

## 論 文 要 旨

### **Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines**

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

車 暁芳

#### 【序論および目的】

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。ATL は治療抵抗性が高いため予後は極めて悪い。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。

#### 【材料および方法】

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。
2. ATL 細胞株 S1T、MT2 と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. 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。
4. 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。
5. 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。

6. 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。

7. 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。

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- $\kappa$ B の P65 と P50、I $\kappa$ B $\alpha$  の蛋白レベルを調べた。

#### 【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、IAP2、XIAP は、ATL と健常人の間で有意差が見られなかった。
2. ATL 細胞 MT2 と S1T は、Jurkat 細胞と比べてヒ素に対する感受性が高かった。
3. ヒ素は MT2 と S1T 細胞の増殖を濃度と時間依存的に抑制した。
4. ヒ素は MT2 と S1T 細胞のアポトーシスを濃度と時間依存的に誘導した。
5. ヒ素は濃度と時間依存的に MT2 と S1T 細胞の Caspase 3 を活性化した。
6. ヒ素は濃度と時間依存的に MT2 と S1T 細胞の Survivin 蛋白発現を抑制した。
7. ヒ素は濃度と時間依存的に S1T 細胞の Survivin RNA 発現を抑制した。
8. ヒ素は MT2 と S1T 細胞で NF- $\kappa$ B (P65) の核移行を抑制した。

#### 【結論及び考察】

1. Survivin は ATL に高発現し、抗癌剤治療抵抗性の重要な因子である。
2. ヒ素は ATL 細胞株 S1T のアポトーシスを誘導する。
3. ヒ素は ATL 細胞株の survivin 発現を低下させる。
4. ヒ素は ATL 細胞株の NF- $\kappa$ B (P65) の核移行を抑制する。
5. ATL 細胞においては、ヒ素は NF- $\kappa$ 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。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第	1号	学位申請者	車 暁芳
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	丸山 征郎	副査	中川 昌之
	副査	栄鶴 義人	副査	馬場 昌範

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

〔 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 〕  
 Blood 2006 年 6 月 15 日 掲載予定

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、治療抵抗性のため予後が極めて不良であり、新しい治療法の開発が望まれている。アポトーシス抑制は抗癌剤耐性のメカニズムの一つと考えられる。この研究は、アポトーシス抑制因子 IAP ファミリーの発現を ATL 細胞で調べ、ATL 治療のための新しい標的分子を見つけることを目的としている。

ATL38 症例の RNA を抽出し、IAP ファミリーの *survivin*、*XIAP*、*cIAP1* の mRNA レベルを Real-time PCR で解析した。*survivin* だけが ATL に高発現していることを見出した。次に ATL の新しい治療法として注目されるヒ素で ATL 細胞株 MT2 と S1T を処理した後、*survivin* の発現レベルを Western Blotting で調べ、ヒ素の細胞毒性を MTT で測定し、アポトーシスを flow cytometry で評価した。ヒ素で処理した ATL 細胞株を細胞質と核に分けて、NF- $\kappa$ B (p65 と p50) と I $\kappa$ B- $\alpha$  の変化を Western blotting で調べた。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) ATL、特に急性型 ATL に *survivin* が高発現し、抗がん剤治療抵抗性の重要な因子と考えられた。
- 2) ATL 細胞株では、ヒ素の濃度と処理時間に依存して *survivin* mRNA と蛋白レベルの発現が低下した。
- 3) 低濃度の 0.5 $\mu$ M のヒ素の存在下では、ATL 細胞の増殖が抑制された。
- 4) ATL 細胞株では、ヒ素の濃度と処理時間に依存して sub-G1 fraction が上昇した。
- 5) ATL 細胞株では、ヒ素の濃度と処理時間に依存して核内の p50 と p65 が低下し、細胞質の I $\kappa$ B $\alpha$  はヒ素に依存して上昇した。

*Survivin* は正常組織でほとんど発現しないが、癌と造血器悪性腫瘍細胞では高発現している。IAP ファミリーの中では、*survivin* だけが ATL に高発現し、ATL 治療の標的分子の候補である。ヒ素は ATL 細胞の *survivin* を低下させ、細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。ヒ素が I $\kappa$ B $\alpha$  の分解を抑制し、NF- $\kappa$ B の核移行を抑制することによって *survivin* の発現を低下させることを示唆した。ヒ素と IFN- $\alpha$  の併用が ATL の新しい治療法として注目されており、ヒ素が *survivin* の発現を低下させ、ATL 細胞のアポトーシスを誘導するという知見は、今後の ATL の治療法の開発に役立つものと考えられる。

本研究は、ATL における *survivin* の発現と ATL の subtype との関連を検討し、*survivin* の発現が ATL 治療抵抗性に関係することを示した。さらに、ヒ素は NF- $\kappa$ B の核移行を抑制することによって *survivin* の発現を低下させることを示した点で非常に興味深い。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	1号	学位申請者	車 暁芳
審査委員	主査	小澤 政之		学位 博士(医学・歯学・学術)
	副査	丸山 征郎		副査 中川 昌之
	副査	栄鶴 義人		副査 馬場 昌範

