



東京慈恵会医科大学  
腫瘍・血液内科 講師  
医学博士  
矢野真吾

平成元年東京慈恵会医科大学卒業  
平成9年 医学博士取得  
平成14年東京慈恵会医科大学  
腫瘍・血液内科助手  
平成20年東京慈恵会医科大学  
腫瘍・血液内科講師

## 免疫グロブリンの転写因子 Bob.1 に作用して 多発性骨髄腫細胞が分泌する腫瘍性免疫グロブ リンを抑制する蛋白の同定

### はじめに

多発性骨髄腫は白血病、悪性リンパ腫について3番目に多く認められる血液腫瘍疾患である。難治性で化学療法や骨髄移植を行ってもいずれ再発してしまい、現行の治療では約半数の患者さんが4年以内に亡くなってしまう。

多発性骨髄腫は腫瘍性免疫グロブリンを無制限に分泌することと、骨病変を呈することを特徴とする。この異常免疫グロブリンが免疫不全、腎機能障害、高粘調度症候群などを引き起こし患者の生命を脅かし、骨

病変が患者の QOL を悪化させる。そのため治療は、免疫グロブリンの産生を抑制すること、骨病変を改善させることを主体としている。近年 bortezomib、lenalidomide、thalidomide など骨髄腫に対する有効な薬剤が登場し、新しい治療方法が研究されている。しかしこれらの薬剤は抗腫瘍効果を示し、腫瘍細胞を apoptosis に導いて腫瘍量を減少させる。しかし癌を含めた未治療の腫瘍は本来増殖の速度が遅いかまたは停止し定常状態を保っていると考えられている。そこに化学療法、外科治療、放射線治療を行って腫瘍量を減らすと、細胞は cell cycle に導入され、増殖速度が速くなることが示唆されている。元来多発性骨髄腫は増殖の遅い腫瘍であるため、腫瘍細胞の増殖が速くなると予後を悪くする可能性がある。そこで本研究では腫瘍細胞を apoptosis に導くことなく免疫グロブリンの産生を抑制する方法を模索する。

### 多発性骨髄腫細胞と Bob.1、 Oct-2

正常グロブリンは、核蛋白である Bob.1 と Oct-2 が核内に存在すると転写を開始する。またヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 では継代培養後 Bob.1 が核内に 72 時間以上局在しグロブリンの分泌が持続するが、マウス多発性骨髄腫細胞株 A20 は 12 時間以内に Bob.1 が核内から消失することを western blotting で認め、グロブリンの産生が停止することを ELISA 法で確認した。A20 細胞を 72 時間培養した上清液(conditioning media)を U266 細胞に加えると U266 細胞の Bob.1 は 48 時間以内に核内から消失し、免疫グロブリンの産生が低下する。以上よりマウス多発性骨髄腫細胞株 A20 は免疫グロブリンの産生を停止する蛋白を分泌し、この蛋白はヒト骨髄腫細胞 U266 に加えても、Bob.1 と Oct-2 が核内から消失することを確認した。異常グロブリンの産生には Bob.1 を必要としている。つまり Bob.1 の局在を核内から核外へ移動させれば多発性骨髄腫細胞の異常グロブリンの産生を抑制できる可能性があると考えられた。

### 本研究の独創的な点

Bob.1 が骨髄腫細胞で経時的に細胞の核内から移動することにより免疫グロブリンの産生を調節していること、骨髄腫細胞が免疫グロブリンの産生を停止する蛋白を分泌することに注目している点が本研究の学術的な特色であり独創的な点である。この蛋白を同定・クローニングし、骨髄腫細胞の免疫グロブリン産生を抑制することを確認出来れば、多発

性骨髄腫患者の新たな治療法として臨床応用できる可能性がある。またこの蛋白が腫瘍細胞に与える影響を調べることにより、骨髄腫細胞の生物学的特性の新しい知見が得られる。さらに骨髄腫患者において、この蛋白の発現の有無と予後を調べることにより、この蛋白発現の臨床的意義も考察できる。

