

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006年 3月 9日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 車 曉芳



指導責任者名： 秋山 伸一 職名： 教授

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療

所属機関名： 科学専攻腫瘍学講座分子腫瘍学

〒 890-8520

所 在 地： 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1

電話： 099-275-5490 内線： 5490

1. 助 成 金 額： 600,000 円

2. 研究テーマ

survivinの成人T細胞白血病 (ATL)における発現とその意義

3. 成果の概要 (100字程度)

我々はATLにおけるアポトーシス抑制因子を調べ、survivinが高発現することが見出した。ヒ素でATL細胞を処理すると、survivin発現を低下させ、caspase 3が活性化させ、アポトーシスが誘導された。ヒ素のsurvivin発現を低下させるメカニズムはI κ B α の分解を抑制することによって、NF- κ Bの核移行を抑制し、survivinの発現を低下させることを解明した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

1. 車 曉芳、鄭 春雷、古川 龍彦、原口 みさ子、住澤 知之、秋山 伸一。ヒ素はによるsurvivinの発現レベル低下と ATL細胞株S1Tのアポトーシス。第9回分子標的研究会。2005年6月 京都

2. 車 曉芳、鄭 春雷、古川 龍彦、原口 みさ子、秋山 伸一。ヒ素によるsurvivinの発現レベル低下と ATL細胞株S1Tのアポトーシス。南九州腫瘍研究会第9回学術集会。2005年7月 鹿児島

3. 車 曉芳、鄭 春雷、古川 龍彦、原口 みさ子、住澤 知之、秋山 伸一。ヒ素によるsurvivinの発現レベル低下と ATL細胞のアポトーシス。第64回日本癌学会総会。2005年9月 札幌

(2) 発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・題名)

Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. Blood. in press

成人 T 細胞白血病における survivin の過剰発現とヒ素は survivin の発現レベルを低下させ、ATL 細胞のアポトーシスを誘導する

研究者氏名	車 暁芳
中国所属機関	中国医科大学第一臨床学院血液内科 医師
日本研究機関	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍
指導責任者	教授 秋山 伸一
共同研究者名	鄭 春雷、大渡 五月、武藤 昌図、 五反田 丈徳、鄭 熙澈、古川 龍彦、 池田 龍二、山本 雅達、原口 みさこ、 有馬 直道

要 旨

成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia-Lymphoma, ATL) は治療抵抗性が高いため予後は悪い。ATL の薬剤耐性は P-gp、MRP1、LRP などの発現との関係が知られているが、アポトーシス抵抗性も一つの要因と考えている。新しい治療法の開発は、ATL 治療にとって重要である。我々は ATL におけるアポトーシス抑制因子を調べ、survivin が ATL 細胞に高発現することを発見した。ヒ素で ATL 細胞株 MT2 と S1T 細胞を処理すると、survivin の RNA レベルと蛋白レベルが低下したことを見出した。ヒ素は ATL 細胞株の caspase 3 を活性化させ、アポトーシスを誘導した。ヒ素の ATL 細胞の survivin 発現を低下させるメカニズムはヒ素が I κ B α の分解を抑制し、NF- κ B の核移行を抑制することによって NF- κ B の活性化を抑制することを解明した。以上の結果から、survivin は ATL 細胞に高発現して、ATL 薬剤耐性の要因であることとヒ素は ATL 細胞株の NF- κ B 活性化を抑制することによって、survivin の発現を低下させ、アポトーシスを誘導することが明らかにした。

Key Words

成人 T 細胞白血病 ; survivin ; ヒ素 ; アポトーシス ; NF- κ B

緒 言 :

