

平成21年 6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591091
 研究課題名（和文）細胞外 NM23 分子の機能：初代培養白血病細胞の生存増殖とその作用機構
 研究課題名（英文）Extracellular NM23 protein promotes the growth/survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells
 研究代表者 角 純子（岡部 純子）(KADO JUNKO)
 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所 主任研究員
 研究者番号：30161136

研究成果の概要：白血病では、本来細胞内に存在する NM23 蛋白質が血中に検出される。この濃度が高いほど治療成績が悪い。細胞外環境にある NM23 蛋白質が、白血病細胞の増殖を促進することを見出した。この作用には、サイトカイン誘導や増殖関連シグナル伝達の活性化が関与していた。これらのシグナル伝達の阻害剤は、NM23 蛋白質による増殖促進を抑制した。これらの阻害剤は、高濃度な血中 NM23 蛋白質を有する症 に対する治療法の開発に役立つかもしれない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系 床医学・血液内科

キーワード：がん・蛋白質・生理活性・シグナル伝達・NM23

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病細胞の分化誘導抑制因子ががん転移関連遺伝子 NM23 産物であることを明らかにした。NM23 遺伝子は、がん転移抑制遺伝子として単離され、その遺伝子産物はがん転移

抑制活性のほかヌクレオシド二リン酸 (NDP) キナーゼ活性、*c-MYC* 転写因子活性、および DNA nuclease 活性等を示す多機能性蛋白質である。白血病細胞や悪性リンパ腫細胞では、NM23 遺伝子が過剰発現している。また、血清

NM23蛋白質レベルも高く、その発現量は患者治療抵抗性と相関し、両疾患の生存率において有意な独立した予後不良因子となることを報告した。特に、血清NM23蛋白質レベルは、生体におけるNM23総量（発現量と腫瘍量の積）を示し予後予測に関して有用なバイオマーカーとなった。血清NM23蛋白質が予後不良因子となる生物学的基盤を解明するために、細胞外環境におけるNM23蛋白質の生物学的機能の解明が待たれていた。

(2) 白血病細胞や悪性リンパ腫細胞におけるNM23遺伝子の過剰発現に加えて、細胞外に分泌されるNM23蛋白質や細胞表面に局在するNM23蛋白質に着目してその細胞生物学的意義を研究したは世界に少なく日本独自の領域である。国外では、NM23遺伝子のがん転移抑制活性の研究から諸種腫瘍細胞の運動能との関与が示唆され、またNM23遺伝子の*c-MYC*転写因子活性の研究からはDNA結合能やDNase活性の解析が進められている。このようなNM23の多彩な生物学的機能の1つとして、白血病細胞におけるNM23遺伝子の過剰発現、悪性度発現および細胞外環境にあるNM23蛋白質の機能の解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究課題は「血清NM23蛋白質が予後不良因子となる生物学的基盤を解明する」ことにある。細胞外環境におけるNM23蛋白質の生物学的機能を明らかにすることを目的としている。

(1) 組み替え体NM23蛋白質が初代培養の白血病細胞の増殖・生存を顕著に促進することを見出した。このような細胞外での機能は、血清NM23蛋白質が予後不良因子となるための生物学的機能基盤の1つと推察されるので、その作用機序を明らかにする。

(2) 組み替え体NM23蛋白質は正常末梢血単球を活性化し、諸種サイトカインの分泌を誘導することも見出している。このサイトカイン誘導機構を解明する。また、誘導されるサイトカインの白血病細胞増殖・生存への効果を検討し、血清NM23蛋白質が予後不良因子となる生物学機能基盤の1つとして正常単球を介した間接作用を証明する。

(3) 細胞外環境としての血清NM23分子の機能から想定される受容体の分離同定および白血病細胞や血清内でのNM23蛋白質結合物質の分離同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞の増殖・生存に対する促進作用のメカニズム解析

