

白血病細胞株 K562 を用いた赤血球分化に関する基礎的研究

佐藤 友亮^{*1}、浅沼 萌花^{*2}、大辻 瑠倫^{*2}、
塚本 皐月^{*2}、大平 直子^{*3}、高比良 響^{*4}

Fundamental Traits of K562 for the Study of SATB1-Induced Erythroid Differentiation

SATOH Yusuke^{*1}, ASANUMA Moeka^{*2}, OTSUJI Ruri^{*2},
TSUKAMOTO Satsuki^{*2}, OHIRA Naoko^{*3}, TAKAHIRA Hibiki^{*4}

*1 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 教授

*2 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 4年生

*3 神戸女学院大学大学院 人間科学研究科 博士前期課程

*4 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 嘱託教学職員

連絡先：佐藤友亮 ysatoh@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

本研究は、赤血球分化におけるクロマチン制御分子 SATB1 の役割を明らかにすることを目的としている。血液細胞からの赤血球分化の実験モデルとして、慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を使用することとした。本稿では、この研究プロジェクトの開始に際して行った K562 細胞の基礎的研究について報告する。ヘミンによる K562 細胞の赤血球系への分化誘導条件を検討した。その結果、ヘミン濃度 $60\text{ }\mu\text{M}$ が、 $30\text{ }\mu\text{M}$ よりもより有効に赤血球系への分化を誘導することが明らかになった。また、イマチニブによる K562 細胞の増殖に与える影響を検討したところ、イマチニブ濃度 $1\text{ }\mu\text{M}$ および $10\text{ }\mu\text{M}$ の双方において、K562 細胞の強い増殖抑制が認められた。SATB1 の赤血球分化における機能を明らかにするため、ゲノム編集技術を用いて K562 における *SATB1* ノックアウトを試みた。リアルタイム RT-PCR 法を用いて、複数のノックアウトクローンにおける *SATB1* の発現確認を行ったが、*SATB1* の遺伝子欠失を確認できなかった。今後、*SATB1* ノックアウト K562 細胞を樹立し、赤血球分化における SATB1 の機能を解析する予定である。

キーワード：赤血球分化、SATB1、K562、慢性骨髄性白血病

Abstract

We previously identified a special AT-rich sequence-binding protein 1 (SATB1)— a global chromatin organizer, as a lymphoid-lineage-inducing gene in Hematopoietic stem cells. SATB1 is involved in the tissue-specific organization of DNA sequences, regulation of gene expression, and designation of region-specific histone modifications. Moreover, during early erythroid development, SATB1 may regulate the expression of globin genes. Therefore, we launched a new research project exploring the roles of SATB1 in erythroid differentiation using the chronic myeloid leukemia cell line K562. First, we evaluated the fundamental traits of K562 cells and confirmed that K562 cells more readily differentiated into erythroid cells at a hemin concentration of $60\text{ }\mu\text{M}$ than of $30\text{ }\mu\text{M}$. Next, we assessed the effects of a tyrosine kinase inhibitor, imatinib, on K562 cell proliferation in vitro. At imatinib concentrations of 1 and $10\text{ }\mu\text{M}$, K562 cell proliferation was markedly suppressed. Currently, we are attempting to establish SATB1-knockout clones of K562 cells through genome editing. In future research, we intend to evaluate the roles of SATB1 in erythroid differentiation using SATB1-knockout K562 cells.

Keywords: erythroid differentiation, SATB1, K562, Chronic Myeloid Leukemia

1 はじめに

クロマチン制御分子 SATB1

血液細胞は、白血球、赤血球、血小板という3種類の細胞で構成されている。すべての血液細胞は、造血組織である骨髓に存在する造血幹細胞から生み出される。造血幹細胞は、各血球系統の前駆細胞を経て、成熟血球へ分化（differentiation）する。造血幹細胞の特徴は、自分自身と同じ造血幹細胞を生み出す自己複製能と、多種類の成熟血球を生み出す多分化能の両方を有していることである。我々のグループは過去の研究において、造血幹細胞から最も未熟なリンパ球へと分化する段階において、クロマチン制御分子 SATB1（special AT-rich sequence-binding protein 1）が重要な役割を持っていることを見いだした¹⁾。SATB1 は、造血幹細胞からリンパ球系へ分化するにつれて発現量が上昇するが、造血幹細胞が骨髓球・赤芽球系へ分化する場合は、発現量が減衰する。また、造血幹細胞は、加齢にともなってリンパ球産生能力が低下することが知られているが、我々は、加齢した造血幹細胞において、*SATB1* 遺伝子の発現量が低下していること、そして、加齢した造血幹細胞へ外来性に SATB1 を導入することで、リンパ球産生能力を部分的に回復させられることを明らかにした¹⁾。このように、SATB1 は、造血幹細胞の分化（運命決定）に関与している分子である。