成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia-Lymphoma, ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I, HTLV-I) の感染で CD4 陽性 T 細胞の腫瘍性増殖を特徴とする疾患である。HTLV-1 のコードする Tax は ATL の発症の初期段階に主要な病原因子である。Tax は、細胞の転写因子 CREB、NF- κ B および SRF などの転写因子を活性化して、細胞の増殖、transformation を促進し、悪性化を引き起こす。しかしながら、臨床では ATL 腫瘍細胞において HTLV-1 の遺伝子発現がほとんど認められていない。HTLV-1 感染から、発症するまでは何十年の潜伏期があるが、今まで ATL 発症に関して、共通な認識は多段階発癌モデルである。つまり、HTLV-1 による細胞の癌化は、Tax の細胞増殖促進機能によってイニシエイトされ、感染細胞の不老化が誘導される。それと同時に、不老化した T リンパ球の更なるプログレッションの基盤がこの過程の中で準備され、その基盤は Tax そのものの物理的な存在には非依存的に有効なものである。ATL は治療抵抗性のため、ATL の予後は極めて不良である。ATL の薬剤耐性は P-gp、MRP1、LRP などの発現との関係が知られているが、NF- κ B が恒常的に活性化するために、NF- κ B を介して転写される anti-apoptosis 因子の発現によるアポトーシス抑制も薬剤耐性に関わって

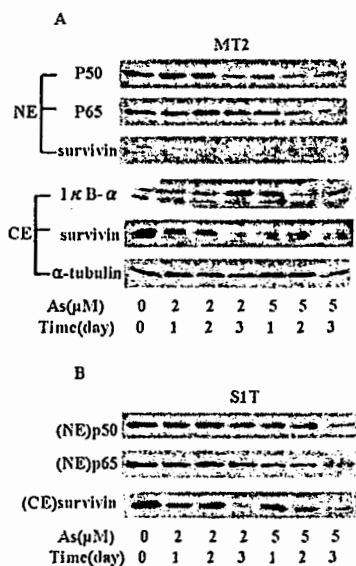
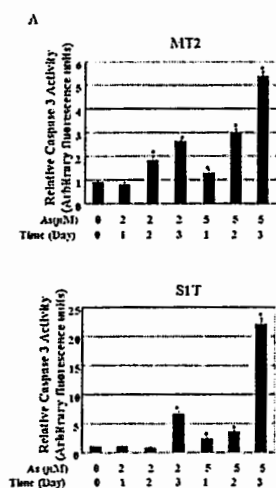
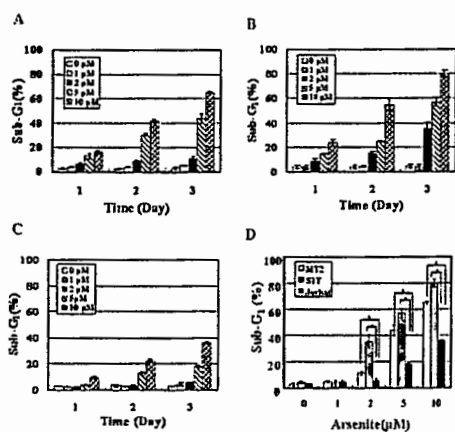
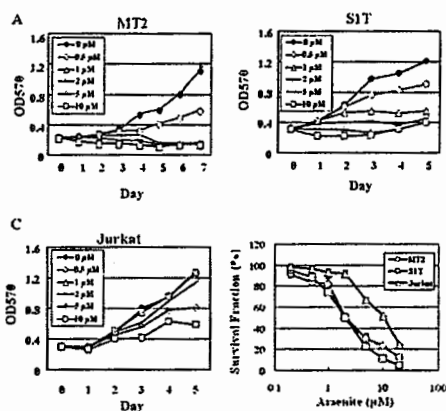
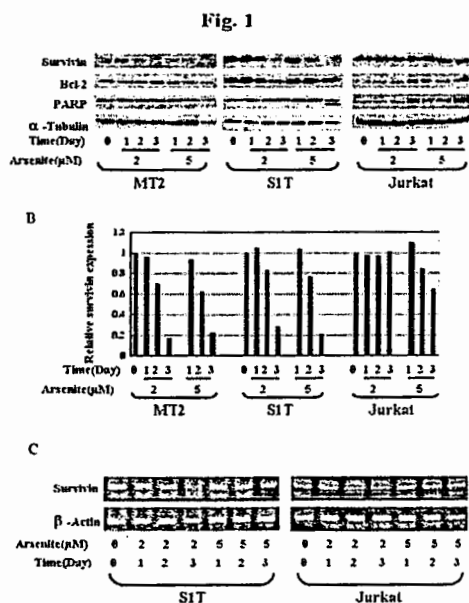
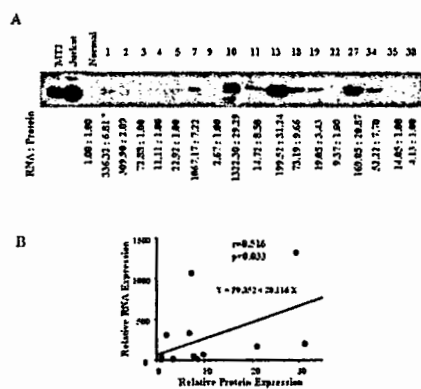
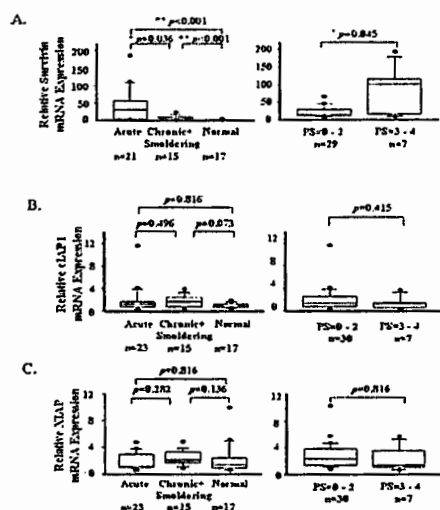
いると考えられている。新しい治療法の開発は、ATL 治療にとって重要である。我々は ATL におけるアポトーシス抑制因子を調べた上で、新しい治療法のヒ素の ATL 細胞のアポトーシス誘導のメカニズムを解明した。

