

## 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には  
CD45とsrc型キナーゼが必要である

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丁目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

## ミエローマ今昔

今は昔, ミエローマ (形質細胞が腫瘍化したもので, 骨髓腫細胞のこと) は免疫学の主役の一つだったらしい。形質細胞は抗体を産生する液性免疫の担い手として魅力的な研究対象であったのだろう。今, ミエローマと聞けば, モノクローナル抗体を作製する時に利用する細胞という程度が大方の反応ではなかろうか。免疫担当細胞が如何に抗原を認識し, 細胞応答が引き起こされるのかを理解することが免疫学の現在の重要課題だとすれば, もはや細胞表面の免疫グロブリン (Ig) の発現を消失し, 抗原認識能を持たない形質細胞が抗体を産生するだけの細胞と見なされるのも仕方がないという気もしてくる。現在ではBlimp-1やXBP-1など, 抗体産生細胞分化に重要な役割を果たしていると考えられる転写因子が明らかになってきており, Bリンパ球から形質細胞への分化を規定する分子機構が解明される日も近いかもしれない。特にXBP-1はER表面でsplicingを受けて初めて機能蛋白質ができる興味深いものである。

以上は免疫学からみたミエローマの話であり, 形質細胞の代用品としてミエローマ (形質細胞株) を使っていた訳である。一方, 私達血液学者はミエローマを形質細胞の癌として腫瘍学の立場から捉えることが多い。そういう目で見ると, (おそらくどん

な研究対象でもそうであるように) ミエローマもなかなか奥が深く, 興味深い現象を提供してくれることに気が付く。まず, 腫瘍細胞の多様性には驚かされる。腫瘍であるから, 単クローンであるが (実際ミエローマの場合はIg遺伝子再構成パターンから確認される), その細胞形態, 表面抗原の発現が異なっている。一つの細胞株でも多様性が存在することを経験しており, 今回実験に使用したU266はその一例である。また, ミエローマと正常形質細胞を区別する際に, 細胞表面抗原の発現の違いが利用されることがある。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の発現がミエローマで消失していることは比較的古くから知られていた事実である。両者ともB細胞抗原受容体 (BCR) の刺激伝達に重要な分子であることから, BCRを発現していないミエローマではもはや必要ないとも考えられるが, 形質細胞では両者とも発現している事実から, むしろ腫瘍性の変化と考える方が妥当と思われる。Bリンパ球が分化して形質細胞になるとCD19やCD45の発現が消失するという誤解は, ミエローマで観察された現象が正常形質細胞に拡大解釈されたことによる。

## 骨髓腫細胞の不均一性と増殖因子

骨髓腫細胞は単クローン性であるにもかかわらず, 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

平成15年6月30日受理

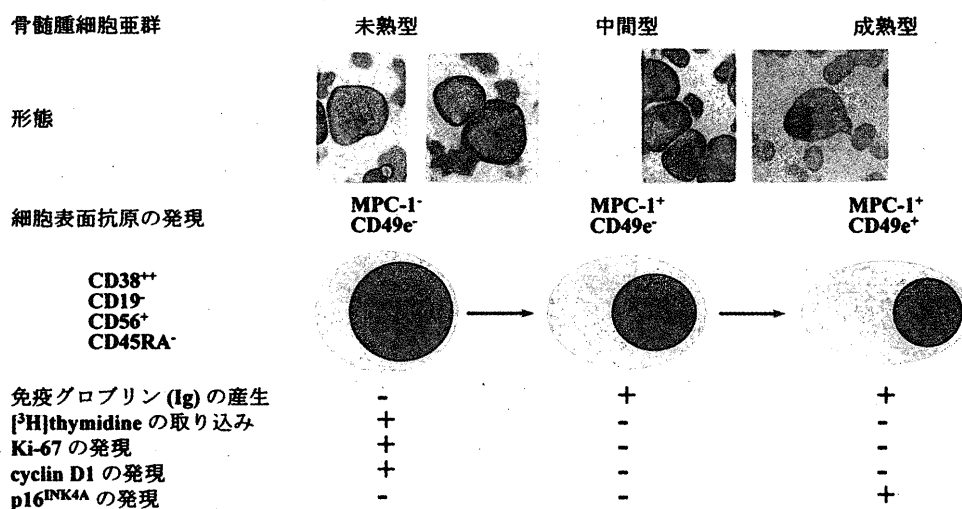


図1. 骨髓腫(形質)細胞の分化過程

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髓腫細胞, 抗体産生能の高い成熟骨髓腫細胞など細胞生物学的性状も異なる。

