

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成22年度～平成23年度

課題番号：22790137

研究課題名（和文） 亜ヒ酸製剤とレチノイン酸の併用療法への適応を目指した研究

研究課題名（英文） Efficacy of combination treatment with arsenic trioxide and all-trans retinoic acid on acute promyelocytic leukemia therapy

研究代表者

角 大悟（SUMI DAIGO）

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：30400683

研究成果の概要（和文）：急性前骨髄性白血病（APL）治療における三酸化ヒ素（ATO）と全トランスレチノイン酸（ATRA）の併用療法の有効性について基礎的な知見を得るために、培養ヒト白血病細胞の分化を指標に検討を行った。その結果、白血病細胞の分化誘導が ATRA 単独添加に比べて ATO と ATRA との共添加で増強された。本成果は、APL 治療における本併用療法の可能性を考える上で重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed basic experiments to determine whether the treatment with all-trans retinoic acid (ATRA) plus arsenic trioxide (ATO) in combination is beneficial in Acute Promyelocytic Leukemia (APL) therapy than that with a single agent. In order to determine the ATRA-induced differentiation is augmented by the addition of ATO, we compared the surface expression of CD11b in human leukemia HL60 cells incubated with ATRA, ATO, or ATRA plus ATO. The result indicates that HL60 cells treated with ATO plus ATRA show further differentiation than those treated with ATRA alone, suggesting that co-treatment of ATO plus ATRA is more effective than the treatment with a single agent in enhancing the differentiation of HL60 cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：中毒学

1. 研究開始当初の背景

三酸化ヒ素（ATO）は、再発・難治性急性前骨髄球性白血病（APL）においてのみ使用認可されている薬剤である。APL の第一選択薬である全トランスレチノイン酸（ATRA）は高い寛解率を示す一方、耐性を生じやすいことが知られており、他剤との併用が望まれ

る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ATO と ATRA の併用療法を目指した基礎的な知見を得ようとするもので、ATRA と ATO の同時投与により白血病細胞へのヒ素の取り込みが促進され、ATO の効

果がより発揮されるのではないかという新しい研究スタイルである。さらに、白血病細胞だけでなく ATRA によるヒ素の取り込み促進が期待される肝臓由来細胞を用いて検討することで、亜ヒ酸製剤の肝臓癌への適用拡大を目指す。

実際には、以下の項目について検討を進めた。

(1) 白血病細胞を用いた ATRA による AQP9 発現上昇, およびそれを介したヒ素の取り込み促進作用

(2) ATRA による ATO の取り込み促進を介した白血病細胞の分化誘導に対する相乗・相乗作用

(3) ATO および ATRA 共添加時における分化誘導作用に関わる因子の同定

(4) 肝臓由来細胞における ATRA による AQP9 の発現上昇, それに起因する ATO の取り込み促進を介した肝臓細胞の細胞死誘導作用

3. 研究の方法

(1) ヒト白血病 HL60 細胞を用いて ATRA の添加によりヒ素の細胞内侵入を制御する aquaglyceroporin-9 (AQP9) 発現が上昇するかについて, mRNA (半定量 RT-PCR) およびタンパク質レベル (ウエスタンブロット法) で検証した。次に, ATRA により発現が誘導された AQP9 によって ATO の取り込みが上昇するかについて ICP-MS を用い測定した。

(2) ATO と ATRA との共存によって ATRA により開始される HL60 細胞の分化がより促進されるかについて検討を行う。HL60 細胞の分化の程度は, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) の還元反応によって産生される不溶性ホルマザンを吸光度で評価した。また, 分化の直接的な指標である細胞表面における CD11b の発現を検討した。

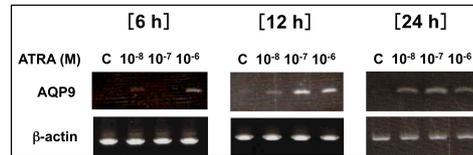
(3) ATRA を添加した HL60 細胞を対照群とし, ATRA と ATO を共添加した HL60 細胞から採取した mRNA における変動した遺伝子群をマイクロアレイで検出した。検出された遺伝子群で分化に関わる事が予想される因子については, mRNA 発現を半定量的 RT-PCR で, タンパク質発現量をウエスタンブロット法にて検出した。

(4) ヒト肝臓 HepG2 細胞を用いて, ATRA 添加により AQP9 の発現が上昇するかについて mRNA 量を半定量 RT-PCR で検証した。また, 細胞毒性については, MTT 法で検討した。

4. 研究成果

(1) HL60 細胞に ATRA を添加した際に AQP9 mRNA 量が上昇するかについて検討した。HL60 細胞に ATRA (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L) の濃度で 6, 12, 24 時間添加したところ, ATRA の濃度依存的に HL60 細胞の AQP9 mRNA の発現が誘導された (図 1)。

