

成人T細胞性白血病細胞における蛋白チロシンリン酸化の解析

Analysis of protein tyrosine-phosphorylation in adult T-cell leukemia cells

代表研究者 紀南総合病院内科医長

振津琢磨

Department of Internal Medicine, Kinan General Hospital

Although adult T-cell leukemia (ATL) is well known as associated with prior infection with human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), the process of development of overt ATL from viral infection still remains unclear. In order to investigate the role of any activated tyrosine kinase(s) in leukemogenesis of ATL, the state of protein tyrosine-phosphorylation in ATL cells were examined with Western blot analysis. The tyrosine-phosphorylated proteins with MW of 240kDa, 155kDa, 70kDa, 65kDa, 45kDa, 40kDa, 35kDa, 30kDa were observed in all of ATL cells examined. Among them, the 155kDa of tyrosine-phosphorylated protein was present in membranous fraction of peripheral blood cells prepared from ATL patients, and not observed in any other leukemia patients such as AML, ALL and CML. These results suggest the possibility of involvement of activation of tyrosine kinase(s) in leukemogenesis of ATL. This 155kDa of membrane-associated tyrosine-phosphorylated protein unique for ATL patient might be useful for diagnosis of ATL development in HTLV-1 carriers.

研究目的

成人T細胞性白血病(ATL)は日本で最初に独立疾患として報告された白血病であり、当病院のある紀南地方も含め、日本の南西地方に多発する白血病である。その原因ウイルスであるHTLV-1(human T-cell leukemia virus type 1)は、ヒトにおいて初めて発見されたレトロウイルスであり、ATL細胞のDNAにはHTLV-1プロウイルスDNAがモノクローナルに組み込まれていることが証明されている。このHTLV-1遺伝子自体には既知のオンコジーンは認められないが、その遺伝子産物の1つであるTax 1は転写活性化因子であり、感染Tリンパ球を不死化してポリクローナルな増殖に導き、HTLV-1のキャリアー状態の維持に関与していると考えられている。しかしHTLV-1の感染からATL発症までには平均55年の長い潜伏期間があり、感染Tリンパ球が更にモノクローナルに増殖し白血病化するまでの過程には、多段階の発癌機構が関与しているものと考えられている。そのATL発症までの過程には、数理統計学的解析から5つの

独立した遺伝子変化の蓄積が必要と予想されているが、その多段階発癌機構は充分には解明はされていない。

一方、*bcr-abl*キメラ遺伝子や*c-fms*遺伝子の活性化突然変異等で知られる様に、慢性骨髄性白血病(CML)や一部の急性骨髄性白血病(AML)においては、蛋白チロシンキナーゼの異常活性化が白血病の発症機構に関与していることが明らかされている。我々もこれまでに、レセプター型チロシンキナーゼをコードする*c-kit*遺伝子について解析を行い、マスト細胞性白血病細胞において*c-kit*遺伝子の活性化突然変異が存在するのを見出し、白血病の発症に関与していることを明らかにしてきた。しかしATLの発症機構における蛋白チロシンキナーゼの役割については、これまでに十分な検討がなされていない。

そこで本研究では、蛋白チロシンキナーゼの異常活性化が、このATLの多段階発癌機構に関与している可能性を検討するために、ATL症例の白血病細胞における蛋白のチロシンリン酸化状態の解析を行った。

研究経過

ATLの4症例、AMLの2症例、急性リンパ性白血病(ALL)の2症例、CMLの1症例および正常健康者の末梢血単核球分画を分離し、-80℃にて凍結保存した。ATLの4症例では形態上、単核球分画中のATL細胞の占める割合は各症例1～4において、それぞれ98%、99%、32%、11%であった。凍結保存した末梢血単核球分画を1%NP-40含有の可溶性バッファー(20mM Tris-HCl, pH8.0, 137mM NaCl, 10% Glycerol, 10mM EDTA, 100mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 2mM PMSF, 0.15U/ml Aprotinin, 20μg/ml Leupeptin, 20μg/ml Pepstatin A)で可溶性化し、SDS-PAGEにて泳動後、蛋白チロシンリン酸化の状態を抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。その結果、ATL症例1と2のATL白血病細胞においては、共通して240kDa, 155kDa, 70kDa, 65kDa, 45kDa, 40kDa, 35kDa, 30kDaの蛋白のチロシンリン酸化が認められた。

次に、これらのチロシンリン酸化蛋白を精製、同定してゆくために、細胞質分画と細胞膜分画とに分けて更に解析を行った。まずNP-40を含まないバッファー(上記)に単核球分画を浮遊させ、15000rpm, 30min, 4℃にて遠心し上清を細胞質分画とした。残ったペレットをもう一度同じバッファーで洗浄した後、1%NP-40含有の可溶性バッファーで可溶性化して膜分画とした。こうして得た各分画について上記と同様に蛋白チロシンリン酸化の状態を解析したところ、155kDaのチロシンリン酸化蛋白は膜分画に存在しており、すべてのATL症例(1～2)の膜分画に認められた。しかし、ATL以外の白血病症例や健常人ではその膜分画に155kDaのチロシンリン酸化蛋白は認められなかった。

研究成果

ATL症例の白血病細胞において、240kDa, 155kDa, 70kDa, 65kDa, 45kDa, 40kDa, 35kDa, 30kDaの蛋白のチロシンリン酸化が認められた。これらの内の一部については、

同じサイズのチロシンリン酸化蛋白がCMLやALL症例にも認められ、活性化して自己リン酸化したsrcファミリーのチロシンキナーゼや、チロシンリン酸化を受けたMAPキナーゼ等と推定され、ATL細胞においても他の白血病細胞と同様に広範な蛋白チロシンキナーゼの活性化が認められた。したがって、ATL発症の過程に蛋白チロシンキナーゼの活性化が何らかの形で関与している可能性が示唆された。一方、細胞膜分画に存在する155kDaのチロシンリン酸化蛋白は、ATL症例のみに認められることから、ATL発症機構に関わるATL特異的なチロシンリン酸化膜蛋白と考えられ、何らかの蛋白チロシンキナーゼの基質か、あるいは活性化したチロシンキナーゼ自身である可能性が示唆された。このようなATL特異的なチロシンリン酸化膜蛋白の存在は、HTLV-1キャリアーからATL発症時の診断に役立つものと考えられた。

今後の課題と発展

今後もHTLV-1キャリアーやATL症例について同様の検討を重ねることにより、155kDaのチロシンリン酸化膜蛋白がATLに特異的なものであることを更に確認してゆく必要がある。しかし臨床症例から得られる細胞には限りがあるため、ATL細胞株についても同様の検討を行い、ATL症例で認めたチロシンリン酸化蛋白、特にATL特異的と思われる155kDaの膜蛋白の精製・同定を行い、ATL発症機構におけるこのチロシンリン酸化膜蛋白の役割を更に解析して行きたい。

発表論文リスト

第54回日本癌学会総会記事
(平成7年10月：p112)