

# 細胞株を用いた多発性骨髄腫細胞の 細胞生物学的検討

- i) p53 突然変異の検討
- ii) インターフェロン の増殖に及ぼす効果の検討

重藤 佳恵・米田 由香里・長谷川 由美子

医大・衛生学 植木 絢子, 大槻 剛巳

# 川崎医科大学にて樹立されたヒト骨髄腫細胞株・一覧

細胞株	年齢/性別	免疫グロブリン	由来組織(培養開始年月日)
KMM-1: 62/M		BJP-	皮下腫瘍 (10/23/79)
KMS-11:67/F		Ig G-	胸水 (9/11/87)
KMS-12PE:	64/F	non-producing	胸水 (11/13/87)
		胸水貯留時に高アマラーゼ血症	
KMS-12BM:	<KMS-12PE の sister line>		骨髄 (1/5/88)
KMS-18:58/M		Ig A- to BJP-	末梢血 (5/22/96)
		高アンモニア血症	
KMS-20:65/F		Ig G-	骨髄 (6/13/97)
		家族性発症(母が骨髄腫)	
KMS-21PE:	62/M	Ig D-	胸水 (8/8/97)
KMS-21BM:	<KMS-12PE の sister line>		骨髄 (1/9/98)
		高アンモニア血症, 多臓器転移(皮膚, 膀胱, 胸腔)	
KMS-24:62/M		Ig G-	骨髄 (6/30/98)
KMS-26:50/M		Ig G-	胸水 (8/8/99)
KMS-27:52/M		BJP-	末梢血 (4/28/98)
KMS-28PE:	77/F	Ig G-	胸水 (1/6/00)
KMS-28BM:	<KMS-12PEの sister line >		骨髄 (2/1/00)
KMS-33:70/F		Ig G-	骨髄 (10/28/99)
		間質細胞 feeder layer 依存性・IL-6 依存性増殖	
KMS-34:60/F		Ig A-	胸水 (2/7/01)
		高アマラーゼ血症	

# 骨髓腫細胞の遺伝子変化

## ・染色体の増減

-13/ -13q (13番染色体 [長腕] の欠失)

## ・染色体相互転座に伴う過剰発現遺伝子

cyclin D1                    t(11;14)(q13;q32)

cyclin D3                    t(6;14)(p21;q32)

FGFR3                        t(4;14)(p16.3;q32.3)

c-maf                         t(14;16)(q32;q23)

MUM1/IRF4                 t(6;14)(p25;q32)