図 1



HL60 細胞において ATRA 添加により AQP9 の発現が上昇したことから ATRA により ATO の取り込みの効率が上昇することが予想されたので, ATO 単独および ATRA と ATO の共添加群における一定時間後の細胞内ヒ素蓄積を ICP-MS で検討したところ, 顕著な上昇は認められなかった。今後, 実験の系などを考慮して実験を進めていく予定である。

(2) ATRA による HL60 細胞の分化誘導に対して ATO が相乗作用を示すかどうかについて検討した。分化の指標として NBT に対する還元作用 (図 2) および細胞表面上の CD11b 発現を Flow Cytometry (図 3 a and b) を用い検討したところ, ATO (0.25, 0.5 μ M) 単独添加では分化誘導を示さなかったが, ATO と ATRA を共添加したところ, ATRA による分化誘導作用を ATO の共添加が有意に亢進させた。NBT 還元作用は 72 hours 添加した細胞を使用している。

図 2

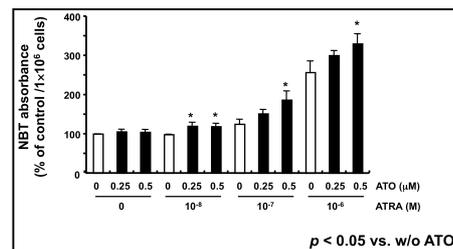


図 3 a

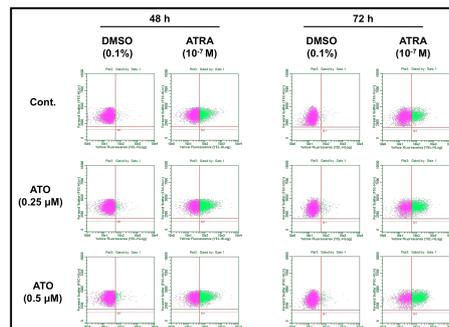
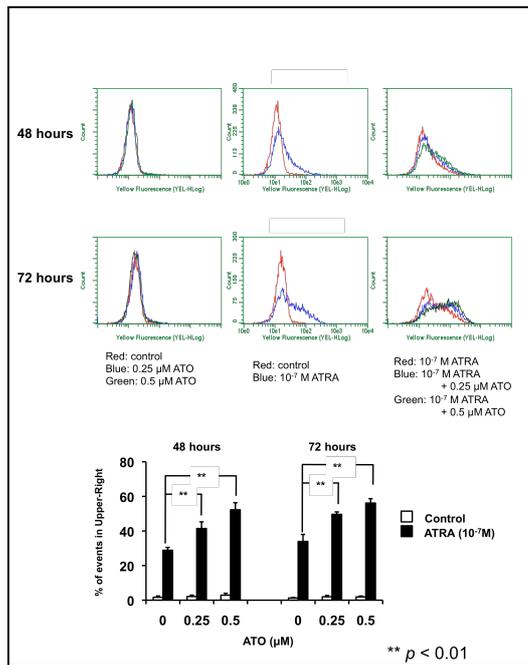


図 3 b



(3) ATO により増強された分化誘導作用に係る分子を同定するために、ATRA および ATO + ATRA を添加した HL60 細胞から総 RNA を用意しマイクロアレイ解析を行った。その結果、ATO により 2 倍以上の発現上昇を示した遺伝子は 71 種、一方 2 倍以上の減少を示した 13 種の遺伝子が検出された (表 1)。

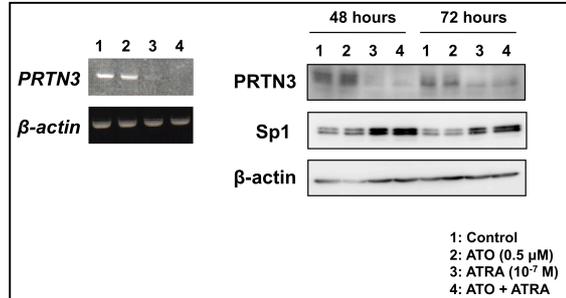
GeneName	SystematicName	Description	Foldchange
PRTN3	NM_002777	reflHomo sapiens proteinase 3 (PRTN3), mRNA (NM_002777)	5.71
DEFB3	NM_005177	reflHomo sapiens defensin, alpha 3, neutrophil-specific (DEFB3), mRNA (NM_005177)	3.15
LPFR3	NM_024888	reflHomo sapiens lipid phosphate phosphatase-related protein type 3 (LPFR3), mRNA (NM_024888)	3.04
HLA-B	NM_005514	reflHomo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), mRNA (NM_005514)	2.80
C16orf74	NM_208967	reflHomo sapiens chromosome 16 open reading frame 74 (C16orf74), mRNA (NM_208967)	2.52
ENST00000376793	ENST00000376793	enslMajor histocompatibility complex, class I, J (pseudogene) (HLA-J), non-coding RNA	2.41
AZU1	NM_001780	reflHomo sapiens azurocidin 1 (AZU1), mRNA (NM_001780)	2.32
HLA-D	M26429	pbHuman MHC class I HLA-D*01 gene, complete cds (M26429)	2.28
MGC29506	NM_016459	reflHomo sapiens plasma cell-induced ER protein 1 (MGC29506), mRNA (NM_016459)	2.23
TERT	NM_182553	reflHomo sapiens telomerase reverse transcriptase (TERT), transcript variant 1, mRNA (NM_182553)	2.18
SMAD6	NM_005585	reflHomo sapiens SMAD family member 6 (SMAD6), transcript variant 1, mRNA (NM_005585)	2.17
GVXLT2	NM_001080393	reflHomo sapiens glucosyl xylosyltransferase 2 (GVXLT2), mRNA (NM_001080393)	2.03
BBD1	NM_015581	reflHomo sapiens B9 protein domain 1 (BBD1), mRNA (NM_015581)	2.01

