

白血病細胞株K562の基礎的性質に関する研究

人間科学研究科 博士前期課程 1 年 大平 直子

1. はじめに

赤血球、白血球、血小板からなる血液細胞はいずれも骨髄に存在する造血幹細胞から産生される。造血幹細胞は自身と同じ幹細胞を産生する自己複製能力と、各種の血球に成長していく分化能の両方を持っている。そして幹細胞から各血球への分化のメカニズムには様々なサイトカインや細胞内タンパク質の関与が考えられている。このうちクロマチン制御分子SATB1 (special AT-rich sequence binding protein) は、胸腺における造血幹細胞からTリンパ球への分化に重要な物質と考えられているが、他の機能を持つ可能性もある。今後赤血球分化におけるこのSATB1の役割を明らかにすることを研究の主題としたいと考えているが、研究に際しては慢性骨髄性白血病細胞株K562を使用して実験を行なっていく予定であり、今回はそのために必要なK562細胞の基礎的な性質について検討を行った。

K562細胞は慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia以下CML)の急性転化期の患者胸水から樹立された細胞株である。K562細胞はCML急性転化期の患者に由来することから多能性幹細胞的性質を有し複数の成熟血球系統へ分化することが可能であり、種々の物質によって赤芽球系細胞や巨核球系細胞へ分化する事が知られている。赤血球分化におけるSATB1の機能解析を行う際にはK562細胞の培養細胞としての基礎的性質を知ることが必要と考えられ、本稿ではこれらの検討について報告する。

2. 材料と研究方法

1) 細胞と培養液

K562細胞 (理化学研究所) は10%ウシ胎児血清含有RPMI1640 (富士フィルム和光純薬) を

用いて37℃ 5%CO₂環境で培養した。

赤血球分化誘導実験においては、ヘミン (Sigma) を各種濃度で培養液に添加しK562細胞の変化を観察した。またチロシンキナーゼ阻害薬がK562細胞の増殖に対して及ぼす影響を確認するため、イマチニブ (東京化成工業) の添加実験を行った。

2) 細胞増殖アッセイ

細胞増殖の評価はK562細胞を96ウェルプレートで培養し、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (タカラバイオ) を用いて行った。WST-1 試薬 (テトラゾリウム塩) は生存細胞にだけ活性のあるコハク酸テトラゾリウム還元酵素によりホルマザンに分解される。吸光度計で吸光度を測定することでホルマザン色素を定量することができ、細胞増殖能力を見ることが可能になる。

3) ベンジジン染色

K562細胞の赤血球分化についてはヘモグロビン合成を指標とし、ベンジジン染色によって評価した。ベンジジン (o-Dianisidine、東京化成工業) を用いてベンジジン溶液 (ベンジジン 2 mg/ml, 3 %酢酸) を作成し、この溶液10 μ lに30%過酸化水素水 1 μ lを添加し30分間室温で染色した。その後光学顕微鏡で200細胞中のベンジジン陽性細胞数を計測した。

3. 結果

1) K562細胞の増殖能についての検討

細胞増殖能の検討については96ウェルプレートに細胞浮遊液を様々な濃度に調整して培養を行った。WST-1 アッセイにより測定した結果、試薬の添加などによる細胞増殖能の比較検討を行う際には細胞数を 1×10^5 /mlの濃度で培養することにした。

2) ヘミンによる赤血球分化能の検討

ヘミンによってK562細胞が赤血球へ分化する可能性について検討した。12ウェルプレートに細胞数 $1 \times 10^5/\text{ml}$ になるようにK562細胞を調整して準備し、これにヘミンを最終濃度 $30 \mu\text{M}$ および $60 \mu\text{M}$ となるように希釈してウェルに添加した。ヘミン添加 2 日目の検討で、培養液は図 1 のようになり、K562細胞は濃度依存性にヘモグロビン合成を伴う赤血球系細胞への分化を示したと考えられた。さらにベンジジン染色を用いて定量的に検討を行ったところ、いずれも200細胞の検討で、ヘミン濃度 $30 \mu\text{M}$ および



図 1 K562の赤血球細胞への分化 (ヘミン添加 2 日目) 左からヘミン 0、30、60 μM

$60 \mu\text{M}$ においてヘモグロビン合成が確認された (図 2)。

3) K562細胞のイマチニブ感受性に関する検討

イマチニブはCMLのチロシンキナーゼ活性を抑制することで白血病細胞の細胞死を誘導する。細胞数 $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整したK562細胞を96ウェルプレートに播種し、イマチニブを $1 \mu\text{M}$ または $10 \mu\text{M}$ となるように添加し時間経過を追ってWST-1 アッセイを行なった。その結果イマチニブは $1 \mu\text{M}$ および $10 \mu\text{M}$ で強い細胞増殖抑制効果を示した (図 3)。

