

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591129

研究課題名（和文） 骨髄腫細胞における恒常的NF- κ B活性を抑制するPPAR β の作用機序の解明

研究課題名（英文） The elucidation of mechanism of action of PPAR to suppress constitutive NF- κ B activity on human myeloma cells

研究代表者

大津山 賢一郎 (OOTSUYAMA KENICHIROU)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10432741

研究成果の概要（和文）：

ヒト骨髄腫細胞株および患者骨髄腫細胞において、PPAR β がNF- κ Bの分子に相互作用して抑制。核内ですべてのNF- κ Bファミリーを同定。ヒト骨髄腫細胞株においてPPAR β のアゴニスト刺激後、細胞の生存率は大きく減少し、PPAR β は細胞質内から核内移行、NF- κ B-DNA結合能の減少、さらに、PPAR β とNF- κ B(p65)との相互作用を確認。以上から、活性化PPAR β とNF- κ B(p65)との相互作用の結果核内移行阻害や κ B配列に結合する能力を抑制することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

I indicated that PPAR β could suppress constitutive nuclear factor - κ B (NF- κ B) activity by PPAR β directly interacted with NF- κ B. NF- κ B is a dimeric transcription factor that can be formed by the assembly of five diverse proteins, p50, p52, RelA (p65), RelB and c-Rel which, in combination, specify the dimer transcriptional activity. Although there were activated NF- κ B in nucleus, in primary myeloma cells, all NF- κ B family was identified in the nucleuses. The PPAR β agonist carbacyclin induced multiple myeloma cell apoptosis. After stimulation of carbacyclin, PPAR β translocated to the nucleus. NF- κ B- DNA- binding activity was also decreased in the nucleus of myeloma cell lines. And it was identified PPAR β associated with NF- κ B (RelA/ p65) . These results suggested that PPAR β activation could prevent nuclear translocation of NF- κ B and decrease the activity of NF- κ B binding the promoter of NF- κ B target genes in myeloma cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：PPAR、NF-κB、多発性骨髄腫

1. 研究開始当初の背景

Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)は、核内レセプターであり、リガンド依存的転写因子でもある。PPAR は抗炎症作用や抗血管新生作用などを示し、**NF-κB** 活性によって産生される炎症性サイトカインや細胞の増殖因子などを減少させることも知られている(Xin, et al **J Biol Chem** 2004; Welch JS, et al **Proc Natl Acad Sci** 2003.)。抗 NF-κB 活性を示すものには、NF-κB の上流にある活性化因子を抑制するものもあるが、PPAR は核内において NF-κB に直接働き、抗 NF-κB 活性を誘導することが可能である。これが、抗 NF-κB 活性としての PPAR を注目する点である。

PPAR には 3 つのサブタイプ (PPAR α , PPAR β , PPAR γ) が存在し、骨髄腫細胞では PPAR β が強く、PPAR γ の弱い発現もみられた。PPAR γ が PPAR β 活性化に伴って発現が亢進されることから、我々は PPAR β に着目した。PPAR β 活性化は、骨髄腫細胞の生存抑制を示した (Otsuyama K, Kawano MM, et al. **Leukemia** 2007)。PPAR は生理的リガンド依存性に活性化されることは知られているが、その詳細はまだわかっていない。そこで、これまで我々は PPAR β response element (PPRE β)-luciferase を作成し、その assay によるスクリーニングの結果、flavonoid (baicalein, wogonin など) や steroid (Dehydroepiandrosterone (DHEA) 、Androstendion など) などが PPAR β の活性化能を持つことを示した。中でも DHEA については、血清中の DEHA 量が加齢と共に減少し、健常者に比して多発性骨髄腫患者では 4 倍以