SATB1 は、もともと胸腺での T リンパ球分化において重要な役割を持つことが知られていたが²⁾、我々が見いだした造血幹細胞からのリンパ球初期分化以外にも、その機能に関する報告がある。Wen らは、早期の赤芽球系分化において、SATB1 ファミリー分子が *globin* 遺伝子の発現に関わっているという報告をしている³⁾。本研究は、赤血球分化における SATB1 の役割を明らかにすることを大きな目的としている。そして、血液細胞からの赤血球分化の実験モデルとして、慢性骨髓性白血病細胞株 K562 を使用することとした。

慢性骨髓性白血病細胞株 K562

K562 細胞は、慢性骨髓性白血病の急性転化期の患者胸水から樹立された細胞株である⁴⁾。慢性骨髓性白血病（Chronic Myeloid Leukemia：CML）は、造血幹細胞で特定の遺伝子異常が起こることにより発症する。9番と22番染色体の転座によって *BCR-ABL* という異常な融合遺伝子が生まれ、これによって造血幹細胞の白血病化（異常増殖）が引き起こされる。CML 幹細胞（*BCR-ABL* 融合遺伝子が生じた造血幹細胞）は、成熟血球への分化能力を有しているため、CML 患者では、白血球、赤血球、血小板の増殖、とくに白血球と血小板の増加がみられる。CML は、緩徐な経過で進行し、無治療の場合は約5年の慢性期を経て、移行期から急性転化期へと進み、死に至る⁵⁾。CML 急性転化期の患者に由来する細胞株 K562 は、多能性幹細胞的性質を有しており、複数の成熟血球系統へ分化することができる。具体的には、K562 は TPA によって単球/マクロファージ、あるいは巨核球（血小板を生み出す細胞）へ分化する。また、ヘミン、ビタミン B₁₂ などの薬物によって、赤芽球へ分化することが知られている⁶⁾。

K562 の赤血球分化における SATB1 の役割を解析する

我々は、クロマチン制御分子 SATB1 の赤血球分化における役割を解析するため、K562 細胞の赤血球分化モデルを使用することとした。本稿においては、この研究プロジェクトにおける最初の 3 項目、① K562 細胞の培養細胞としての基礎的性質の検討、② K562 細胞からの赤血球分化モデルの確立、③ゲノム編集技術を用いた、*SATB1* ノックアウト K562 細胞の樹立（途中経過）について報告する。③の *SATB1* 遺伝子ノックアウト K562 については、現時点では樹立に至っておらず、これまでの経過と今後の展望について示すこととなる。

2 材料と研究方法

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 RPMI-1640（富士フィルム和光純薬）を用いて、37℃、5 % CO₂ 環境で培養した。

K562 細胞の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た。また、K562 細胞の増殖に対してチロシンキナーゼ阻害薬イマチニブが及ぼす影響を確認するため、イマチニブ（東京化成工業）添加実験を行った⁷⁾。

細胞増殖アッセイ

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）を用いて細胞増殖の検討を行った。

ベンジジン染色

K562 細胞の赤血球分化を、ヘモグロビン合成を指標として行った（ベンジジン染色）。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、本溶液 10 ml と 30%過酸化水素水 1 ml を洗浄後の細胞懸濁液に添加して、30 分室温で染色した。染色後、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。

ゲノム編集による SATB1 ノックアウト

K562 細胞における *SATB1* ノックアウト（*SATB1* ノックアウトベクターの導入）は、セツロテック社への受託研究として行った。*SATB1* ノックアウトベクター導入後のバルク細胞を本研究室においてクローニングした。単一細胞由来の複数クローンについて、*SATB1* ノックアウトの確認のため、リアルタイム RT-PCR を行った。

リアルタイム RT-PCR

RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用い、cDNA 合成は、QuantiTect Reverse Transcription Kit（QIAGEN）を用いて行った。リアルタイム PCR は、QuantiTect SYBR Green PCR Kit（QIAGEN）を用いた。プライマーは、ヒト *SATB1* および、ヒト *GAPDH*（キャリアプレート遺伝子）に対するデザイン済みプライマー、QuantiTect Primer Assays（QIAGEN）