① 白血病細胞は、急性骨髄性白血病末梢血単核細胞（当センター 臨床審査委員会にて審査承認済）を初代培養で使用する（表1）。

② NM23蛋白質を処理した初代培養白血病細胞の培養液に分泌されるサイトカインを同定、定量する（Cytokine antibody array, ELISA）。

③ NM23蛋白質を処理した初代培養白血病細胞の遺伝子発現の変動解析（RT-PCR, cDNA microarray, Western blotting）。

⑤ NM23蛋白質処理により活性化される増殖・生存に関わるシグナル伝達系の同定。

(2) 正常末梢血単球を活性化する（増殖促進は認められない）機構を解明する。

①-⑤は、上記と同様

⑥ NM23蛋白質により誘導されたサイトカインが上記初代培養白血病の増殖・生存を促進できるかを検討する（MTT assay）。

(3) 白血病細胞におけるNM23受容体およびNM23結合蛋白質を探索、同定する。

① Protein Array：NM23蛋白質をプローブとして、Protein Arrayを用いて、NM23結

合蛋白質を網羅的に探索し、特異的に結合する腫 関 蛋白質を同定する。

② 免疫沈降と質量解析：NM23 抗体と白血病細胞抽出液を用いた免疫沈降と質量解析にて NM23 結合蛋白質を同定する。

4. 研究成果

(1) 白血病細胞の増殖・生存に対する促進作用のメカニズム解析

組み替え体 NM23 蛋白質は、初代培養の急性骨髄性白血病細胞 (表 1) の増殖・生存を促進した (図 1)。また、培地中には炎症性サイトカインを含む諸種サイトカインが検出された (GM-CSF, IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 等) (図 2)。サイトカイン抗体による中 実験から、NM23 による増殖促進とサイトカイン誘導とは密接に關 することが示された。さらに、この増殖促進では MAPK (p38, ERK, JNK) および STAT1, 3 のリン酸化の 進が観察された (図 3)。一方、p38 MAPK 阻害剤 (SB202190 および SFK86002), MEK 阻害剤 (PD98059)、STAT3 阻害剤 (Curcumin) は、NM23 による増殖促進作用を抑制した (図 4)。NM23 による増殖促進には、MAPK や STAT の活性化が重要な役割を果たしていると考えられた。これら阻害剤の研究は、予後不良と予測される血清 NM23 高値症 に対する治療法の開発に役立つかもしれないことが示唆された。

表 1 急性骨髄性白血病細胞

Patients	Diagnosis (FAB)	Blast cells (%)	Sensitivity to NM23
Case 1	M5	65	+
Case 2	M5	97	+
Case 3	M2	85	-
Case 4	M4	69	+
Case 5	MDS-AML	64	+
Case 6	M4	60	+
Case 7	M7	38	+
Case 8	M3	95	-
Case 9	M2	84	+
Case 10	M2	66	+
Case 11	M2	90	+
Case 12	M3	96	-
Case 13	M4e	52	+
Case 14	M4e	72	+

図1 NM23による白血病細胞に対する増殖促進活性

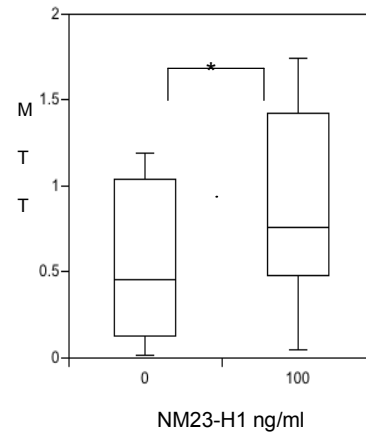
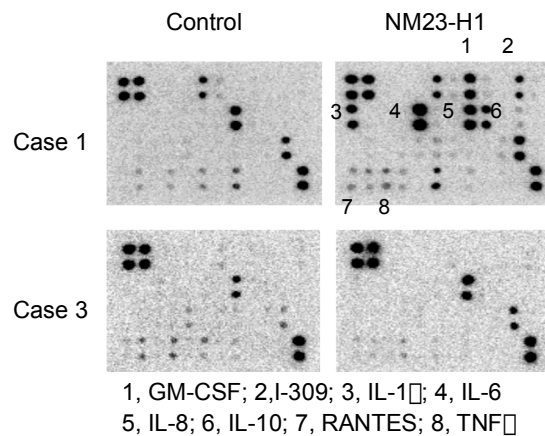


図2 NM23によるサイトカインの誘導



(2) 正常末梢血単球に対するサイトカイン誘導のメカニズム

組み替え体 NM23 蛋白質は正常末梢血単球を活性化し多くのサイトカインを誘導する。しかし、白血病細胞とは反対に正常末梢血単球の生存・増殖は阻害された。この正常末梢血単球に対する作用は、MAPK (p38, ERK, JNK) および STAT1, 3 のリン酸化の 進を伴わなかった (図 3)。これらのシグナル伝達の活性化は増殖促進と關 していると推測される。また、誘導されたサイトカインには白血病細胞の増殖を促進する活性を示すものも含まれていた (GM-CSF, IL-1 β) (図 5)。NM23 は単球を活性化し、サイトカイン産生