研究対象と方法

1. 我々は ATL 38 症例（急性型 ATL 23、慢性型 ATL 12 とくすぶり型 ATL 3 例）と健常人 17 人の末梢血単核球から抽出した RNA を用いて、Real-time PCR 法で IAP ファミリーの Survivin、IAP-1 と XIAP の mRNA レベルを調べた。一部の ATL サンプルを用いて survivin の蛋白レベルを Western Blotting で調べた。
2. ATL 細胞株 S1T、MT2 とコントロールとしてのリンパ球白血病細胞株 Jurkat のヒ素に対する感受性を MTT Assay で測定した。
3. S1T、MT2 と Jurkat 細胞を各濃度のヒ素で処理し、Western Blot により survivin、bcl-2、PARP などの蛋白レベルを調べた。
4. S1T と Jurkat 細胞を各濃度のヒ素で処理し、RT-PCR により survivin の RNA レベルを調べた。
5. 各濃度のヒ素の存在下で、S1T、MT2 と Jurkat 細胞の増殖を 5 日間または 7 日間連続的に MTT Assay で測定した。
6. S1T、MT2 と Jurkat 細胞を各濃度のヒ素で 3 日間連続処理し、FACS で SubG1 を測定し、アポトーシスを評価した。
7. S1T と MT2 細胞をヒ素で処理し、caspase 3 の活性を microplate fluorescence reader で測定した。
8. S1T と MT2 細胞をヒ素で処理した後、細胞質と核を分画し、NF- κ B の p65 と p50、IkBa の蛋白レベルを Western blotting で調べた。