## ・突然変異

癌遺伝子

Ras

過剰発現, 突然変異

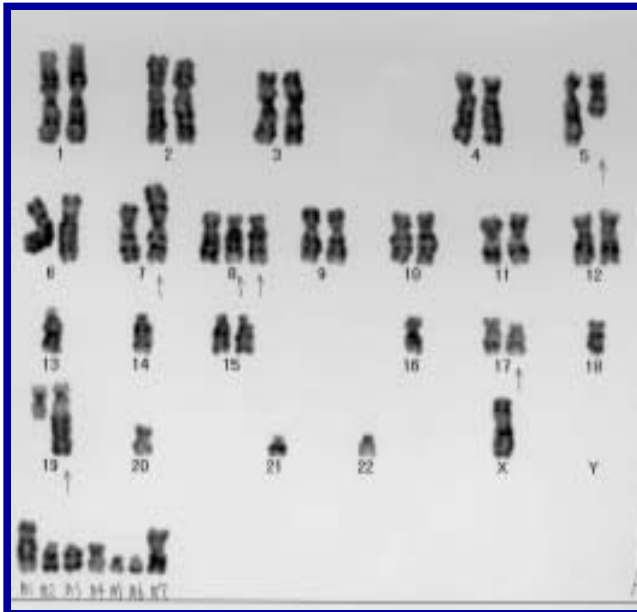
癌抑制遺伝子

p53

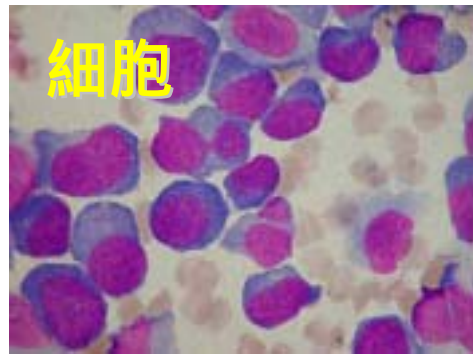
突然変異による機能喪失

p16

過剰メチル化による発現消失



# 癌抑制遺伝子 p53 の突然変異の検討 [方法]



Genomic DNA 抽出

p53 遺伝子の突然変異の Hot Spots (Exon 5-9) の PCR 法による増幅

SSCP (single strand conformation polymorphism analysis) 法による突然変異候補の検索

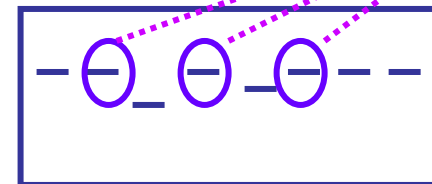
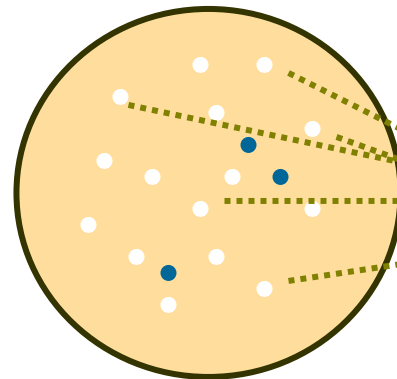
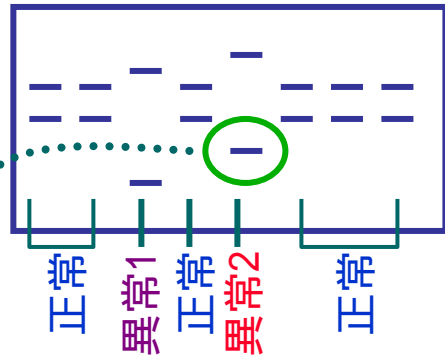
異常バンドのゲルよりの切断と DNA の再溶出, ならびに PCR による再増幅

PCR 産物のクローニングと大腸菌への transfection

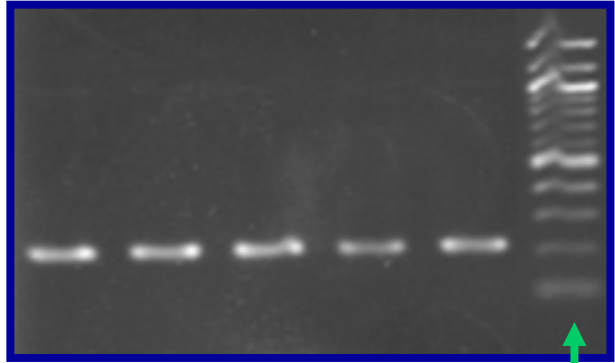
大腸菌のコロニー形成 (overnight)