4. 考察

今回の報告では、K562細胞の増殖傾向、ヘミンによる赤血球への分化能などを確認することができた。SATB 1 はクロマチン制御因子として働き、造血細胞の分化系統を誘導する遺伝子群の発現を上位から調節している可能性がある。今後SATB 1 をノックアウトしたK562細胞

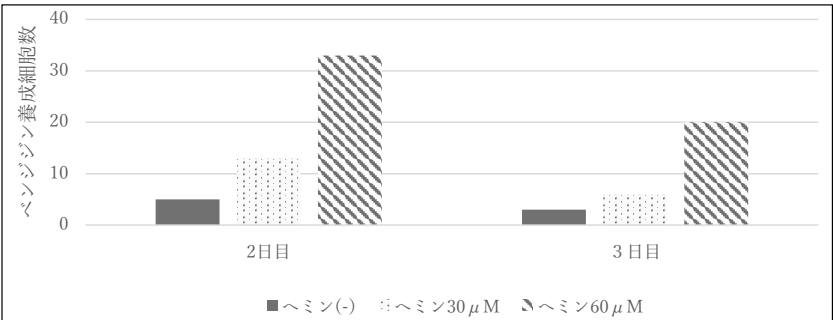


図 2 K562の赤血球系細胞への分化 (ベンジジン染色)

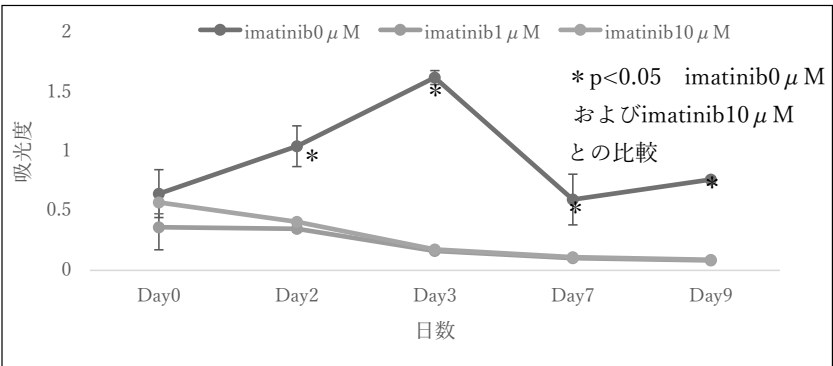


図 3 WST 1 assay imatinib投与

が得られれば、赤血球分化におけるSATB1の機能などを検討できるのではないかと考えている。また今回イマチニブによるK562細胞の増殖抑制を確認したが、この際赤血球への分化が起こることが報告されている。この点においてもSATB1は何らかの影響を及ぼす可能性がある。一方SATB1は乳癌細胞の増殖能と転移能を増強するという報告もあり、これらの点についても今後検討が可能ではないかと考えている。

5. 引用文献

- Alvarez, J. D., Yasui, D. H., Niida, H., Joh, T., Loh, D. Y., & Kohwi-Shigematsu, T. (2000) The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes & Development*, 14(5), 521-535
- Drucker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J. & Lydon, N. B. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2(5), 561-566
- Hann, H. J., Russo, J., & Kohwi-shigematsu, T. (2008) SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumor growth and metastasis. *Nature*, 452, 187-193
- 小磯邦子, 中島修, 松村大輔, 藤本康之, 橋本祐一 (2000) ヒト白血病細胞K562の細胞分化における化学制御, *薬学雑誌*, 120 (1), 114-112
- 小野孝明 (2022) 慢性骨髄性白血病における診断と治療のキーポイント (2022) *日本内科学会雑誌* 111(7), 1357-1363
- Satoh, Y., Yokota, T., Sudo, T., Kondo, M., Lai, A., Kincade, P. W., Kouro, T., Iida, R., Kokame, K., Miyata, T., Miyata, T., Habuchi, Y., Matsui, K., Tanaka, H., Matsumura, I., Oritani, K., Kohwi-Shigematsu, T., Kanakura, Y., (2013) The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation towards lymphoid lineages, *Immunity*, 38(6), 1105-1115