

ミニ・レビュー

インターロイキン6による骨髓腫細胞の増殖機構

石川秀明

山口大学医学部応用医工学系・寄生体学講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words: 骨髓腫, 細胞増殖, インターロイキン6, CD45, src型チロシンキナーゼ

はじめに

Bリンパ球は, 細胞表面免疫グロブリン (Ig) (B細胞抗原受容体; BCR) を介して抗原を認識して活性化され, 一部の細胞は形質細胞と呼ばれる抗体産生細胞に分化する。

ヒト骨髓中の形質細胞が腫瘍性に増殖している疾患が多発性骨髓腫であり, 腫瘍細胞から分泌されるIgが蓄積してM蛋白血症を引き起こす。本稿では骨髓腫細胞の増殖機構を, その増殖因子であるインターロイキン6 (IL-6) を中心に, その他の分子との関わりも含めて概説する。

骨髓腫細胞の不均一性

同一患者において骨髓腫細胞が単クローン性であることは, Ig遺伝子の再構成パターンが単一であることから証明される。にもかかわらず, 骨髓腫細胞は形態学的にも表面抗原の解析からも多様性に富む不均一な細胞集団である。Bリンパ球は形質細胞に分化するとCD38抗原が強陽性となり¹⁾, 接着分子MPC-1²⁾ およびCD49e (VLA-5) 抗原の発現の有無により未熟, 中間型および成熟形質細胞に識別される³⁾ (図1)。さらに, 前駆形質細胞は最終的に成熟形質細胞へと分化誘導可能であり, 骨髓腫細胞の不均一性は, そのまま形質細胞の分化度を反映していると考えられる。

骨髓腫細胞の増殖因子

concanavalin A (Con A) 刺激末梢単核球培養上清中に骨髓腫細胞のin vitro増殖を促進する活性が見出され, その本体が既に他の研究者によってB細胞分化因子として同定され, マウス形質細胞腫の増殖因子でもあるIL-6と同一であることが判明した⁴⁾。

BALB/cマウスの腹腔にミネラルオイル (プリステン) を注入すると単クローン性形質細胞腫ができるが, それはプリステン投与によりIL-6の産生が高まっているためと考えられた⁵⁾。事実, IL-6遺伝子を強制発現させたBALB/cトランスジェニックマウスには単クローン性形質細胞腫が認められた⁶⁾。さらに, IL-6遺伝子欠損BALB/cマウスでは, プリステン投与後に形質細胞腫が認められない^{7,8)}ことから, IL-6がin vivoでも形質細胞腫の発症要因であることが確認された。

骨髓腫細胞の主要な増殖因子であるIL-6は, マクロファージなどの骨髓ストローマ細胞, および骨髓腫細胞自身から供給されている。

IL-6のgp130を介する刺激伝達

IL-6は, マクロファージや活性化されたT細胞などから産生されるサイトカインであり, 分子量26kDの糖蛋白質である。IL-6受容体は, IL-6が直接結合する分子量80kDの α 鎖 (IL-6R α) と刺激伝達を担う分子量130kDの糖蛋白gp130の複合体よりなる。gp130は, IL-6ファミリーに属する他のサイトカイン受容体の共通刺激伝達因子でもあ

平成14年6月25日受理

るが, gp130自身はキナーゼ活性を持たない. IL-6と結合したIL-6R α は, gp130と結合し, 六量体を形成すると考えられている. この複合体形成により, gp130に会合しているチロシンキナーゼJanus kinase (JAK) 同士がお互いのチロシン残基をリン酸化して活性型JAKとなり, gp130のチロシン残基をリン酸化する. gp130のリン酸化チロシン残基に転写因子signal transducer and activator of transcription (STAT) 3のSH2領域が結合し, 既にgp130と結合しているJAKによりSTAT3はチロシンリン酸化を受ける. リン酸化されたSTAT3はお互いのリン酸化チロシン残基とSH2領域の結合によって二量体を形成して活性型となり, 核に移行して種々の標的遺伝子の発現制御DNA領域に結合し, その発現を誘導する (JAK-STAT刺激伝達経路). 一方でgp130の別のリン酸化チロシン残基にSHP-2のSH2領域が結合し, このSHP-2分子を介してアダプター分子Grb2を引き寄せ, Grb2と結合しているSosがRasを活性型に変換する. 活性型Rasは, 引き続きRaf-MEK (MAPKK) - mitogen activated protein (MAP) kinaseのキナーゼカスケードを介して種々の転写因子を活性化する (Ras-MAPK刺激伝達経路). 骨髄腫細胞がIL-6に反応して増殖する際は, Ras-MAPKを介する経路の重要性が指摘されている^{9,10}.