PCR 産物の挿入されたクローンの選択

塩基配列決定

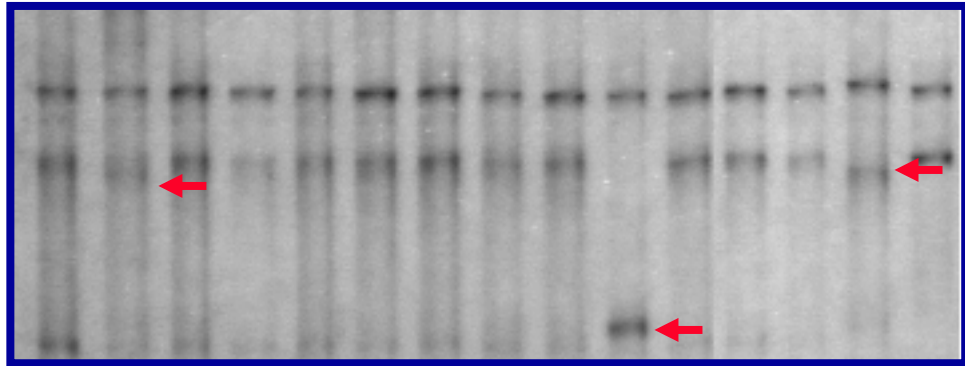


# 癌抑制遺伝子 p53 の突然変異の検討 [結果 i]



サイズマーカー

Exon 5



1 挿入

2 挿入

3 挿入

p53 遺伝子の突然変異の Hot Spots (Exon 5) の PCR 法による増幅

SSCP (single strand conformation polymorphism analysis) 法による突然変異候補の検索

異常バンドのゲルよりの切断と DNA の再溶出, ならびに PCR による再増幅

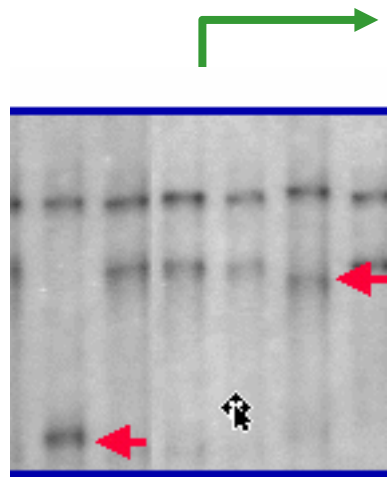
PCR 産物のクローニングと大腸菌への transfection

大腸菌のコロニー形成 (overnight)

PCR 産物の挿入されたクローンの選択

塩基配列決定

# 癌抑制遺伝子 p53 の突然変異の検討 [結果 ii]



塩基配列決定

正常

G C C G T G G G T T G A T T C C A C  
G C C G T A G G T T G A T T C C A C

異常2 KMS-26

異常2

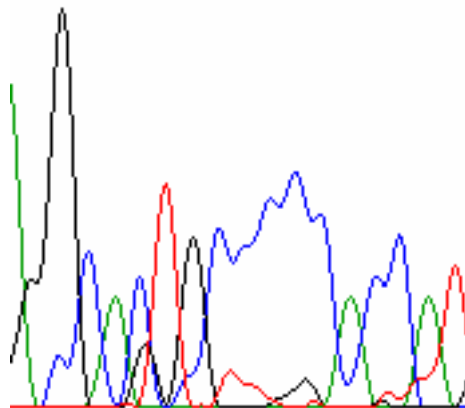
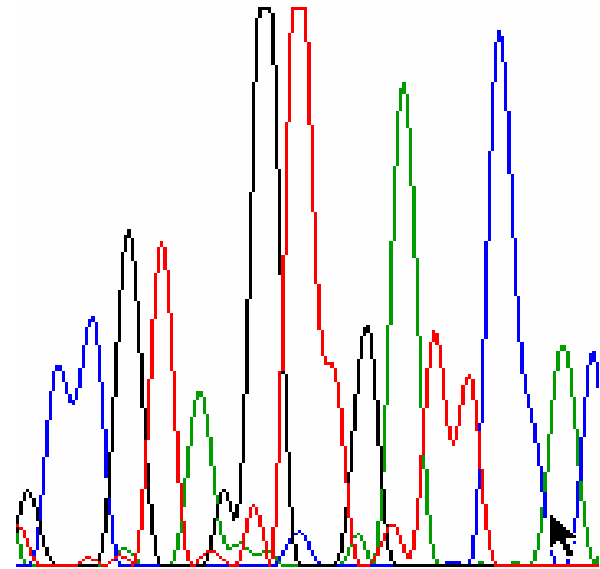
異常3

