

学位論文 (Thesis) の要約

小林 宣彦

Integrin $\alpha 7$ and extracellular matrix Laminin 211 interaction promotes proliferation of acute myeloid leukemia cells and is associated with granulocytic sarcoma

(インテグリンアルファ7と細胞外間質であるラミニン211は急性骨髄性白血病細胞の増殖と顆粒球肉腫に関連する)

指導教員 半田 寛 准教授

平成31年1月

群馬大学大学院医学系研究科

平成27年入学

臨床医学領域・内科学講座・血液内科学

発表予定論文

Integrin $\alpha 7$ and extracellular matrix Laminin 211 interaction promotes proliferation of acute myeloid leukemia cells and associated with granulocytic sarcoma

Cancers (投稿済)

平成31年1月23日 (投稿受付)

【学位論文の要約】

A. 序論

急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia; 以下 AML) は造血器悪性腫瘍の一つであり、化学療法または同種幹細胞移植により治療が行われるが予後は不良である。現在 FAB 分類に代わり、主に遺伝的知見に基づく WHO 分類が用いられ治療方針の決定や予後予測がなされているが、さらなる予後予測因子の同定が必要である。我々は以前に、診断時に顆粒球肉腫 (Granulocytic sarcoma; 以下 GS) という髄外病変が存在すると予後不良であることを報告している (Shimizu H et al. Cancer Sci 2012; 103(8):1513-1517)。GS を形成する機序は完全には解明されていないが、IV型コラゲナーゼを産生する AML 細胞が基底膜へ侵入することが示されている (Kobayashi M et al. Jpn J Cancer Res 1995; 86(3):298-303)。GS の予後への関与を考慮すると、GS 形成機序を解明することが新規の治療標的の同定や予後の改善に寄与すると考えられる。

GS 形成に関連する遺伝子を見つけ出すため、我々は次世代シーケンサーによる RNA シーケンスを行い AML 患者から得られた検体で遺伝子発現解析を行った。GS を有する AML 症例で発現が亢進している遺伝子の中からインテグリン $\alpha 7$ 遺伝子 (ITGA7) を選択し分析を行うこととした。インテグリンは α および β サブユニットの二量体を形成し、細胞表面に存在する

受容体である。インテグリン $\alpha 7\beta 1$ のリガンドはラミニンという細胞外マトリックスに分類される分子であり、様々な細胞内シグナルを活性化させるが、結合親和性はインテグリンおよびラミニンのアイソフォームにより異なっている。ラミニン211はインテグリン $\alpha 7\beta 1$ に対して比較的高い親和性を有し、代表的なものとしてfocal adhesion kinase (FAK)のリン酸化からERKのリン酸化に至るようなカスケードを活性化させる。

固形がんにおいて、腫瘍細胞がインテグリンを介した細胞外マトリックス(Extracellular matrix;以下ECM)との相互作用を持つことが報告されており(Xiong J et al. Int J Biochem Cell Biol 2013;45(5):1012-1015)、本研究ではAMLのITGA7遺伝子発現とECMの役割、インテグリン $\alpha 7$ の予後予測因子としての意義を明らかにする。

B. 材料と方法

本研究は群馬大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得て行われた(2015年4月、第1295号)。当院で診断されたAML患者の内、①診断時に行った骨髓液採取の際、その一部の保存に同意を得たもの、②保存検体よりRNA抽出が可能であったものを対象とし、64例の解析を行った。患者の診療録を後方視的に評価し、年齢、骨髓単核球染色体分析、GSの有無、治療経過の情報を取得した。

まずGSを有するAML 7例(GS群)と、GSの無いことが確認されたAML 7例(非GS群)からRNAを抽出し、次世代シーケンサーNextSeq500(イルミナ社)を用いてRNAシーケンス(RNA-seq)を行った。更に他の臨床検体を用いてITGA7発現をRT-qPCRで評価し、骨髓液およびGS組織ホルマリン固定パラフィン包埋検体(FFPE)の免疫染色によりインテグリン $\alpha 7$ 蛋白発現の評価を行った。

上記のような臨床検体における検討を踏まえ、AMLにおけるインテグリン $\alpha 7$ の分子レベルでの意義を検証するため、AML細胞株を用いて実験を計画した。AML細胞株はPL21, HL60, THP1を対象とし、ITGA7遺伝子発現をRT-qPCRで評価した。細胞表面の蛋白発現はフローサイトメトリーで検証した。更にECMの刺激で細胞増殖が促進されることを検証するため、ラミニン211, 411, コントロールの条件で各細胞株増殖実験を行った。増殖率はcell counting kit 8を使いマイクロプレートリーダーで生細胞数と相関する吸光度を測定した。

