



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	CD7 promotes extramedullary involvement of the B-cell acute lymphoblastic leukemia line Tanoue by enhancing integrin β 2-dependent cell adhesiveness (CD7 は、インテグリン β 2 による接着能の亢進を介し、急性リンパ性白血病細胞株 Tanoue の髄外浸潤を促進する)
Author(s) 著 者	近藤, 崇
Degree number 学位記番号	甲第 2755 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報告番号	甲 第 2755 号	氏 名	近藤 崇
<p>CD7 promotes extramedullary involvement of the B-cell acute lymphoblastic leukemia line Tanoue by enhancing integrin $\beta 2$-dependent cell adhesiveness (CD7 は、インテグリン $\beta 2$ による接着能の亢進を介し、急性リンパ性白血病細胞株 Tanoue の髄外浸潤を促進する)</p> <p>研究目的</p> <p>急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) に関しては、化学療法の進歩により治療成績は向上しつつあるものの、5年無病生存率は小児で約80%、成人では約40%といまだ改善の余地が残されている。ALLの予後規定因子として、年齢、初診時白血球数、染色体異常の種類に加え、髄外浸潤の有無が報告されている。特に、髄外浸潤については、初診時でも患者の30~50%で脾臓や肝臓に、縦隔、中枢神経 (Central Nervous System: CNS) や生殖腺にもそれぞれ8%、2.5~5%、0.6%みられる。また、再発時においても、20.9%が中枢神経、5.3%が生殖腺に病巣を認める。髄外再発のリスク因子として、T細胞形質、高白血球数、t(9,22)遺伝子異常や髄液中の白血病細胞の存在などが示唆されている。しかし、ALLの髄外浸潤促進分子に関しては、いまだ不明な点が少なくない。そこで、本研究では、ALL細胞株Tanoueの髄外高浸潤株を作製し、促進分子の同定を試みた。</p> <p>研究方法</p> <ol style="list-style-type: none">1) 対象とした細胞株 ヒト B 細胞性 ALL 細胞株 Tanoue を、用いた。2) 髄外高浸潤細胞株の作製法 1x10⁶ 個の Luciferase 遺伝子発現ベクター導入 Tanoue (Luc-Tanoue) を、NOD/SCID マウスの尾静脈から移植した。週 1 回、in vivo imaging system で経過観察し、4~6 週目に脳への髄外浸潤細胞を回収した。In vitro で培養後、			

再び NOD/SCID マウスに移植した。これを 4 回繰り返すことで、髄外高浸潤 Luc-Tanoue (Tanoue-F1~F4) を作製した。

- 3) 親株と Tanoue-F4 における遺伝子発現の評価法
親株と Tanoue-F4 における遺伝子発現の差異は、SurePrint G3 Human GE 8×60K マイクロアレイと RT-PCR 法で解析した。
- 4) CD7、ITGA3 と ITGB2mRNA 発現の定量法
CD7、ITGA3 と ITGB2mRNA の発現は、TaqMan RT-PCR 法で解析した。
- 5) CD7 蛋白発現量の解析法
親株と Tanoue-F1~F4 における CD7 蛋白の発現量は、FITC 結合抗ヒト CD7 抗体を用い、Flow cytometry 法で調べた。
- 6) 各種 CD7 遺伝子発現ベクターの作製法
Tanoue からクローニングした CD7 全長、細胞外および細胞内ドメインの cDNA をシーケンス後、pTurbo-GFP-N ベクターの AgeI-NheI サイトにライゲーションし、全長発現ベクター (pTurboCD7-GFP)、細胞外ドメイン発現ベクター (pTurboCD7-EC-GFP) と細胞内ドメイン発現ベクター (pTurboCD7-IC-GFP) を作製した。これらの Luc-Tanoue への導入は、Lipofection 法で行った。
- 7) 浸潤能の解析法
マトリゲルでコートした Transwell chamber (ポアサイズ 8 μm) の上段に 1x10⁶ 個の細胞を播種後、48 時間目に下段に浸潤した細胞数を計測した。浸潤能は、接着能、運動能や増殖能などの総和である。これらについては、既報に従い解析した。

研究成績

- 1) 髄外高浸潤株 (Tanoue-F4) と親株を、NOD/SCID マウス各 10 匹の尾静脈から移植した。2 週間後に in vivo imaging したところ、Tanoue-F4 でのみ 10 匹中 9 匹に CNS 浸潤がみられた。また、Tanoue-F4 では、浸潤能、接着能、運動能と増殖能のうち、前 2 者が親株に比べ亢進していた。
- 2) 次に、親株と Tanoue-F4 における遺伝子発現の違いを、マイクロアレイ解析で比較検討した。親株に比べ 2 倍以上あるいは 1/2 以下を、カットオフ値とすると、Tanoue-F4 で、約 28,000 遺伝子中 522 遺伝子に増減を認めた。このうち、転移や浸潤への関与が報告されている 68 分子に着目すると、変化がみ

られたのは、CD7と既に接着分子として知られているITGA3およびITGB2の3者であった。このうち、約4.6倍と最も増加率が高かったCD7に注目し、以下の検討を行った。また、68分子を対象に行ったRT-PCR法でも、同様の結果が確認された。