正常

異常3

KMS-34

G G C G C T G C C C C A C C A T  
I G G C A C T G C C C C C A C C A T



Codon 175  
CGC -> CAC  
Arg -> His

Codon 145  
TGG -> TAG  
Trp -> Stop

# 癌抑制遺伝子 p53 の突然変異の検討 [結果 iii]

アミノ酸配列の検討

正常	MEEPQSDPSV	EPPLSQETFS	DLWKLLPENN	VLSPLPSQAM	DDLMLSPDDI	EQWFTEDPGP	DEAPRMPEAA	PPVAPAPATPT	PAAPAPAPS
KMS-26	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
KMS-34	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	WPLSSSVPSQ	KTYQGSYGFR	LGFLHSGTAK	SVTCTYSPAL	NKMFCQLAKT	CPVQLWVDST	PPPGTRVRAM	AIYKQSQHMT	EVRRCPHHE
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	***H*****
	*****	*****	*****	*****	*****	**** (stop)			
	RCSDSDGLAP	PQHILRVEGN	LRVEYLDDRN	TFRHSVVVPY	EPPEVGSDCT	TIHYNMCNS	SCMGGMNRRP	ILTIITLEDS	SGNLLGRNSF
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	EVRVCACPGR	DRRTEENLR	KKGEPHHELP	PGSTKRALPN	NTSSSPQPKK	KPLDGEYFTL	QIRGRERFEM	FRELNEALEL	KDAQAGKEPG
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	GSRAHSSHLK	SKKGQSTSRH	KKLMFKTEGP	DSD					
	*****	*****	*****	***					

# インターフェロン (IFN) の増殖に及ぼす効果の検討

## [目的と方法]

・IFN とは、元来、ウイルスに対する感染防御機構として白血球より産生されるサイトカインである。また、抗ウイルス作用のほかに、細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果、マクロファージの活性化、NK細胞の活性増強、免疫応答調節作用などの、多面的な生物活性を示す。

・現在、IFN / は、その生物活性から、ウイルス性疾患 (B型肝炎、C型肝炎) や、癌/腫瘍性疾患 (腎癌、皮膚黒色種、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫) などの治療に臨床応用されている。

・骨髄腫に対する IFN の作用機序としては、インターロイキン6による増殖経路の抑制やアポトーシスの誘導が、報告されており、また臨床的にも維持療法として使用されているが、どのような細胞生物学的特徴を有する骨髄腫細胞に、どのようにして増殖抑制効果が発揮されるかは、不明の点も多い。

・そこで、今回は、本学樹立株を用いて、その効果を検討した。

・各細胞株を IFN 0, 250, 500, 750 および 1,000 units/ml と添加培養し、増殖を細胞数算定による増殖曲線と、WST-1 assay によって検討した。また、奇異的な増殖促進を示した細胞株では、シグナル伝達経路の阻害剤の効果を検討した。