主査および副査の5名は、平成18年3月9日、学位申請者 車 暁芳氏に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) ヒ素がNF- $\kappa$ B活性を抑制する実験でなぜElectrophoretic mobility shift assayをやらなかったのか。

(回答) ATL細胞でヒ素がNF- $\kappa$ B活性を抑制する報告があり、その中ですでに行われている。

質問2) 実験に使われるヒ素の濃度は実際の治療には高すぎるか、かなり毒性は出るか。

(回答) ヒ素で前骨髄性白血病(APL)を治療する時ヒ素の血中最大濃度は6.85 $\mu$ Mであり、この研究で使われる2 $\mu$ Mと5 $\mu$ Mの濃度はそれ以下である。

質問3) ヒ素が皮膚がんを引き起こすメカニズムは何か。

(回答) ヒ素は多くの分子に作用して、シグナル伝達経路を活性化している。ヒ素はMAPK経路: ERK、JNKとp38 kinaseを活性化するが、ヒ素によるERKとp38 kinaseの経路は細胞のトランスフォーメーションと関連すると報告されている。

質問4) ヒ素とIFN- $\alpha$ を併用したATLの治療に関して臨床での現状はどうか。

(回答) 臨床ではPhaseII試験が行われた。7例の再発した難治性ATLをヒ素とIFN- $\alpha$ で治療し、3例はPR、1例はCRの効果を得られた。1例のCR症例は、現在までもう32ヶ月間生存している。ヒ素とIFN- $\alpha$ の併用がATLの有効な治療法として期待されている。

質問5) Fig.2のBではSurvivinの蛋白レベルとRNAレベルの正の相関性があるものの、p値はぎりぎり有意の範囲だが、発現量の補正をしたか。

(回答) RNAレベルはGAPDHで補正したが、蛋白レベルは補正していない。そのため相関性があまりよくなかった可能性がある。

質問6) survivinを直接誘導する抗がん剤あるか。

(回答) Taxolは微小管の会合を促進し、チューブリンの脱重合を阻害する抗がん剤で、Taxolで細胞を処理するとG2/M期の細胞が増える。survivinは細胞周期のG2/M期に高発現するのでTaxolで処理した細胞のsurvivin発現が上昇する。

質問7) 一人の患者さんで、survivinの濃度が治療した後低下し、再発した時上昇したという報告はあるか。

(回答) 膀胱がんでは治療した後tumor-free期間にsurvivinが検出できなくて、再発の初期にsurvivinの発現が高くなる報告はある。

## 最終試験の結果の要旨

質問 8) 血中 survivin 濃度を測定できるか、こういう報告があるか。

(回答) 長崎大学のグループは plasma survivin を ELISA で測定している。

質問 9) ヒ素は caspase 3 を活性化させたが、ほかの caspase はどうか。

(回答) 他の caspase は測定しなかった。

質問 10) ヒ素の副作用は何か。

(回答) 発生率は低いですが、肝臓障害、腎臓障害、食欲不振などがある。

質問 11) 中国では ATL 患者さんはいるか。中国では HTLV-II 感染の報告はあるか。

(回答) 中国では ATL 患者さんはいない。HTLV-II 感染については知らない。

質問 12) 1  $\mu$ M のヒ素は ATL 細胞の増殖を抑制したが、アポトーシスを起こさなかった。その原因は何か。

(回答) ヒ素は G<sub>1</sub> arrest を引き起こす報告があるが、われわれの結果も 1  $\mu$ M のヒ素は G<sub>1</sub> arrest を起こして細胞増殖を抑制する可能性を示している。

質問 13) NF- $\kappa$ B ファミリーのほかのメンバの変化は調べたか。

(回答) 調べなかった。

質問 14) Survivin は細胞膜に存在するか。

(回答) survivin の局在を調べ、細胞質に存在して、細胞膜には局在しないことを観察している。

質問 15) ヒ素はどのようなメカニズムで I $\kappa$ B $\alpha$  の分解を抑制するのか。

(回答) ヒ素は IKK と結合し、IKK の活性化を抑制することによって、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解を抑制する。

質問 16) ヒ素による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制はなぜ 3 日間かかるのか。

(回答) NF- $\kappa$ B は短時間処理によって活性化する報告が多いが、細胞によって background は違うので、NF- $\kappa$ B の活性化が長時間処理によって抑制される報告もある。2-3 日間のヒ素の処理で ATL 細胞の NF- $\kappa$ B 活性化が抑制される報告はこれまでにいくつかある。

質問 17) survivin を強制発現したら、アポトーシスを抑制できるか。

(回答) われわれは survivin を ATL 細胞で強制発現しようと思ったが、うまくいかなかった。ほかの細胞株で survivin を過剰発現して、アポトーシスを抑制したという報告はある。

質問 18) ヒ素は ATP の合成を阻害するが、この研究では ATP 合成にどのような影響があったか。

(回答) ATP 合成への影響については調べなかった。

質問 19) 鹿児島ではヒ素での治療は行っているか。

(回答) 1998 年二内科の石塚らは、ヒ素による ATL 細胞のアポトーシス誘導を報告した。臨床でのヒ素の応用については知らない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。