- 3) まず、親株とTanoue-F1～F4におけるCD7mRNA発現量と蛋白量を調べた。その結果、mRNA発現量は1.5～4.0倍、蛋白量は1.8～4.4倍と、F1からF4の順に増加していた。
- 4) CD7遺伝子発現ベクター導入細胞では、浸潤能と接着能がcontrol vector導入細胞に比べ亢進していた。
- 5) CD7細胞内ドメイン発現ベクター導入細胞では、浸潤能と接着能がcontrol vector導入細胞に比べ亢進していた。一方、CD7細胞外ドメイン発現ベクター導入細胞のそれに、変化はみられなかった。
- 6) CD7遺伝子発現ベクター導入細胞におけるITGA3とITGB2の発現解析を行った。control vector導入細胞と比べ、CD7遺伝子発現ベクター導入細胞ではITGB2のmRNA発現量が1.8倍高まっていた。

考察

本研究では、ALL細胞株Tanoueの髄外高浸潤株を作製し、髄外浸潤促進分子について解析した。

初めに、Tanoue-F4と親株を、NOD/SCIDマウス各10匹の尾静脈から移植したところ、Tanoue-F4でのみ10匹中9匹にCNS浸潤がみられた。また、Tanoue-F4では、浸潤能と接着能が親株に比べ亢進していた。そこで、親株とTanoue-F4を用い、転移や浸潤に関与する分子の発現を比較検討した。その結果、Tanoue-F4でCD7、ITGA3とITGB2が高発現していた。このうち、約4.6倍と最も増加率が高かったCD7に注目し、以下の検討を行った。

まず、親株とTanoue-F1～F4におけるCD7mRNA発現量と蛋白量を調べたところ、F1からF4の順に増強していた。次に、CD7遺伝子発現ベクター導入細胞の浸潤能、接着能、運動能および増殖能を解析した。その結果、浸潤能と接着能が、CD7遺伝子発現ベクター導入細胞で亢進しており、CD7は接着能の亢進を介し、ALL細胞の浸潤能を高めていることが明らかとなった。さらに、CD7の接着能亢進機序を検討するため、CD7細胞外および細胞内ドメイン発現ベクター導入細胞を作製し、浸潤能と接着能を調べた。細胞内ドメイン発現ベクター導

入細胞でのみ、control vector導入細胞に比べ両者の亢進がみられた。すなわち、CD7による接着能の亢進は、細胞外ドメインによる直接的な作用ではなく、細胞内ドメインを介するものであることが示唆された。そこで、CD7遺伝子発現ベクター導入細胞におけるITGA3とITGB2の発現を解析したところ、control vector導入細胞と比べITGB2のmRNA発現量が1.8倍高まっていた。

すなわち、CD7はITGB2を誘導し、白血病細胞の接着能を高めることが明らかとなった。ITGB2は白血球に発現しており、遺伝子異常を起こすと白血球接着不全症 (leukocyte adhesion deficiency :LAD) を発症する。LADは末梢血白血球数の異常高値にもかかわらず、炎症組織への白血球の浸潤がみられず、易感染性を示す免疫不全症である。その機序として、ITGB2の欠損や機能不全による白血球の血管内皮細胞への接着能低下が挙げられている。これらの知見は、CD7を介したITGB2の発現増強が、白血病細胞の髄外浸潤に寄与するという今回の結果を支持している。

結論

ヒト ALL 細胞株 Tanoue の髄外浸潤に、CD7、ITGA3 と ITGB2 の発現増強が重要な役割を果たしていた。また、CD7 は ITGB2 の発現誘導を介し、浸潤能を亢進することが明らかとなった。

論文審査の要旨及び担当者

平成 25 年 12 月 20 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2755 号	氏名	近藤 崇
論文審査 担当者	主査 渡邊 直樹	副査 小海 康夫	
	委員 堀尾 嘉幸	委員 小船 雅義	

論文題名	CD7 promotes extramedullary involvement of the B-cell acute lymphoblastic leukemia line Tanoue by enhancing integrin $\beta 2$ -dependent cell adhesiveness (CD7 は、インテグリン $\beta 2$ による接着能の亢進を介し、急性リンパ性白血病細胞株 Tanoue の髄外浸潤を促進する)
------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

結果の要旨

本研究では、ALL 細胞株 Tanoue の髄外高浸潤株を作製し、促進分子の同定を試みた。髄外高浸潤株では、浸潤能およびそれに関与する接着能、運動能と増殖能のうち、前 2 者が親株に比べ亢進していた。親株と髄外高浸潤株における遺伝子発現の差異をマイクロアレイ解析と RT-PCR 法で比較検討したところ、髄外高浸潤株で CD7、インテグリン $\alpha 3$ とインテグリン $\beta 2$ が高発現していた。そこで、約 4.6 倍と最も増加率が高かった CD7 の遺伝子発現ベクター導入細胞を作製し、浸潤能、接着能、運動能と増殖能を解析した。その結果、髄外高浸潤株と同様に浸潤能と接着能が亢進していた。また、CD7 遺伝子発現ベクター導入細胞では、インテグリン $\beta 2$ の mRNA 発現量が高まっていた。以上の結果から、CD7 はインテグリン $\beta 2$ の発現誘導を介し、浸潤能と接着能を亢進することが明らかになった。

本研究の成果は、ALL の髄外浸潤促進機序に関する新知見であり、博士論文に値すると審査委員全員から評価を頂いた。