に分化するとCD38抗原が強陽性となり<sup>2)</sup>, 接着分子MPC-1<sup>3)</sup> 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<sup>4)</sup> (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。

インターロイキン6 (IL-6) は骨髓腫細胞のin vitro増殖を促進し, それは抗IL-6抗体により抑制されることから, IL-6が骨髓腫細胞のin vitro増殖因子であると解った<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8, 9)</sup> 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。

#### 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26 kD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 $\alpha$ 鎖 (IL-6R $\alpha$ ) 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 $\alpha$ 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)。

骨髄腫細胞株	CD45 <sup>-</sup> U266	CD45 <sup>+</sup> U266	ILKM2	ILKM3	ILKM8	NOP-2	KMS-5
CD45の発現	-	+	+	+	+	-	-
IL-6R $\alpha$ の発現	++	++	+	+	+	+++	-
IL-6反応性増殖	-	+	+	+	+	-	-
STAT3の活性化	+	+	+	+	+	+	-
ERK1/2の活性化	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-
Srcの活性化	-	Lyn	Fyn	Fyn	Lyn	-	-
Lynの発現	+	+	+	+	+	+	+
Fynの発現	-	-	+	+	+/-	+	+/-
Blkの発現	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-

+++：非常に強い，++：強い，+：検出可能，+/-：弱い検出可能，-：検出限界以下

表1. 骨髄腫細胞株のIL-6反応性増殖はCD45の発現とsrcの活性に相関している

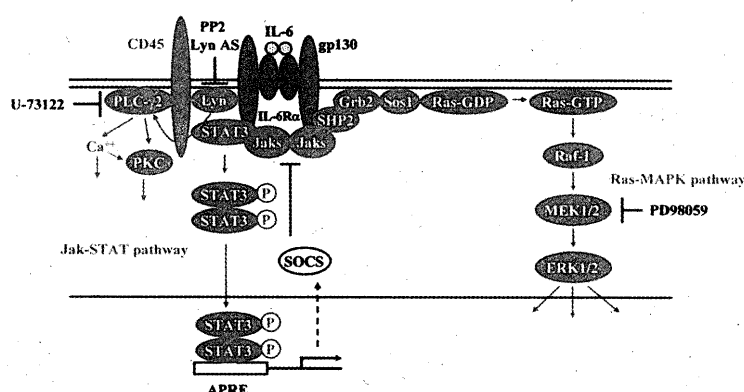


図2. 骨髄腫細胞のIL-6反応性増殖にはCD45の発現とLynの活性が必要である

IL-6によって活性化されたJakはSTAT3とRas-MAPKを活性化するが、骨髄腫細胞の増殖にはCD45の存在下で活性化されたLynが必要である<sup>12)</sup>。

## IL-6による骨髄腫細胞の増殖におけるCD45と

### Lynの重要性

骨髄腫細胞は、IL-6に反応して増殖するが、全ての腫瘍細胞が増殖している訳ではなく、大多数のCD45陰性細胞の中に含まれる少数のCD45陽性細胞がIL-6に反応して増殖していた<sup>10, 11)</sup>。ヒト骨髄腫細胞株U266をCD45抗原発現の有無によりセル・ソーターで分離したCD45<sup>-</sup>およびCD45<sup>+</sup> U266両細胞で、IL-6刺激によるSTAT3とMAPK (ERK1/2) は同程度に活性化されていた<sup>12)</sup>。CD45<sup>-</sup> U266の増殖はIL-6では促進されないことから、STAT3とERK1/2だけでは骨髄腫細胞のIL-6反応性増殖には不十分と考えられた。

一方、CD45を発現する細胞株でのみsrc型チロシン・キナーゼ (PTK), LynまたはFynの活性が上昇していた (表1)。CD45は膜貫通型のチロシン・フォスファターゼ (PTP) で、src型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。よって、骨髄腫細胞株では、CD45発現の有無により、細胞内src型PTKの活性化の程度が異なっていると思われた。Lynに特異的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドまたはsrc型PTK選択的阻害剤PP2を投与したところ、CD45<sup>+</sup> U266のIL-6反応性増殖は顕著に抑制された。これらはSTAT3とERK1/2の発現および活性には影響を及ぼさなかったことから、CD45<sup>+</sup> U266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とは独立したものであり、CD45<sup>+</sup> U266がIL-6に反応して増殖するために必須であることが示された (図2)。

### IL-6と協調して骨髄腫細胞の増殖に寄与するFGFR3

近年の染色体およびゲノムDNAの解析では、骨髄腫細胞における線維芽細胞増殖因子受容体 fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3 遺伝子の構造変化または過剰発現が高頻度で観察される