我々はPL21, THP1, HL60を無血清培地で24時間培養しウシ胎児血清によるリン酸化シグナルを除くこととした。その後、ラミニン211, 411, 無処理の培養皿でそれぞれの細胞を培養し、0分、15分、30分、60分の時点で細胞を回収しタンパク質抽出を行った。

インテグリンによる細胞内シグナルは多岐に渡るが、細胞増殖に関与するカスケードとしてERKのリン酸化を評価することとした。培養細胞から作成したwhole cell lysateを用い、ウェスタンブロット法を行った。バンドの検出には化学蛍光発光法を用いた。

C. 結果

(1) RNA-seqによるAML遺伝子発現解析：

GSを有するAML 7例(GS群)、GSを持たないAML 7例(非GS群)の骨髓単核球より抽出したRNAを用い、RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行った。GS群と非GS群の遺伝子発現を比較し、更にgene set enrichment analysis(GSEA) (図1)を行ったところ細胞表面に発現する分子がGS群において有意に発現亢進しており(図)、その中でITGA7遺伝子に着目した。インテグリン $\alpha 7$ と二量体を形成するインテグリン $\beta 1$ 遺伝子(ITGB1)の発現も確認された。TCGA databaseでもAMLでITGA7発現が亢進している症例が存在していた。

(2) AML臨床検体とAML細胞株でのITGA7発現解析：

AML臨床検体でのITGA7発現についてRT-qPCRで評価を行ったところ、GSを有する症例で有意に発現が亢進していた(図2)。更にGSを有する症例の骨髓およびGS組織のFFPEにおいて、免疫染色を行ったところインテグリン $\alpha 7$ 蛋白の発現が確認できた。またAML細胞株でもITGA7遺伝子発現があることをRT-qPCRで確認し、更にPL21, THP1ではフローサイトメトリーで細胞表面のインテグリン $\alpha 7$ 蛋白発現を確認した。

(3) ラミニン刺激による細胞増殖：

インテグリン $\alpha 7\beta 1$ を発現した細胞が、そのリガンドであるラミニンによる刺激で増殖すると仮説を立て実験を行っ

た。ラミニンアイソフォームであるラミニン211, 411で覆った培養皿(各々10 μ g/mL)、無処理の培養皿でPL21, THP1, HL60を培養し、細胞数をCCK8で評価し増殖率をFriedman検定で解析した。結果、ラミニン211による刺激でPL21, THP1が有意に増殖していた(図3)。

(4)ラミニン刺激によるインテグリンを介した細胞内シグナルの活性化:

ラミニンによる刺激でインテグリンから始まる細胞内シグナルカスケードの活性化を検証するためウェスタンブロット法を行った。ラミニン211で刺激したPL21, THP1は60分の時点でERK1/2のリン酸化が亢進していることが確認された。

(5)AMLとITGA7遺伝子発現の臨床的意義:

ITGA7発現と臨床的予後について解析を行った。まず非GS群6例のITGA7/ β actin発現の平均を求め、各AMLにおけるITGA7発現を Δ Δ Ct法で評価した。その値とGSの有無を用いてROC曲線を描出しカットオフ値を4.4と規定した。ITGA7発現の高低では全生存期間(overall survival, 以下OS)に差はなく、無再発生存期間(relapse free survival, 以下RFS)はITGA7高発現群で低い傾向にあったものの有意差は認められなかった(図4)。

D. 考察

この研究の結果、GSを形成するAMLではITGA7発現が高いことがわかった。そしてそれを発現しているAML細胞株では、特異的なリガンドであるラミニンアイソフォームの刺激によりERKシグナルカスケードが活性化され有意に増殖することが示された。インテグリンを発現しているAMLでは細胞外マトリックスとの相互作用が髄外病変の形成に関与していることが示唆された。このインテグリン α 7は、がん種により転移を促進する予後不良因子であるという報告や反対に予後良好因子と報告されているものがある(Haas T, et al. Cell Stem Cell 2017;21(1):35-50. e9, Hamidi H, et al. Nat Rev Cancer 2018;1-16)。本研究の結果からはインテグリン α 7はAMLに関しては腫瘍細胞の増殖を促進し予後不良因子となる可能性があり、AMLが細胞外マトリックスから増殖刺激を受ける機序は新しいものである。

