CML の新たな治療戦略構築につながる可能性を有している。

【結論】

慢性期 CML の病態において、転写因子 C/EBP β は BCR-ABL により発現が亢進する。C/EBP β は骨髄系細胞の分化・増殖を促し、白血病幹細胞を減少させる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	673	氏名	林 嘉宏
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>本論文は、慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia, CML) における転写因子 C/EBPβ の発現制御機構および機能的意義を明らかにすることを目的として、慢性期 CML 患者および健康人ドナーの骨髄細胞と BCR-ABL を導入したマウス造血幹細胞株 (EML 細胞)、C/EBPβ knockout (KO) マウスの骨髄細胞について、C/EBPβ の発現と骨髄系細胞の分化・増殖の観点から分子生物学的な検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 慢性期 CML 患者の造血幹細胞、骨髄系前駆細胞において、C/EBPβ mRNA の発現は健康人ドナーより亢進している。 2) C/EBPβ の発現は BCR-ABL-STAT5 経路により亢進する。 3) C/EBPβ は BCR-ABL による骨髄系細胞の分化・増殖を促し、慢性期 CML の病態形成に関与する。 4) C/EBPβ は骨髄系細胞の分化・増殖の誘導によって CML 幹細胞を減少させる作用を有する。 <p>本論文は、C/EBPβ を介した BCR-ABL による骨髄系細胞の分化・増殖と慢性期 CML の病態形成機構の一端を明らかとし、C/EBPβ の制御により CML 幹細胞を枯渇に導く治療戦略の可能性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 573 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 25 年 1 月 28 日)</p>			