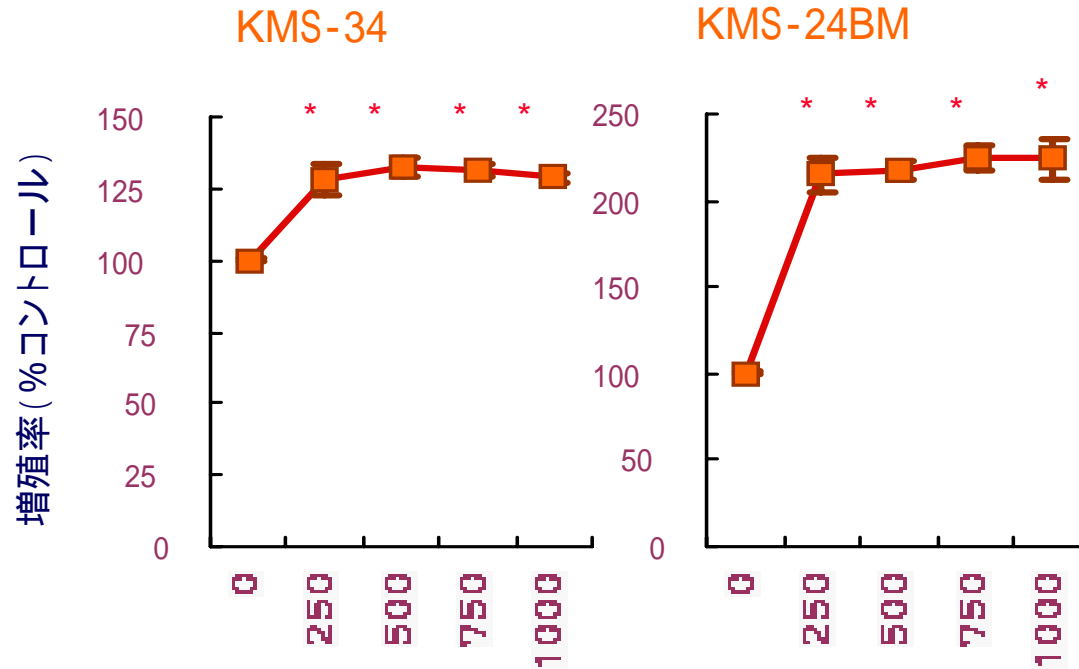
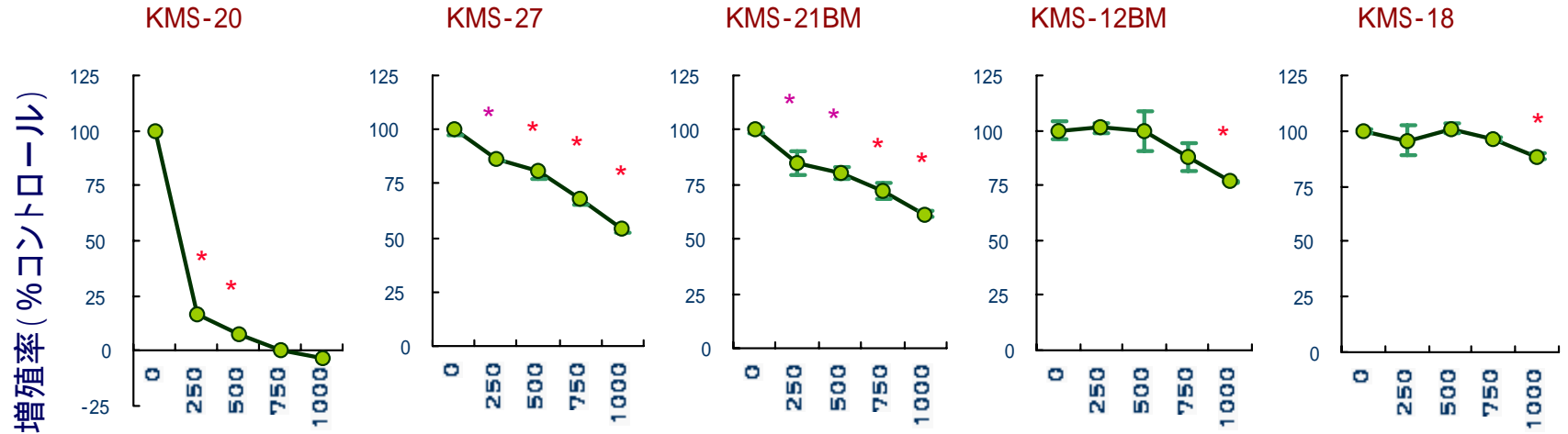
# インターフェロン (IFN) の増殖に及ぼす効果の検討

[結果 i]

5/14株では  
増殖抑制が  
認められた

7/14株では  
増殖動態への  
影響は認めら  
れなかった

2/14株では  
奇異的な  
増殖促進が  
認められた



IFN の濃度 (units/ml)

