

Octa-arginine mediated delivery of Wild-type Lnk protein inhibits Jak2-dependent leukemic cell growth by promoting apoptosis

著者	Looi Chung Yeng
号	80
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第2915号
URL	http://hdl.handle.net/10097/62118

氏名	ルイ チェン エン Looi Chung Yeng
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	2011年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Octa-arginine mediated delivery of Wild-type Lnk protein inhibits Jak2-dependent leukemic cell growth by promoting apoptosis (Octa-arginine を介して細胞内へ移送された野生型 Lnk は Jak2 依存性白血病細胞増殖をアポトーシスにより抑制する。)
論文審査委員	主査 教授 土屋 滋 教授 張替 秀郎 教授 阿部 俊明

論文内容要旨

Purpose:

1. To evaluate the delivery efficiency of WT Lnk R8 in hematopoietic cell-lines
2. To check whether delivered WT Lnk R8 function in cells and whether its inhibition effect is Jak2-specific
3. To determine the cell-growth inhibition mechanism by WT Lnk R8
4. To check whether delivered WT Lnk R8 is effective against cell-line harboring constitutively active Jak2 V617F.

Methods:

I first made a bacterial expression construct by fusing WT Lnk with membrane-permeable octa-arginine (R8) and purified the fusion protein from bacterial lysates. In addition, mutant Lnk R8 and BSA proteins were included as control. To study whether intracellularly delivered WT Lnk R8 inhibited TPO-induced growth in megakaryoblastic cell-line, M-MOK, I applied various concentrations of WT Lnk R8 and counted the number of viable cells for 2 days. Next, a Jak2-independent cell-line, COS-7 was treated with WT Lnk R8 and cell viability was determined through MTT assays. To find out the mechanism of cell-growth inhibition, I treated M-MOK cells with WT Lnk R8 and measured the fraction of Annexin V-FITC and PI staining through flow cytometry analyses. To find out whether penetrated WT Lnk R8 interacted with endogenous Jak2, I did immunoprecipitation with M-MOK lysates treated with WT or mutant Lnk R8 using anti-Jak2 antibody. To investigate the inhibition effect on downstream signaling after TPO stimulation in WT Lnk R8-treated cells, I did Western blotting to check the phosphorylation level of Jak2, STAT5 and MAPK molecules. Finally, to see whether WT Lnk R8

is effective against constitutively activation Jak2V617F, I co-cultured WT Lnk R8 with human erythroleukemic cell-line, HEL (Jak2 V617F positive) and counted the cell numbers for 2 days. The fraction of apoptosis and dead cells were determined by Annexin V-FITC and PI staining through flow cytometry analyses.

Results:

WT or mutant Lnk fused with R8 was efficiently delivered into M-MOK or HEL cell-lines compared to BSA. I found that delivered WT Lnk R8, but not mutant Lnk R8, blocked TPO-induced M-MOK megakaryoblastic leukemic cell proliferation in a dose and time-dependent manner. In addition, WT Lnk R8 has no growth inhibition effect on Jak2-independent COS-7 cells. The growth suppression in M-MOK was attributed to induction of apoptosis by WT Lnk R8, as showed by the increased Annexin V-positive fraction. Delivered WT Lnk R8 interacted with endogenous Jak2 and further Western blot analyses revealed that Jak-STAT and MAPK phosphorylation levels were significantly reduced in WT Lnk R8-treated M-MOK cells after TPO stimulation, suggesting blockage of early proliferative signaling. Finally, I showed that WT Lnk R8 retained the ability to attenuate cytokine-independent growth of HEL erythroleukemic cell-line with Jak2 V617F mutation and promoted apoptosis in these leukemic cells.

審査結果の要旨

博士論文題名 Octa-arginine mediated delivery of Wild-type Lnk protein inhibits Jak2-dependent
..... leukemic cell growth by promoting apoptosis (Octa-arginine を介して細胞内へ移送さ
..... れた野生型 Lnk は Jak2 依存性白血病細胞増殖をアポトーシスにより抑制する。)

所属専攻・分野名 医科学 専攻・ 小児病態学 分野

学籍番号 氏名 Looi Chung Yeng

未分化白血病患者から樹立した TPO 依存性に増殖する M-MOK 細胞株を用い、Lnk を標的とした増殖制御法の開発を試みた。Lnk は、造血幹細胞の維持・増殖に関わる SCF や TPO の下流でシグナル抑制因子として作用しているが、Lnk 蛋白にアルギニン(R)8 個を含むペプチドを付加することにより(野生型 Lnk R8)細胞膜を通過し、細胞内に取り込まれるようになる。このようにして Lnk を白血病細胞に過剰発現させることにより、白血病細胞の増殖制御が可能か否かについて検討した。

実験を始めるに当たり、野生型 Lnk と膜透過性 R8 の融合蛋白作製のための発現ベクターを用い、細菌の lysate から融合蛋白を精製した。同時に変異型 Lnk R8 と BSA R8 発現ベクターを作製し、同じく lysate から融合蛋白を精製した。用いた細胞株は、1)TPO 依存性細胞株 M-MOK、2)Jak2 非依存性細胞株 COS-7、3)Jak2 V617F 変異陽性赤白血病細胞株 HEL の 3 株である。細胞のアポトーシス誘導は、Annexin V FITC と PI 染色により検討した。細胞内に取り込まれた Lnk R8 が Jak2 と結合しているかどうかは、免疫沈降・ウェスタンブロット法、Jak2、STAT5 および MAPK のリン酸化はウェスタンブロット法にて検討した。

本研究において、アルギニン 8 個を結合させた野生型 Lnk も変異型 Lnk も容易に細胞膜を通過し、細胞内に取り込まれることが示された。しかも、野生型 Lnk のみが TOP 依存性に増殖する M-MOK の増殖抑制効果を示し、変異型 Lnk R8 は増殖抑制効果が認められなかった。したがって Lnk の増殖抑制効果には変異のない Lnk が必須である。野生型 Lnk R8 の増殖抑制効果は、野生型 Lnk R8 の培地中への添加時間や添加量に依存していた。加えて、Jak2 非依存性 Cos7 細胞株に野生型 Lnk R8 を添加しても何ら抑制効果は示されなかった。したがって野生型 Lnk R8 の増殖抑制効果には、Jak2 を介したシグナルが必須である。野生型 Lnk R8 の増殖抑制効果は、フローサイトメーターによる検索の結果、Annexin V 陽性分画の増加が認められ、アポトーシスによるものであることが示唆された。細胞内に取り込まれた野生型 Lnk R8 は、内因性 Jak2 と結合し、その結果 Jak-STAT と MAPK のリン酸化が著しく減弱していることが、ウェスタンブロット法にて示された。このことは、野生型 Lnk R8 が TPO による初期増殖シグナルを Jak2 を介して抑制していることを示唆した。最後に野生型 Lnk R8 は、TPO 依存性細胞株 M-MOK のみではなく、Jak2 V617F 変異を持つ HEL 赤白血病細胞株においても細胞増殖抑制効果と、アポトーシス促進効果を有することが示された。

以上のことから、培地中に添加された野生型 Lnk R8 は、自由に細胞膜を通過し細胞内に入り込み、Jak2 と結合することにより細胞増殖制御とアポトーシスを惹起することが明らかとなった。このことは、蛋白質導入法による新規の分子標的療法の可能性に道を開くものであり、学位論文に十分値する。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。