インテグリン α 7のリガンドとして用いたラミニン211は主に骨格筋、心筋、末梢神経に存在し、他にも精巣、胸腺、骨髄に存在する。これらはGS形成の報告のある臓器であり、さらに慢性炎症が、細胞外マトリックスと休眠がん細胞の増殖を結びつけることも報告されている(Albregues J, et al. Science 2018;361(6409)eaao4227)。したがって、インテグリン α 7を発現する白血病がラミニン211により増殖が促進されるという我々のデータは、筋肉など豊富なラミニン211を有する組織で白血病細胞の局所的な増殖が促進されることを示唆する。

ITGA7発現と臨床的予後の関連は全生存率(overall survival;以下OS)、無再発生存率(relapse-free survival;以下RFS)共に統計学的有意差は認められなかった。核型とGSの存在がRFSのみ臨床的意義を認めたが、それぞれOSでは差を認めなかった。今回のサンプルでは、一般に予後予測因子として確立されている核型でもOSに統計学的有意差を認めなかったため、ITGA7と臨床的予後の関連に関しても大規模な研究によりOSとの関連が認められる可能性がある。

E. まとめ

我々が今回行った実験はインテグリン α 7を発現したAMLがGSの存在と関連しており、さらにそのリガンドである細胞外マトリックス、ラミニン211がERKシグナルを活性化して細胞増殖を促進することを示した。これはAMLにおけるインテグリン α 7と細胞外マトリックスとの相互作用を示す初めての報告である。AMLにおけるインテグリン α 7の詳細な役割を明らかにし、この分子を標的とする新たな治療戦略を開発するためにはさらなる研究が必要である

F. 参考図表および注釈

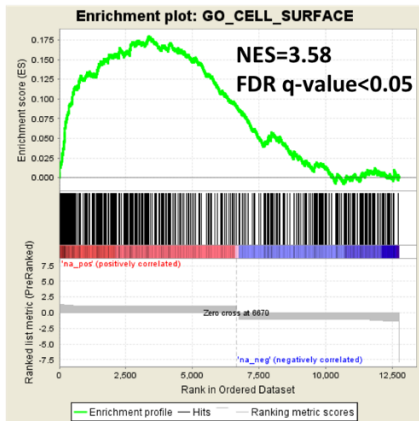
(図1)GSEA: GS群では非GS群に対して細胞表面分子をコードした遺伝子群が有意に変動している

(図2)ITGA7に対するRT-qPCR: 縦軸;対数スケール Mann-Whitney U test

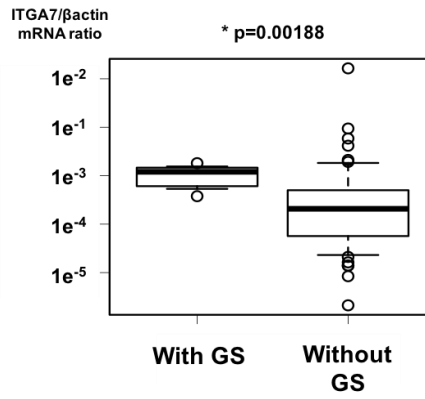
(図3)細胞増殖アッセイ: 青;ラミニン211 橙;ラミニン411 灰;無処理 Friedman test

(図4)臨床的予後解析: GSの有無による(A) OS, (B)RFS, ITGA7発現の高低による(C)OS, (D)RFS Log rank test

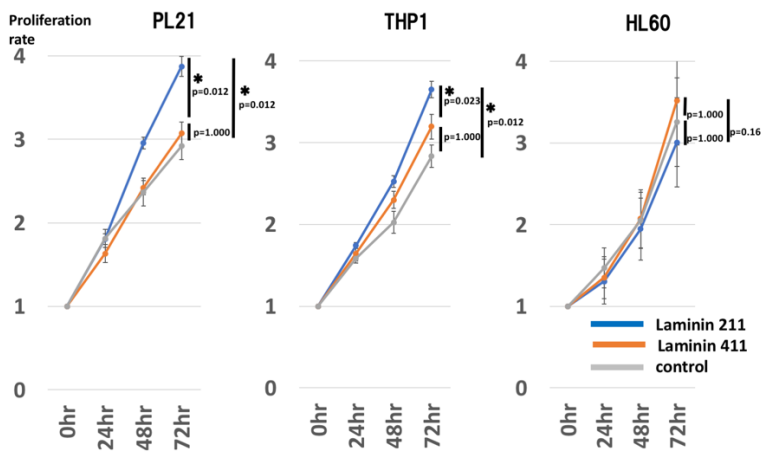
(図1)



(図2)



(図3)



(図4)