IL-6による未熟骨髄腫細胞の増殖

多発性骨髄腫患者の骨髄には, 表面抗原の違いから未熟, 中間型および成熟の様々な分化段階の骨髄腫細胞が混在していることは先に述べたとおりである¹⁾: 未熟骨髄腫細胞は, IL-6に反応して増殖したが, 成熟骨髄腫細胞には増殖能は認められず, IL-6への反応性も欠如し, 逆にM蛋白産生能は上昇していた (図1)³⁾. このことは, 細胞周期を調節するサイクリン (cyclin) D1あるいはcyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, p16の発現の有無からも支持された. 未熟骨髄腫細胞は, G1期を進行させ得るサイクリンD1を発現し, G1期の進行を抑制するp16を発現していない. 逆に, 成熟骨髄腫細胞は, サイクリンD1の発現はなく, p16の発現が認められる (図1)¹¹⁾. つまり, IL-6に反応して増殖し得るのは未熟骨髄腫細胞群であるこ

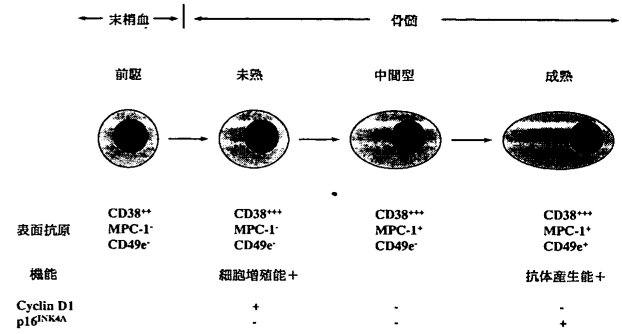


図1 骨髄腫 (形質) 細胞の分化過程

CD38, MPC-1, CD49eなどの表面抗原の発現で区別される. 細胞増殖が盛んな未熟骨髄腫細胞, 抗体産生能の高い成熟骨髄腫細胞など細胞生物学的性状も異なる.

とが明らかとなった.

未熟骨髄腫細胞のIL-6反応性増殖とCD45抗原の発現

形質細胞腫ではBリンパ球系列特異的抗原であるCD19や汎白血球抗原であるCD45などの発現が消失していることが比較的早くから知られていた. ところが, 骨髄腫患者から取り出した骨髄腫細胞を注意深く観察すると, 大多数のCD45陰性細胞の中に少数のCD45陽性腫瘍細胞を認めることができる. そして, 未熟骨髄腫細胞の中でも特に, CD45陽性細胞が増殖抗原であるKi-67で染色されることが解った¹²⁾. つまり, 未熟骨髄腫細胞がCD45分子の発現の有無でさらに二つの細胞群に分けられ, MPC-1-CD45⁺CD49e⁻の細胞がIL-6に反応して増殖していることを見出した¹²⁾. いくつかのヒト骨髄腫細胞株でCD45抗原の発現を調べると, IL-

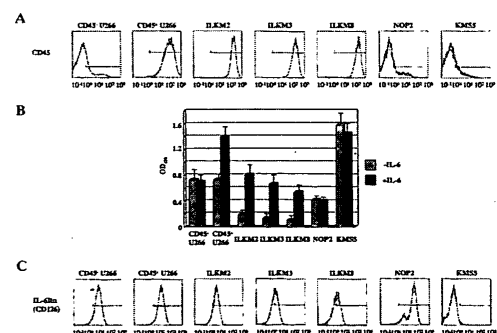


図2

CD45陽性骨髄腫細胞株はIL-6に反応して増殖する. CD45抗体 (A) またはIL-6R α 抗体 (C) によるフロー・サイトメーター. (B) DNA合成をBrdUの取り込みで測定した.

IL-6反応性に増殖しているものでは総じてCD45抗原を強く発現しており、IL-6とは無関係に増殖しているものではCD45抗原の発現を認めなかった(図2)^{13,14)}。U266という細胞株では、多数のCD45⁺細胞の中に少数のCD45⁻細胞が混在しており、それらを各々セル・ソーターで分離純化した後IL-6を加えると、CD45⁺U266の方だけがIL-6によって増殖が促進された。さらにCD45⁻U266はIL-6添加によりCD45の発現が誘導され、CD45⁺U266はIL-6除去によりCD45の発現が消失する¹³⁾ことから、CD45の発現はIL-6によって変化すると考えられた。