を使用した。リアルタイム RT-PCR には、MyGO pro（フナコシ）を用いた。サンプルの定量解析は、 $\Delta\Delta C_t$ 法によって行った。

3 結果

K562 細胞の増殖能の検討

K562 細胞の *in vitro* 培養における基礎的性質を確認するため、細胞増殖能の検討を行った。細胞浮遊液の濃度を、 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $5.0 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 、 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ の 4 条件に調整し、96 ウェルプレートを用いて培養を開始した。Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System（以下、WST-1 アッセイ）による検討の結果、 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$ と $5.0 \times 10^4/\text{mL}$ の培養条件では、緩徐ながらも培養開始後 4 日目まで、持続的な細胞増殖（生細胞の増殖を反映した吸光度の上昇）が認められた（図 1）。一方、 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ と $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ の条件では、より顕著な細胞増殖傾向が認められた。 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ の条件では 3 日目で細胞増殖がピークになった。これは、培養ウェルがコンフルエントとなり、4 日目には急速に生細胞数が低下したことを示している（図 1）。 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ の条件でも 3 日目が細胞増殖のピークとなり、4 日目には生細胞数の低下が認められた。しかし、 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ の培養条件の方が、 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ の培養条件よりも、生細胞数の減少傾向は弱かった。以上の結果より、試薬の添加や遺伝子改変による細胞増殖能の比較検討を行うには、細胞濃度を $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ として培養を開始するのが適切と考え、今後の *in vitro* 培養実験では、細胞浮遊液濃度を、 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ で培養を開始することとした。

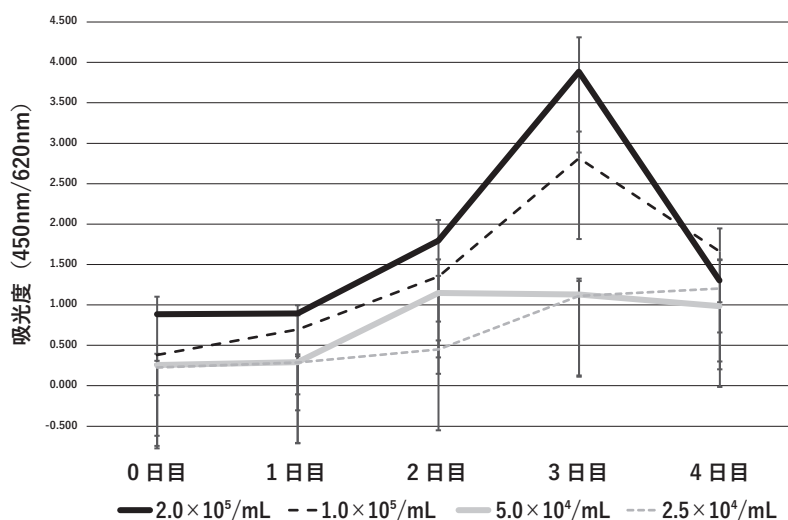


図 1. K562 細胞の増殖能の検討（WST-1 アッセイ）

ヘミンによる赤血球分化能の検討

K562 細胞の赤血球分化能を検討した。12 ウェルプレートに、 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ に調整した K562 細胞を 1 mL 用意し、ヘミンを最終濃度 $30 \mu\text{M}$, $60 \mu\text{M}$ になるように添加した。ヘミン添加 4 日目の検討において、K562 細胞は、ヘミンの濃度依存性にヘモグロビン合成を伴う赤血球系細胞（赤芽球）へ分化傾向を示した（図 2）。さらに、ヘミンによる赤血球系への分化誘導を、ベンジジン染色法を用いて定量的に検討した。200 細胞の検討において、ヘミン濃度 $30 \mu\text{M}$ の条件では、ベンジジン陽性細胞が 21 個（10.5%）（4 日目）、13 個（6.5%）（7 日目）と推移した。一方、ヘミン濃度 $60 \mu\text{M}$ の条件では、ベンジジン陽性細胞が 30 個（15%）（4 日目）、34 個（17%）（7 日目）と、より強い K562 細胞の赤血球への分化傾向を認めた（図 3）。