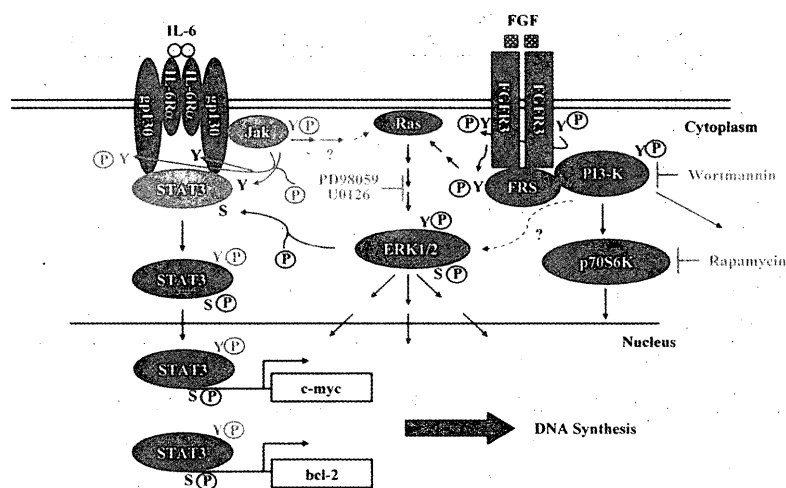


図3. IL-6とFGFの刺激伝達クロストーク

FGFR3を異所性に発現する骨髄腫細胞株KMS-11では、IL-6はSTAT3を、FGFはERK1/2とPI3-Kを活性化する。FGFによって活性化されたERK1/2はSTAT3のセリン残基をリン酸化し、転写活性化に寄与する。

ことが判明した。サイトカインであるIL-6の刺激伝達分子であるgp130がそれ自身でPTK活性を欠いている（Jak型PTKを活性化）のに対し、FGFR3など成長因子の受容体の多くはPTK活性を持っている。ヒト骨髄腫細胞株KMS-11は染色体相互転座によりFGFR3を異所性発現しており、FGFまたはIL-6単独投与ではKMS-11の細胞増殖に変化は見られないが、IL-6と同時にFGFで刺激した場合はKMS-11の細胞増殖が促進された。

KMS-11をIL-6単独で刺激した時、STAT3の活性化が見られ、FGF単独で刺激した時、ERK1/2、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)、p70S6Kの活性化を認めた。また、FGF刺激により転写活性化に寄与するSTAT3のセリン残基のリン酸化が生じており、これはMAP or ERK kinase (MEK) 1/2選択的阻害剤U0126処理により完全に抑制された。つまり、FGFによって活性化されたERK1/2がSTAT3のセリン残基をリン酸化していると考えられた。

KMS-11におけるSTAT3の転写活性化能をLuciferase活性で検討したところ、IL-6刺激により顕著に上昇し、両者投与により更に上昇した。FGFとIL-6同時刺激によるLuciferase活性の上昇は、MEK阻害剤U0126によりIL-6単独刺激と同程度まで抑制されたことから、ERK1/2によるセリン残基のリン酸化がSTAT3の転写活性化能に貢献していると考えられた。さらに、STAT3の標的遺伝子

と考えられるc-myc、bcl-2遺伝子は、IL-6単独に比しFGFとIL-6同時刺激によって発現が著明に上昇していた。

FGFR3を発現するKMS-11ではIL-6とFGFは各々異なった刺激伝達分子を活性化していたが、一方でSTAT3に関しては両者のクロストークが観察された。IL-6またはFGF単独ではKMS-11の細胞増殖に影響を与えなかったことから、受容体の構造が全く異なる両者からの異なった刺激が一緒になって初めて増殖刺激が誘導されると考えられた（図3）。興味深いことに、IL-6単独ではラット褐色細胞腫PC12細胞株を神経細胞に分化させることができないが、nerve growth factor (NGF)を前処理することによりIL-6による神経細胞への分化が可能となる<sup>13)</sup>。また、ある前立腺癌細胞株では、IL-6からの増殖刺激にErbB2からの刺激が必須である<sup>14)</sup>。多発性骨髄腫では染色体相互転座によりFGFR3が異所性に発現することで腫瘍細胞が増殖優位性を獲得している可能性が示唆された（図4）。

#### IL-6刺激で誘導されたIGF-I受容体β鎖のリン酸化

PTK活性を持つ成長因子受容体の過剰発現が幾つかの腫瘍で報告されている。一方、それ自身で酵素活性を持たないサイトカイン受容体の構造変化または発現異常と腫瘍化、細胞増殖との関係は明らかでない。