上も少なく、骨髄腫細胞の増殖因子 IL-6 の産生量は 2 倍以上多いことを明らかにした(Liu S, Otsuyama K, Kawano MM, et al. **Cancer Res** 2005.)。さらに、DHEA は抗 NF-κB 活性を誘導し、骨髄腫細胞の生存及び増殖を抑制することを示した。flavonoid の baicalein もまた骨髄腫細胞の生存及び増殖を抑制し、抗 NF-κB 活性を示した (Ma Z, Otsuyama K, Kawano MM, et al. **Blood** 2005.)。NF-κB には RelA(p65), RelB, c-Rel, NF-κB1(p105/p50), NF-κB2(p100/p52)のサブユニットが存在する。ヒト骨髄腫細胞株を含め患者骨髄腫細胞では、NF-κB 活性を NF-κB インヒビターで抑制すると細胞死を誘導する (Bharti AC, et al. **Blood** 2004.)。したがって、骨髄腫細胞に於いて恒常的な NF-κB 活性が細胞の生存・増殖に深く関わっていると考えられている (Hideshima T, Anderson KC, et al. **Blood** 2004.)。抗 NF-κB 活性を示すものとして、すでに報告されているものに **Glucocorticoid(GC)**がある。GC は核内レセプターである **Glucocorticoid receptor(GR)**と結合し、この活性化された GR は NF-κB サブユニット p65 と相互作用することにより、NF-κB のκB 配列との結合を抑制する (Garside H et al. **J Biol Chem** 2004)。活性化された PPAR もまた NF-κB サブユニット p65 と相互作用し、NF-κB の活性を抑制することが報告されている (Planavia A, et al, **J Biol Chem** 2005; Li Hua Wang, et al, **Blood** 2007)。さらに、多発性骨髄腫治療に用いられている GC(Dexamethasone(Dex))に抵抗性を示す患者骨髄腫細胞及びヒト骨髄腫細胞株 U266 に於いて、PPAR β アゴニスト carbacyclin をはじめ PPAR β 活性を示す低分子化合物でもその生

存・増殖を抑制した。これらのことから、我々は抗 NF- κ B 活性を示す PPAR β 活性化の詳細な機構を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

ヒト骨髓腫細胞株では、恒常的な NF- κ B 活性がその生存・増殖に深く関わっていることを示唆する報告は多い。骨髓腫細胞に強く発現している PPAR β は、核内に於いて NF- κ B に直接作用し、その活性を抑制できると考えられる。我々が注目するこの PPAR β の活性化は抗 NF- κ B 活性を示すが、報告されている多くが NF- κ B を活性化させる刺激の系で行われている(Planavia A, et al, *J Biol Chem* 2005; Li Hua Wang, et al, *Blood* 2007)。PPAR β 活性化によりヒト骨髓腫細胞株の生存は抑制されることから、NF- κ B サブユニットとの相互作用についての詳細な検討を必要とする。また、Dex 抵抗性のある骨髓腫細胞において、PPAR β を活性化させるとその生存・増殖が抑制されることは興味深い。PPAR β 活性化と GR 活性化による抗 NF- κ B 活性の比較は、PPAR β 活性化が示す抗 NF- κ B 活性の作用機序の理解を深めると考える。また、この作用機序の解明により、PPAR β を活性化し得る低分子化合物(Otsuyama K, Kawano MM, et al. *Leukemia* 2007)が骨髓腫細胞の生存を抑制するメカニズムを知る手がかりとなり得る。このように、PPAR の活性化の詳細な解析は、骨髓腫細胞の恒常的 NF- κ B 活性や骨髓腫細胞の増殖・生存の動態について新たな視点を与えるのみでなく、分子標的治療薬についての新しい考えを与える基盤となると考える。

3. 研究の方法

恒常的 NF- κ B 活性を示す NF- κ B サブユニットが異なる細胞株と恒常的 NF- κ B 活性が弱い細胞株を用いる。これにより、PPAR β 活性化が細胞の生存や抗 NF- κ B 活性にどのように作用しているか比較検討する。

用いる細胞は、p50/p50、p50/RelB および p50/p52 の二量体に恒常的 NF- κ B 活性(DNA 結合能)がみられたヒト骨髓腫細胞株(U266, AMO1, NOP2 など)、p65/p50 にもその活性がみられた B 細胞株(Raji と KUS)、そして NF- κ B 活性が低い T 細胞株(MOLT4)である。

carbacyclin(PPAR β アゴニスト)、Dex(GR アゴニスト)、あるいは PS-341 の刺激前後で、以下のことを明らかにしながら、PPAR β 活性化による抗 NF- κ B 活性の作用機序を解明する。