を介して間接的に腫瘍細胞の増殖を支持できると推察された。

図3 NM23による MAPK の活性化

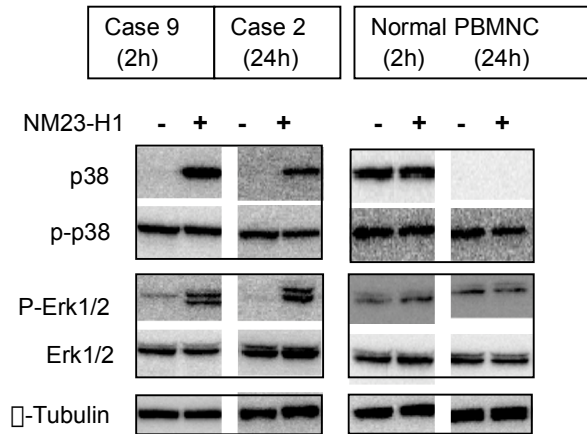


図4 MAPK阻害薬によるNM23の増殖促進活性の抑制

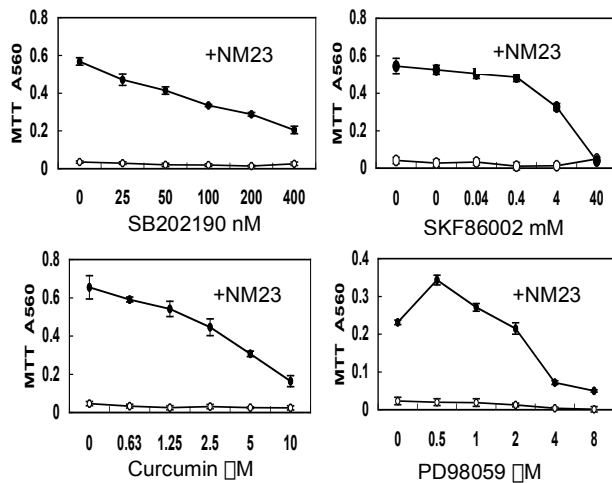


図5 NM23により正常PBMNCに誘導されたサイトカインの白血病細胞に対する増殖促進活性

patient	NM23	M-CSF	GM-CSF	IL-1	INF-γ	TNF-α	IL-6	IL-8	Gro-α	I-309	RANTES	IL-10
case 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
case 2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
case 3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
case 4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
case 9	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	NT
case 11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	NT
case 12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	NT
case 13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	NT

■ 増殖促進

(3) 白血病細胞における NM23 結合蛋白質の分離同定

白血病細胞における 7 個の NM23 結合候補蛋白質 (HSC70, RAR α , ROR α , NM23-H2, S100-A8, S100-A9, SPRR2E) を同定した。

今後、白血病細胞の特性に関する NM23 結合蛋白質を絞り込み、その発現動態および機能解析へと進める予定である。

5. 主な発表 文等

(研究代表者、研究分担者及び 携研究者には下線)

[雑誌 文] (計 1 件)

Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Honma, Y. Cotylenin A, a new differentiation inducer, and rapamycin cooperatively inhibit growth of cancer cells through induction of cyclin G2. *Cancer Sci*, 99:1693-1698, (2008) (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

① 角 純子、粕壁 隆、金子安比古. 白血病細胞における NM23 結合蛋白質の探索と発現解析. 第 70 回日本血液学会、2008 年 10 月 11 日、京都。

② 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、金子安比古. EDG2/LPA1 expression in leukemia cells and its association with NM23 expression. 第 67 回日本癌学会学、2008 年 10 月 28 日、名古屋。

③ Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Kaneko, Y. Inverse Correlation of NM23 Expression with Lysophosphatidic Acid Receptor EDG2/lpa1 Expression of Human Leukemia Cells during Myeloid Differentiation Induced by All-trans Retinoic Acid. 50th Annual Meeting of American Society of Hematology. 2008

年12月6日(誌上发表)、San Francisco, USA.

- ④ Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical and biological significance of overexpression of NM23 in leukemia. 7th International Congress of the NDP Kinase / NM23 / and Family. 2007年9月4日、Dundee, UK.
- ⑤ 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、金子安比古. Detection of NM23-interacting proteins and their possible role on poor treatment outcome in leukemia. 第66回日本癌学会学, 2007年10月4日、横浜.
- ⑥ 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、金子安比古. 白血病細胞における NM23 蛋白質の機能と相互作用蛋白質の探索. 第69回日本血液学会、2007年10月11日、横浜.
- ⑦ 角 純子、粕壁 隆、本間良夫、小泰文、柵木信男、金子安比古. 細胞外 NM23 蛋白質が初代培養の白血病細胞に誘導するシグナル伝達系. 第65回癌学会総会、2006年9月28日、横浜.
- ⑧ Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Kobayashi, H., Maseki, N., Honma, Y., Kaneko, Y. Effect of Extracellular NM23 Protein on *in Vitro* Survival of Normal PBMNC and Acute Myeloid Leukemia Cells. 48th Annual Meeting of American Society of Hematology. 2006年12月10日、Orland, USA.
- ⑨ 角 純子. 造血器腫 における血清 NM23 蛋白質の生物学的意義. 第1回山陰血液疾患研究会. 2006年2月17日、米子.

[図書] (計1件)

Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., and Kaneko, Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. Focus on Neuroblastoma Research Editor: Julio A. Fernandes, pp.85-97 (2007)

[その他]

ホームページ

<http://www.pref.saitama.lg.jp/A80/BA02/top.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角 純子 (KADO JUNKO)

埼玉県立がんセンター・床腫 研究所
主任研究員

研究者番号: 30161136

(2) 研究分担者

(3) 携研究者