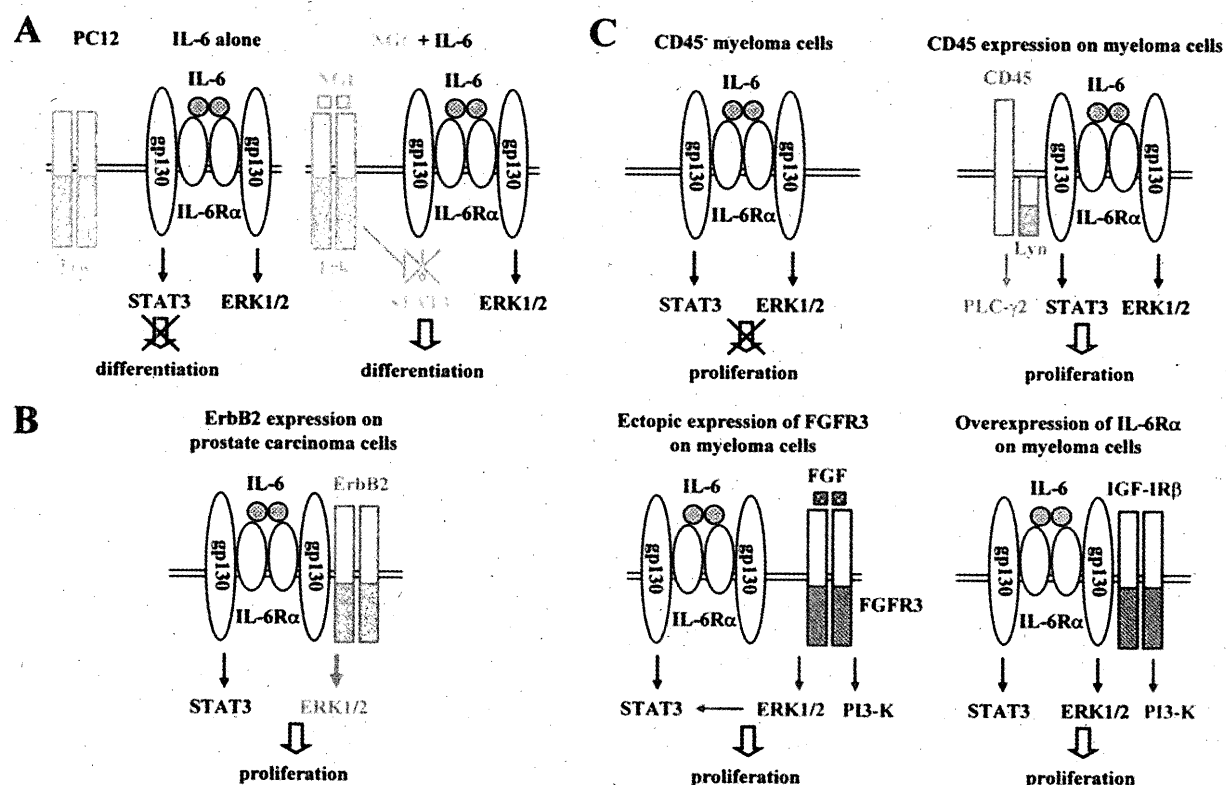


図4: IL-6によるgp130からの細胞内刺激は他の細胞膜貫通分子と共に作用する

(A) ラット褐色細胞腫細胞株PC12では、NGFを前処理することでIL-6によって細胞分化が誘導される（NGFによるSTAT3の抑制）<sup>13)</sup>。(B) ヒト前立腺癌細胞株では、IL-6刺激によりErbB2がIL-6受容体と複合体を形成して活性化され、細胞増殖が誘導される（ErbB2によるERK1/2の活性化）<sup>14)</sup>。(C) ヒト骨髓腫細胞株では、IL-6によって活性化されるSTAT3とERK1/2では細胞増殖に不十分であり、CD45の発現とLynの活性化が必要である（上段）<sup>12)</sup>。FGFR3を発現するKMS-11ではFGFによって活性化されるERK1/2とPI3-KがIL-6によって活性化されるSTAT3と協調して細胞増殖を誘導する（下段左）。IL-6受容体 $\alpha$ 鎖を過剰発現するNOP2では、IL-6によってIGF-I受容体 $\beta$ 鎖のリン酸化が起こり、PI3-K刺激伝達系が活性化されて細胞増殖が誘導される（下段右）。