未熟骨髓腫細胞がIL-6に反応して増殖するためにはSTAT3とMAPKの活性化だけでは不十分である

CD45は膜貫通型のチロシン・フォスファターゼ(PTP)で、src型チロシン・キナーゼ(PTK)のカルボキシル末端チロシン残基を脱リン酸化することにより、その活性化に寄与することが知られている。BCRからの抗原刺激で成熟B細胞が増殖する場合にCD45分子が必須であることがCD45欠損マウスを使った実験から明らかにされている。

IL-6刺激で活性化される代表的な分子STAT3とMAPK(ERK1/2)は、CD45⁻およびCD45⁺U266両細胞で同程度に活性化されていた¹⁴⁾。ILKM2, ILKM3, ILKM8(CD45⁺でIL-6に反応して増殖する)やNOP2(CD45⁻でIL-6とは無関係に増殖する)など他の細胞株でも同様にIL-6に反応してSTAT3とERK1/2の活性化が認められた。よって、IL-6刺激によって活性化されるSTAT3とERK1/2だけでは骨髓腫細胞のIL-6反応性増殖には不十分であり、またCD45の発現はIL-6による両分子の活性化には影響を及ぼさないことが明らかになった。

CD45陽性骨髓腫細胞株に見られたsrc型PTKの活性化

CD45を発現する細胞株(CD45⁺U266, ILKM2, ILKM3とILKM8)でのみCD45PTPの基質であるsrc型PTK, LynまたはFynの活性が上昇していたが、このsrc型PTKの活性化はIL-6刺激によって

変化を受けなかった(図3)。さらに、CD45⁺U266で活性化されているLynの下流刺激伝達分子として、phospholipase C(PLC)- γ 2を介したCaイオンの細胞内増加とprotein kinase C(PKC)の活性化が示唆された。よって、骨髓腫細胞株では、CD45発現の有無により、細胞内src型PTKの活性化、並びにその下流刺激伝達因子の活性化の程度が異なっていると思われる。

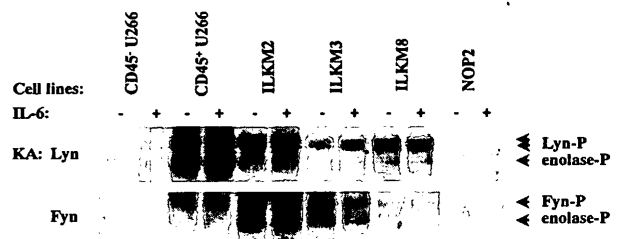


図3

src型PTKはCD45陽性骨髓腫細胞株でのみ活性化されている。LynまたはFynの活性をKinase assayで解析した。

CD45⁺骨髓腫細胞株のIL-6反応性増殖におけるsrc型PTK活性化の重要性

Lynに特異的な二種類のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを合成し、細胞に投与したところ、CD45⁺U266のIL-6反応性増殖は顕著に抑制された。この時、Lyn蛋白質の発現は減少していたが、STAT3, MEK1/2(MAPKK), ERK1/2蛋白質量に変化はなかった。また、src型PTK選択的阻害剤PP2処理によってもCD45⁺U266のIL-6反応性増殖は同様に抑制された。PP2はSTAT3とERK1/2の活性には影響を及ぼさなかったことから、CD45⁺骨髓腫細胞で見られるsrc型PTKの活性化はIL-6刺激で活性化されるSTAT3とERK1/2とは独立したものと考えられた。従って、CD45⁺U266がIL-6に反応して増殖するためにはLynの活性が必須であることが示された。

おわりに

免疫系を含めて種々の生体系を制御する液性因子サイトカインの作用並びにその作用機序が明らかにされつつある。多くの場合、一つのサイトカインが

異なった細胞に非常に多様な影響を及ぼし、また、異なったサイトカインが細胞内ではかなり共通の刺激伝達経路を活性化している可能性が指摘されている。つまり、サイトカインの作用は細胞種に依存して決定され、サイトカインの特異性もまた細胞内環境に依存していると考えられる。今後の研究は、サイトカイン刺激によって引き起こされる刺激伝達因子の活性化が細胞内のどのような分子によって影響を受け、制御されているのかを探る段階に入っていくと思われる。

IL-6は骨髄腫細胞の増殖因子であるが、他の細胞では全く異なる作用を発揮することが知られている。例えば、マウス白血病細胞株M1はIL-6によって増殖を停止し、単球系細胞に分化する。しかし、この相反するIL-6の作用を、全く異なる細胞種間の比較により判断することは困難である。そこで、IL-6が細胞に及ぼす影響の多様性を理解しようとする時、骨髄腫細胞は格好の材料となった。