(1)用いた細胞の生存及びアポトーシス誘導はどうか確認する。

(2)抗 NF- κ B 活性(プロモーター配列(κ B 配列)との DNA 結合能)を受けているか確認する

(gel shift 解析)。

(3)抗 NF- κ B 活性を受けている NF- κ B サブユニットはどれか確認する(super shift 解析)。

(4)PPAR β 、PPAR γ や GR は NF- κ B に直接作用して抗 NF- κ B 活性を示す。したがって、PPAR β 、PPAR γ 、あるいは GR と相互作用している NF- κ B サブユニットはどれか確認する(免疫沈降(IP)-Western blot 解析)。

(5)PPAR β 活性化による NF- κ B 標的遺伝子(CD54, IAP1, CCND1, など)の発現は抑制されているか(定量 PCR (Q-PCR) 解析)。また、PPAR β や GR 標的遺伝子および関連遺伝子の発現はどうか確認する(マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング)。

(6)NF- κ B の転写を制御するコアクチベーターには、p65/p50 では CBP/p300。p50 や p52 のホモダイマーには Bcl3 が必要であり、コリプレッサーには HDAC1 が必要である。そこで、抗 NF- κ B 活性における NF- κ B サブユニットと相互作用しているコアクチベーターやコリプレッサーとの親和性はどうか確認する(IP-western blot 解析、クロマチン免疫沈降法(ChIP 法))。

(7)1~6)に於いて抗 NF- κ B 活性が、ヒト骨髓腫細胞株と NF- κ B サブユニット p65 の活性が高い B 細胞株との間に違いが見られた場合、NF- κ B サブユニット p65 をノックダウンした B 細胞株が刺激後ヒト骨髓腫細胞株と類似性を示すかどうか、生存および NF- κ B 活性を確認する(NF- κ B サブユニット p65 の shRNA の遺伝子導入)。

現在、多発性骨髓腫の治療に Dex と PS-341 の併用が試みられているが、Dex に抵抗性を示す骨髓腫細胞が存在する。PPAR β 活性化はその抵抗性を示す骨髓腫細胞の生存抑制を示すことから、

(8)Dex に抵抗性を示す骨髓腫細胞株と Dex に感受性が高い骨髓腫細胞を用いて、Dex + PS-341 あるいは carbacyclin + PS-341 刺激によって生存抑制に違いが見られるのかどうか確認する。

4. 研究成果

ト骨髓腫細胞株および患者骨髓腫細胞において、恒常的 NF- κ B 活性を PPAR β が NF- κ B の分子に相互作用して抑制することを示すことができた。NF- κ B には NF- κ B1(p105/p50)、NF- κ B2(p100/p52)、RelA(p65)、c-Rel、RelB の 5 つのファミリーからなる。NF- κ B が活性化状態であれば核内に存在するが、患者骨髓腫細胞内ではすべての NF- κ B ファミリーを同定することができた。ヒト骨髓腫細胞株において核内受容体である PPAR β のアゴニスト、カルバサイクリンで刺激後、細胞の生存率は