IL-6R $\alpha$ を過剰発現（他の骨髓腫細胞株の数十倍程度）する骨髓腫細胞株NOP2は無血清培地でIL-6依存性増殖を示した。NOP2では、IL-6刺激依存性にIL-6R $\alpha$ とIGF-I受容体 $\beta$ 鎖の複合体形成が認められ、IGF-I受容体 $\beta$ 鎖のリン酸化（IGF-I刺激非依存性）が観察された。それに伴ってIRS-1のリン酸化、PI3-K・Aktの活性化が認められた。Aktの下流では転写因子FKHRのリン酸化に伴うFasリガンドとp27<sup>Kip1</sup>遺伝子の発現抑制、MDM2のリン酸化に伴うp53の不活性化とBax, p21<sup>Cip1/Waf1</sup>遺伝子の発現抑制が観察された。また、p27<sup>Kip1</sup>はAktに直接リン酸化されることによっても不活性化されていた。これら一連のPI3-K・Akt刺激伝達系の活性化がIL-6による細胞増殖に重要であることが示された。IL-6によるIGF-I受容体 $\beta$ 鎖のリン酸化はJak非依存性であり、過剰発現したIL-6R $\alpha$ が細胞膜上のlipid raftで

IGF-I受容体と共存することにより、IL-6刺激依存性にIL-6R $\alpha$ とIGF-I受容体 $\beta$ 鎖の複合体形成が起こり、IGF-I受容体 $\beta$ 鎖の自己リン酸化が誘導されると考えられた（図4）。

#### おわりに

IL-6は骨髓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、骨髓腫細胞は格好の材料となった。骨髓腫細胞は未熟、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。

ミエローマの研究から得られた知見が、生理的な細胞応答機構を理解する一助になればと願いつつ日々研究している。今後のミエローマ研究が、癌の生物学の材料として発展していくことを願っています。

### 謝 辞

本研究は、山口大学大学院医学研究科応用医工学系生体シグナル解析医学（寄生体学）河野道生教授の研究室で多数の共同研究者の協力により行われたものです。このたびは中村賞の栄誉を賜り、本稿掲載の機会を与えてくださいました山口大学医学会の皆様へ感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001 ; **107** : 881-891.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Potter M, Wiener F. Plasmacytomagenesis in mice: model of neoplastic development dependent upon chromosomal translocations. *Carcinogenesis* 1992 ; **13** : 1681-1697.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Fujii R, Ishikawa H, Mahmoud MS, Asaoku H, Kawano MM. MPC-1<sup>-</sup>CD49e<sup>-</sup> immature myeloma cells include CD45<sup>+</sup> subpopulations that can proliferate in response to IL-6 in human myelomas. *Br J Haematol* 1999 ; **105** : 131-140.
- 11) 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.
- 12) 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.

- 13) Ihara S, Nakajima K, Fukada T, Hibi M, Nagata S, Hirano T, Fukui Y. Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6. *EMBO J* 1997 ; **16** : 5345-5352.
- 14) Yun Q, Ravi L, Kung H-J. Requirement of ErbB2 for signaling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature* 1998 ; **393** : 83-85.

## Requirement of CD45 and Src Family Kinases for Proliferation of Myeloma Cells by Interleukin-6

Hideaki ISHIKAWA

*Department of Bio-Signal Analysis, Applied Medical Engineering Science,  
Graduate School of Medicine, Yamaguchi University  
1-1-1 Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

### SUMMARY

Cytokines exert multiple biological functions through binding to their specific receptors that triggers activation of intracellular signaling cascades. The cytokine-mediated signals may produce variable and even opposing effects on different cell types, depending on cellular context that is also dictated by the differentiation stage of the cell. Multiple myeloma is a monoclonal proliferative disorder of human plasma cells. Despite the clonal origin of myeloma cells, they appear to include mixed subpopulations in accordance with the expression of their surface antigens, such as CD45, CD49e and MPC-1. Although interleukin-6 (IL-6) is widely accepted as the most relevant growth factor for myeloma cells in vitro and in vivo, only a few subpopulations of tumor cells, such as CD45<sup>+</sup>MPC-1<sup>-</sup>CD49e<sup>-</sup> immature cells, proliferate in response to IL-6. We recently show that IL-6 efficiently activates both signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in CD45<sup>-</sup> myeloma cell lines, although they fail to proliferate in response to IL-6. In contrast, src family protein-tyrosine kinases, the most important substrates for CD45 protein-tyrosine phosphatase is found activated independent of STAT3 and ERK1/2 activation in only CD45<sup>+</sup> but not CD45<sup>-</sup> myeloma cell lines. Therefore, the activation of both STAT3 and ERK1/2 is not sufficient for IL-6-induced proliferation of myeloma cells that requires the src family kinase activation associated with CD45 expression. We propose a mechanism for IL-6-induced cell proliferation that is strictly dependent upon the cellular context in myelomas.