骨髄腫細胞は未熟、中間あるいは成熟型に分けられ、それら細胞亜群の細胞生物学的性状は大きく異なる。そしてCD45抗原を発現する未熟骨髄腫細胞こそがIL-6に反応して増殖する細胞群であり、CD45の発現の有無、またはそれに起因すると思われるsrc型PTK活性化の有無など細胞内環境の違いが、IL-6刺激に引き続いて起こる細胞増殖を決定的に規定することが判明した。

この研究は、河野道生教授のもとで多数の共同研究者の協力により行われたものです。

また、このミニレビューは第3回テクニカルラインで発表した内容の一部をまとめたものです。セミナー開催にご尽力下さいました定光大海助講会会長、水上洋一副会長にこの場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993; **81** : 2658-2663.
- 2) Huang N, Kawano MM, Harada H, Harada Y, Sakai A, Kuramoto A, Niwa O. Heterogeneous expression of a novel MPC-1 antigen on myeloma cells: Possible involvement of MPC-1 antigen in the adhesion of mature myeloma cells to bone marrow stromal cells. *Blood* 1993; **82** : 3721-3729.
- 3) Kawano MM, Huang N, Harada H, Harada Y, Sakai A, Tanaka H, Iwato K, Kuramoto A. Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. *Blood* 1993; **82** : 564-570.
- 4) Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; **332** : 83-85.
- 5) Potter M, Wiener F. Plasmacytomagenesis in mice: model of neoplastic development dependent upon chromosomal translocations. *Carcinogenesis* 1992; **13** : 1681-1697.
- 6) Suematsu S, Matsusaka T, Matsuda T, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, Kishimoto T. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t (12; 15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89** : 232-235.
- 7) Hilbert DM, Kopf M, Mock BA, Kohler G, Rudikoff S. Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med* 1995; **182** : 243-248.
- 8) Lattanzio G, Libert C, Aquilina M, Cappelletti M, Ciliberto G, Musiani P, Poli V. Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/c mice. *Am J Pathol* 1997; **15** : 689-696.
- 9) Billadeau D, Jelinek DF, Shah N, LeBien TW, Van Ness B. Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristic of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res* 1995; **55** : 3640-3646.
- 10) Ogata A, Chauhan D, Urashima M, Teoh G,

- Hatziyanni M, Vidrlales MB, Schlossman RL, Anderson KC. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 1997 ; **159** : 2212-2221.
- 11) Kawano MM, Mahmoud MS, Ishikawa H. Cyclin D1 and p16^{INK4A} are preferentially expressed in immature and mature myeloma cells, respectively. *Br J Haematol* 1997 ; **99** : 131-138.
- 12) Fujii R, Ishikawa H, Mahmoud MS, Asaoku H, Kawano MM. MPC-1-CD49e⁻ immature myeloma cells include CD45⁺ subpopulations that can proliferate in response to IL-6 in human myelomas. *Br J Haematol* 1999 ; **105** : 131-140.
- 13) Mahmoud MS, Ishikawa H, Fujii R, Kawano MM. Induction of CD45 expression and proliferation in U-266 myeloma cell lines by interleukin-6. *Blood* 1998 ; **92** : 3887-3897.
- 14) Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F-J, Taniguchi O, Kawano MM. Requirements of src family kinase activity associated with CD45 for myeloma cell proliferation by interleukin-6. *Blood* 2002 ; **99** : 2172-2178.

Mechanisms of Myeloma Cell Proliferation Induced by Interleukin-6

Hideaki ISHIKAWA

*Dept of Immunohematology, and. Applied Medical Engineering Science
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1, Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

Specific intracellular signals mediated by IL-6 receptor complexes, such as STAT3 and ERK1/2, are considered to be responsible for inducing a variety of cellular responses. In multiple myeloma, IL-6 only enhances the proliferation of CD45⁺ tumor cells that harbor the IL-6-independent activation of src family kinases even though STAT3 and ERK1/2 are activated in response to IL-6 in both CD45⁺ and CD45⁻ cells. Furthermore, the IL-6-induced proliferation of CD45⁺ U266 myeloma cells is significantly suppressed by Lyn-specific antisense oligodeoxynucleotides or a selective src kinase inhibitor. These results indicate that the activation of both STAT3 and ERK1/2 is not sufficient for IL-6-induced proliferation of myeloma cell lines that require src family kinase activation independent of IL-6 stimulation. Thus, the activation of the src family kinases associated with CD45 expression is a prerequisite for the proliferation of myeloma cell lines by IL-6. We propose a mechanism for IL-6 induced cell proliferation that is strictly dependent upon the cellular context in myelomas.