多発性骨髄腫細胞の生物学的特徴を解明しようとする研究は盛んに行われている。特に増殖因子の一つと考えられている IL-6 に関連した signal transduction についての研究は、Dana-Farber のグループが中心となって精力的に進められている。しかし骨髄腫細胞における異常グロブリン産生の抑制に関する研究はほとんど行われてない。この研究の特色は転写因子に作用して免疫グロブリンの産生を抑制する蛋白を同定しその機序を解明することで、この蛋白の同定から多発性骨髄腫細胞の新たな治療法を開発し、生物学的特徴を明らかにしようとする試みは、新しい発想と考える。

#### 無血清培養液下での細胞活性の確認

蛋白の単離が容易にできるように、マウス骨髄腫細胞株 A20 細胞を無血清液(Cosmedium 005)で培養し、10%FBS 培養液(通常の培養液)と同等の生物活性を示すことを確認した。骨髄腫細胞の生物活性は細胞の増殖速度と免疫グロブリン(IgG)の産生状況で判定した。

#### 蛋白の分離と同定

A20 細胞を無血清培養液(Cosmedium 005)で72時間培養し、conditioning mediaを回収した。3種類のAmicon Ultra centrifugal filter (5kD、50kD、100kD)を用いてconditioning mediaを分子量別に濃縮した。濃縮した蛋白をろ過滅菌し、U266細胞に加えて培養した。U266細胞でのBob.1の局在はWestern blottingとluciferase assayで検索した。Western blottingは蛋白加培養液でU266細胞を72時間培養後、細胞の核蛋白と細胞質蛋白をそれぞれ抽出して行った。Bob.1抗体はSanta Cruz社のrabbit polyclonal抗体を用いた。Luciferase assayはU266細胞を48時間培養後に、immunoglobulin heavy chainのpromoter vector遺伝子導入した。遺伝子導入はAmaya社のtransfectionシステムを用いた。使用したconstructはpGL-2 luciferase standard constructにimmunoglobulin heavy chainのpromoterを挿入したもので、Bob.1が細胞の核に存在するとluciferase活

性が高くなり、細胞質に移動すると低下する。Bob.1が細胞質に移動する活性を有する蛋白の分子量を、3種類の濃縮filterの結果から想定した。次にion exchange chromatographyでA20細胞のconditioning mediaを分離した。分離した蛋白を各々ろ過滅菌後U266細胞に加えて培養し、Western blottingとluciferase活性でBob.1の局在を調べた。Bob.1が核から細胞質に移動する蛋白グループをSDS-電気泳動に流した。しかし蛋白のバンドが非常に多く、目的の蛋白を単離することが困難と考えられた。そのためion exchange chromatographyでA20細胞のconditioning mediaを分離し、U266細胞のBob.1の局在を調べた。Bob.1の局在が核から移動する活性を示すfractionをSDS-電気泳動に流し、強い活性を持つ蛋白を検索した。Gel上蛋白量が多かったため、さらに疎水クロマトグラフィーでさらに蛋白を分離し目的の蛋白を検索した。Gel上のバンドの強さとluciferase活性の強さを検討し、候補となった蛋白をmass spectroscopyで同定した。その結果アミノ酸配列から候補となった蛋白は、1) セルロプラスミン、2) aminopeptidaseであった。この蛋白を購入し、U266に加えて、Bob.1とOct-2の局在を調べたところ、aminopeptidaseで核からの消失を確認した。またU266が分泌する免疫グロブリン(IgE)を測定してみると、aminopeptidaseを加えた場合、細胞の増殖を抑制することなく、IgEの産生の低下が認められた。つまりaminopeptidaseは、骨髄腫細胞に作用し、腫瘍性免疫グロブリンの産生を抑制することが証明された。

今後はこの蛋白の作用機序を解明していく予定である。