結 果：

1. 健常人由来の T 細胞に比べ、ATL 細胞のほうが、survivin の mRNA 量は有意に高かった ($p < 0.01$)。急性型 ATL は、慢性型とくすぶり型 ATL と比べて、survivin の mRNA 量が有意に高かった ($p < 0.05$)。Performance status (PS) 3 - 4 の ATL は PS 1 - 2 の ATL より survivin の発現が高かった ($p < 0.05$)。IAP ファミリーの IAP1 と XIAP は、ATL と健常人の間で有意差が見られなかった (Fig. 1)。
2. ATL 細胞の三分の二は survivin 蛋白レベルも発現した (Fig. 2)。
3. ATL の MT2 と S1T 細胞では Survivin 蛋白レベルはヒ素の濃度と処理時間に依存して低下したが、コントロールの Jurkat 細胞では変化が見られなかった (Fig. 3A,B)。S1T 細胞の RNA レベルもヒ素の濃度と処理時間を依存して低下したが、Jurkat 細胞では変化がなかった (Fig. 3C)。
4. ATL の MT2 と S1T 細胞の増殖はヒ素の濃度と処理時間に依存して抑制されたが、Jurkat 細胞の増殖は抑制されなかった。 (Fig. 4A-C)。
5. MT2 と S1T 細胞は、Jurkat 細胞と比べてヒ素に対する感受性が高かった。 (Fig. 4D)。
6. MT2、S1T と Jurkat 細胞では subG1 fraction はヒ素の濃度と処理時間に依存して上昇したが、Jurkat 細胞での SubG1 fraction の増加は ATL 細胞に比べて有意に少なかった。 (Fig. 5)。
7. MT2 と S1T 細胞の Caspase 3 はヒ素の濃度と処理時間に依存して活性化された。 (Fig. 6)。
8. ヒ素で処理した MT2 細胞では核の NF- κ B (p65 と p50) はヒ素の濃度と処理時間に依存して低下した一方、細胞質の IkBa は増加した。S1T 細胞でも核の NF- κ B (p65 と p50) はヒ素に依存して低下した。 (Fig. 7)。



考 察：

ATL 細胞では NF- κ B は恒常的に活性化して、細胞増殖、がん化とアポトーシス抑制による薬剤耐性に重要な因子として知られている。われわれは NF- κ B によって転写されるアポトーシス抑制因子 IAP family を注目し、ATL 細胞での IAP ファミリーの発現を調べ、survivin が高発現することを発見した。Survivin は正常の場合、胎児期を除いて、ほとんどの正常細胞では見られないが、各種の癌と造血器悪性腫瘍細胞では高発現している。Survivin は、細胞分裂を調節する機能とアポトーシスを抑制する機能がある。Survivin は caspase 9、3、7 と結合することによって、これらの caspase の活性を抑制し、アポトーシスを抑制している。ヒ素は前骨髄性白血病（APL）治療に有効な薬として知られています。APL 以外の白血病および固形腫瘍でもヒ素は bcl-2 の発現を低下させ、NF- κ B の活性を抑制することなどによって、これらの細胞のアポトーシスも誘導できる。近年、ヒ素と IFN- α の併用が、ATL の新しい治療法として注目されている。この研究で ATL 細胞に survivin は高発現していて、ヒ素は I κ B α の分解を抑制し、NF- κ B の核移行を抑制することによって、survivin の発現を低下させ、アポトーシスを誘導することを明らかにした。

参考文献：

1. Hinuma Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78:6476-6480.
2. Mauxion F, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:2141-2145.
3. Mulloy JC, et al. J Virol. 1998;72:8852-8860.
4. Kuwazuru Y, et al. Blood. 1990;76:2065-2071.
5. Ohno N, et al. Clin Cancer Res. 2001;7:3120-3126.
6. Ohno N, et al. Blood. 2001;98:1160-116
7. Mori N, et al. Blood. 2002;100:1828-1834.
8. Lanotte M, et al. Blood. 1991;77:1080-1086
9. Bazarbachi A, et al. Blood. 1999;93:278-283.
10. Kawakami H, et al. Int J Cancer. 2005;115:967-974.

注：本研究は、2005 年 7 月 1 日「第 9 回がん分子標的治療研究会総会」、7 月 25 日「南九州腫瘍研究会第 9 回学術集会」、9 月 14 日「第 64 回日本癌学会学術総会」にてポスター発表、Blood（2006 年 6 月）に掲載予定。

作成日：2006 年 3 月 9 日