K562 細胞のイマチニブ感受性の検討

慢性骨髄性白血病細胞は、*BCR-ABL* 融合遺伝子によってチロシンキナーゼ活性が異常に上昇し、強い細胞増殖能力を獲得する。イマチニブは、慢性骨髄性白血病細胞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⁷⁾。次に我々は、K562 細胞のイマチニブ感受性を検討した。 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ の K562 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、最終濃

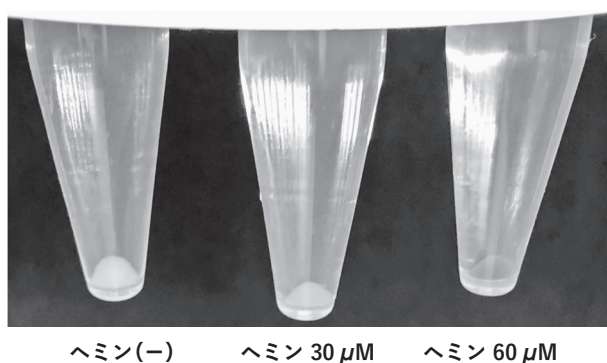


図 2. K562 の赤血球系細胞への分化（ヘミン添加 4 日目）

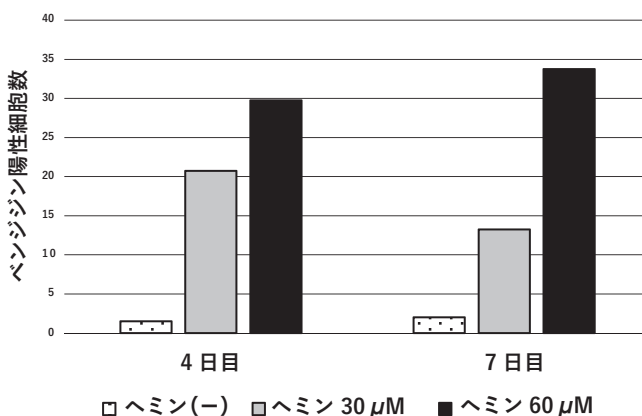


図 3. K562 の赤血球系細胞への分化（ベンジジン染色）

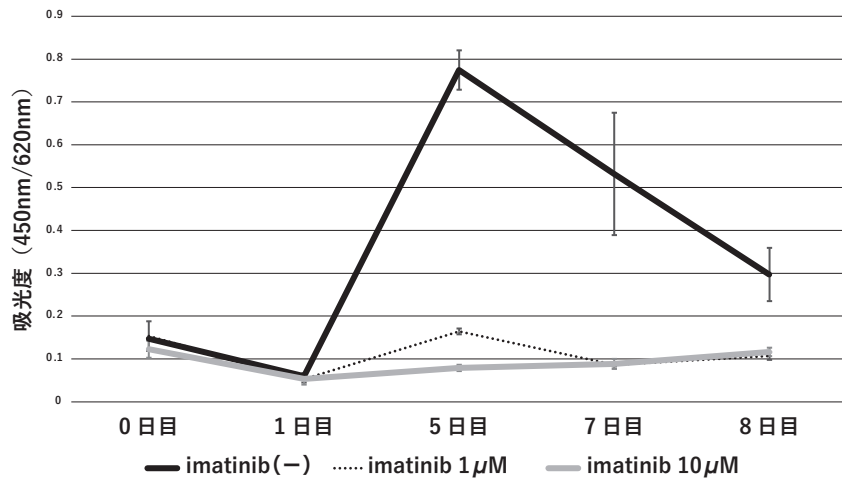


図4. K562の増殖能に対するイマチニブの影響 (WST-1 アッセイ)

度 1 μM または 10 μM となるようにイマチニブを添加して WST-1 アッセイを行った。その結果、イマチニブは、過去の報告と同様に⁷⁾、1 μM と 10 μM の両方において、強い細胞増殖抑制効果を認めた (図4)。

K562 細胞におけるゲノム編集を用いた *SATB1* 遺伝子ノックアウトの試み

細胞増殖や赤血球分化、さらにはイマチニブ感受性における *SATB1* の機能を明らかにするために、K562 細胞における *SATB1* のノックアウトを試みた。*SATB1* ノックアウトベクターを導入した K562 細胞を、ピューロマイシンを用いて薬剤選択し、単一細胞由来の 6 クローンを樹立した。これらのクローンにおける *SATB1* 欠失 (ノックアウト) を確認するため、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、*SATB1* 遺伝子の発現確認を行った。その結果、ノックアウトクローン 2 (KO Cl2) では、対照 K562 細胞におけるヒト *SATB1* の発現値を 1 とした場合の発現相対値が 1.61 と、*SATB1* の発現低下を認めなかった (図5)。また、ノックアウトクローン 5 (KO Cl5) においては、対照 K562 細胞と比較して、ヒト *SATB1* の発現が相対値 0.88 と若干の *SATB1* 発現低下を認めたものの、遺伝子発現が十分に認められており、*SATB1* 遺伝