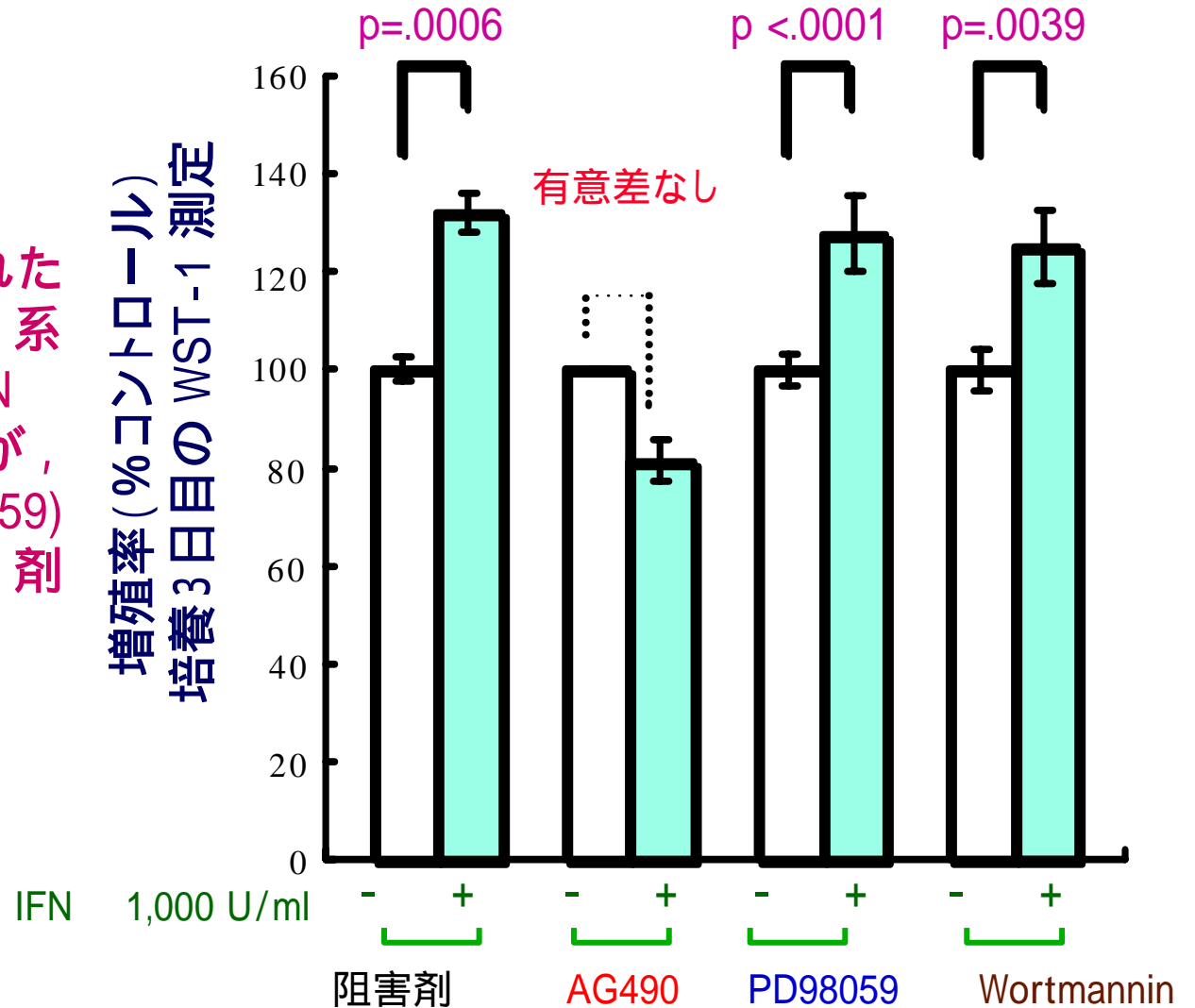
\* : p < .0001  
\* : p < .05

# インターフェロン (IFN)

# の増殖に及ぼす効果の検討

[結果 ii]

奇異的増殖促進が、認められた KMS-34 株では、JAK/STAT 系の阻害剤 AG490 によって、IFN による増殖促進が消失したが、MAP kinase 系阻害剤 (PD98059) や、PI3 kinase 系阻害剤 (Wortmannin) では、変化がなかった。



# <まとめと考察>

## p53 突然変異の検討

骨髄腫細胞の細胞生物学的検討を本学樹立14株を用いて行った。

発癌・進展に係わる遺伝子変化に関連して、癌抑制遺伝子 p53 の突然変異の検索を行った。現在まで、Exon 5 での KMS-26 および KMS-34 株における突然変異とそれに伴うアミノ酸配列の変化を検出した。

SSCP での検索では、他にも突然変異を起こしている可能性のある細胞株が認められるので、今後、更なる検討を加えていきたい。

## IFN の増殖に及ぼす効果の検討

臨床的にも維持療法で使用されている IFN の、骨髄腫細胞株の増殖に対する効果を検討した。

低濃度の共培養でも5/14株で有意な増殖抑制が認められた反面、2/14株では、奇異的な増殖促進が観察、この奇異的増殖促進には、JAK/STAT を介するシグナル伝達系が関与していることが、強く示唆された。

今後、増殖動態に関与する分子の抽出とシグナル伝達系との相互作用を検討し、適応症例の選別への有効な指標を確立していきたい。