大きく減少した。刺激後の PPAR β はウエスタンブロット解析の結果、細胞質内から核内へ移行した。また、ゲルシフトアッセイの結果、NF- κ B-DNA 結合能も減少していた。さらに、免疫沈降-ウエスタンブロット解析により、PPAR β と NF- κ B(p65)との相互作用を確認した。これらのことから、PPAR β が活性化することによって、NF- κ B(p65)との相互作用の結果核内移行阻害や NF- κ B 標的遺伝子のプロモーター領域の κ B 配列に結合する能力を抑制することがわかった。コアクチベーターに関する解析を行ったが、特定することにはいたらなかった。患者骨髄腫細胞においても同様の結果が得られた。したがって、デキサメサゾンなどのようなステロイドホルモン薬に抵抗性を示す、つまり核内ホルモンレセプターの中でもグルココルチコイドレセプターを介さない骨髄細胞において、PPAR β を介することで NF- κ B 活性を直接抑制するものとして最もふさわしい分子であることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① CD56 expression in human myeloma cells derived from the neurogenic gene expression: possible role of the SRY-HMG box gene, SOX4. Iqbal MS, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Asaoku H, Kawano MM. **Int J Hematol.** 91(2):267-75, 2010. (査読有)
 - ② 骨髄腫細胞における恒常的NF- κ B活性：その基盤的機構と機能的意義. 大津山賢一郎 **臨床血液** 第50巻6号: 461-467, 2009 (査読無)
 - ③ Constitutively lower expressions of CD54 on primary myeloma cells and their different localizations in bone marrow. Iqbal MS, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Mahmoud MS, Gondo T, Kawano MM. **Eur J Haematol.** 83(4):302-12, 2009. (査読有)
 - ④ IL-6-induced activation of MYC is responsible for the down-regulation of CD33 expression in CD33+ myeloma cells. Shamsasenjan K, Otsuyama K, Abroun S, Iqbal MS, Mahmoud MS, Asaoku H, Kawano MM. **Int J Hematol.** 89(3):310-8, 2009(査読有)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Kawano M, Otsuyama K, Iqbal MS, Gondo T: Perivascular localization of myeloma cells with lower expression of CD54. ; The 71st Annual meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, 10/23-25, 2009. 京都 京都国際会議場
 - ② Iqbal MS, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Kawano M: Up-regulation of SOX4 but not down-regulation of SOX1 in CD56 expression of human myeloma cells. ; The 71st Annual meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, 10/23-25, 2009. 京都 京都国際会議場
 - ③ Iqbal MS, Shamsasenjan K, 大津山賢一郎, 河野道生:「骨髄腫細胞の CD56 発現における SOX 遺伝子群の関わりについて」; 第 48 回日本血液学会中国四国地方会、3/7, 2009. 松山. 文化ホール
 - ④ Iqbal MS, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Kawano M.: “Molecular mechanism of CD56 expression in human myeloma cells”; The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, CA, U.S.A., 12/6-9, 2008. MOSCON CENTER
 - ⑤ Shamsasenjan K, Otsuyama K, Iqbal MS, Mahmoud MS, Kawano M.: “MYC responsible for down-regulation of CD33 expression in myeloma cells”, The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, CA, U.S.A., 12/6-9, 2008. MOSCON CENTER
 - ⑥ Kawano M, Iqbal MS, Otsuyama K, Shamsasenjan K, Amin J, Islam A, Abroun S.: “Decreased expression levels of CD54 associated with decreased activity of CXCL12

in primary myeloma cells.”; The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Francisco, CA, U.S.A., 12/6-9, 2008. MOSCON CENTER

⑦ Otsuyama K, Kawano M: Symposium ”Multiple Myeloma, Constitutive NF-kB activation in myeloma cells; its underlying mechanism and functional significance”; 第 70 回日本血液学会総会、10/10-12, 2008. 京都 京都国際会議場.

⑧ Iqbal MS, Shamsasjan K, Amin J, Islam A, 大津山賢一郎, 河野道生: 「骨髄腫細胞の CD56 発現は神経系遺伝子発現による」; 第 70 回日本血液学会総会、10/10-12, 2008. 京都 京都国際会議場

⑨ 河野道生, Islam A, Amin J, Shamsasjan K, Iqbal MS, 大津山賢一郎: 「単クローン性形質細胞における NF-kB 標的遺伝子 CD54 発現の多様性」; 第 70 回日本血液学会総会、10/10-12, 2008. 京都 京都国際会議場

⑩ 大津山賢一郎, Amin J, Shamsasjan K, Iqbal MS, Islam A, 河野道生: 「骨髄腫細胞株の恒常的 NF-kB 活性の非古典的経路に関わる分子 NIK について」; 第 70 回日本血液学会総会、10/10-12, 2008. 京都 京都国際会議場

⑪ Islam A, Amin J, Shamsasjan K, Iqbal MS, 大津山賢一郎, 河野道生: 「骨髄腫細胞株における NF-kB 活性の高低とストレス刺激抵抗性について」; 第 70 回日本血液学会総会、10/10-12, 2008. 京都 京都国際会議場

⑫ Amin J, 大津山賢一郎, Shamsasjan K, Iqbal MS, Islam A, 河野道生: 「IL-6 依存性および非依存性骨髄腫細胞株における恒常的 NF-kB 活性と NF-kB 標的遺伝子発現の比較」; 第 70 回日本血液学会総会、

10/10-12, 2008. 京都 京都国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大津山 賢一郎 (OOTSUYAMA KENICHIROU)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10432741

(2)研究分担者

河野 道生 (KAWANO MICHIO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40161343

(H20~H21)

(3)連携研究者

なし