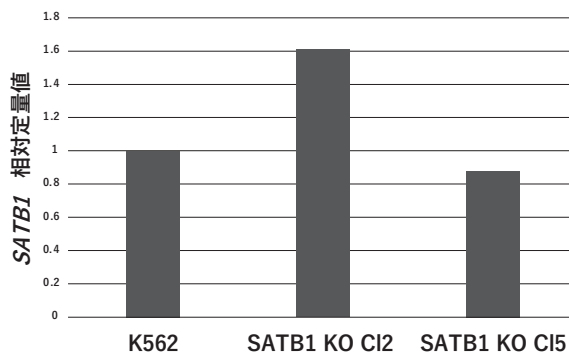


図5. *SATB1* 遺伝子発現解析

子欠失（ノックアウト）は確認できなかった（図5）。この結果は、他のクローン（KO C11, 3, 4, 6）でも同様だった。

4 考 察

本研究は、SATB1 の赤血球分化における機能解明を目的としている。この目的のために実験材料として、慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を使用することとした。第一段階として、K562 細胞の赤血球分化能を含めた基本的性質を確認し、結果を本稿において報告した。造血幹細胞からの赤血球系分化には、GATA-1 などの転写因子が重要な役割を担っている⁸⁾。クロマチン制御分子として働く SATB1 は、GATA-1 をはじめとする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。今回報告した研究において、K562 細胞の増殖傾向、赤血球への分化能などを確認することができた。今後、K562 細胞における SATB1 のノックアウトを行うことで、赤血球分化における SATB1 の役割を検討する予定だが、これまでの研究では、*SATB1* 遺伝子を欠失（ノックアウト）させた K562 細胞の樹立には至っていない。K562 細胞へのノックアウトベクター導入は確認できていることから、①さらに多くの単一細胞由来のノックアウトクローンの樹立、② *SATB1* 遺伝子内の他の遺伝子配列に対するゲノム編集、などを行うことで、引き続き K562 細胞における *SATB1* 遺伝子欠失を実現させる予定である。

チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブは、慢性骨髄性白血病細胞の細胞死を誘導するとともに、赤血球系への分化を誘導することが報告されている⁷⁾。K562 における *SATB1* ノックアウトは、イマチニブによる赤血球系への分化誘導にも何らかの影響を及ぼす可能性がある。また、SATB1 の発現は、乳がん細胞の増殖能と転移能を増強と言われており⁹⁾、K562 細胞における *SATB1* ノックアウトは、K562 細胞の増殖や、イマチニブによる殺細胞効果に影響を与える可能性がある。K562 細胞の *SATB1* ノックアウトを実現させることで、今後これらの研究をさらに進めていく予定である。

文献と註

- 1) Satoh, Y., Yokota, T., Sudo, T., et al. (2013). The Satb1 protein directs hematopoietic stem cell differentiation toward lymphoid lineages. *Immunity*, 38(6), 1105-1115.
- 2) Alvarez, J. D., Yasui, D. H., Niida, H., et al. (2000). The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev*, 14(5), 521-535.
- 3) Wen, J., Huang, S., Rogers, H., et al. (2005). SATB1 family protein expressed during early erythroid differentiation modifies *globin* gene expression. *Blood*, 105(8), 3330-3339.
- 4) Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3), 321-334.
- 5) 小野孝明, 「慢性骨髄性白血病における診断と治療のキーポイント」, 日本内科学会雑誌, 111(7), 1357-1363 (2022).
- 6) 小磯邦子, 中島 修, 松村大輔 他, 「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), 104-112 (2000).
- 7) Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., et al. (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.
- 8) Orkin S.H. (1990). Globin gene regulation and switching: circa. *Cell*, 63(4), 665-672.
- 9) Han, HJ., Russo, J., Kohwi, Y., et al. (2008). SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature*, 452, 187-193.

(原稿受理日 2022年 9 月18日)