表 1

ATO により発現上昇を示した遺伝子群のなかで、IL-1 β について検討を行ったところ、ATRA 単独添加に比べて ATO との共添加により培地中 IL-1 β タンパク質量は上昇していたが、抗 IL-1 β 中和抗体によって分化は阻害されなかった。一方、ATO により発現減少を示した遺伝子群のなかで proteinase-3 (PRTN3) について検討を行ったところ、ATRA 単独添加に比べて ATO との共添加により PRTN3 のタンパク質の発現量はさらに減少した。PRTN3 は転写因子 Sp1 を負に制御

していることから、Sp1 のタンパク質発現を検討したところ、ATRA 単独添加に比べて、ATO との共添加によりさらに Sp1 の発現量は上昇した (図 4)。

図 4



(4) 肝癌由来細胞における ATRA による AQP9 の発現上昇、それに起因する ATO の取り込み促進を介した肝癌細胞の細胞死誘導作用を検討するために、ヒト肝癌 HepG2 細胞に ATRA 添加することにより AQP9 の発現が上昇するかについて mRNA 量を半定量 RT-PCR で検証したところ、AQP9 の発現上昇は検出されなかった。

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 5 件)

1. Sumi D., Fukushima K., Miyataka H., Himeno S. Alternative splicing of human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415: 48-53, 2011
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.008
2. Sumi D., Sasaki T., Miyataka H., Himeno S. Rat H9c2 cardiac myocytes are sensitive to arsenite due to a modest activation of transcription factor Nrf2. *Arch. Toxicol.* 85: 1509-1516, 2011
DOI: 10.1007/s00204-011-0700-7
3. Shimizu Y., Fujishiro H., Matsumoto K., Sumi D., Satoh M., Himeno S. Chronic exposure to arsenite induces S100A8 and S100A9 expression in rat RBL-2H3 mast cells. *J. Toxicol. Sci.* 36: 135-139, 2011
http://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/36/1/36_135/_article
4. Abiko Y., Shinkai Y., Sumi D., Kumagai Y. Reduction of arsenic-induced cytotoxicity through Nrf2/HO-1 signaling in HepG2 cells. *J. Toxicol. Sci.* 35: 419-423, 2010.
http://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/35/3/35_419/_article

5. Sumi D, Shinkai Y, Kumagai Y. Signal transduction pathways and transcription factors triggered by arsenic trioxide in leukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244:385-392, 2010
DOI: 10.1016/j.taap.2010.02.012

〔学会発表〕(計29件)

1. 小川智子, 原田久美, 角大悟, 津山博匡, 姫野誠一郎: IL-2によるNK細胞活性化に対する亜ヒ酸の影響. 日本薬学会第132年会 2012年3月, 北海道
2. 角大悟, 福島佳代, 宮高透喜, 與儀邦子, 姫野誠一郎: ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング. 戦略的研究基盤形成支援事業第7回発表会 2011年12月, 徳島
3. 岡田秀太, 角大悟, 浅尾将司, 姫野誠一郎: ATP シグナル伝達に対するヒ素化合物の影響. 戦略的研究基盤形成支援事業第7回発表会 2011年12月, 徳島
4. 新谷繁和, 鶴本未有, 角大悟, 姫野誠一郎: 食道組織に対する亜ヒ酸の影響について. 戦略的研究基盤形成支援事業第7回発表会 2011年12月, 徳島
5. 阿部和沙, 角大悟, 山近杏奈, 田村嶺, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸によるHL60細胞の分化増強作用における因子の探索: 戦略的研究基盤形成支援事業第7回発表会 2011年12月, 徳島
6. 原田久美, 小川智子, 角大悟, 津山博匡, 姫野誠一郎: NK細胞活性化に対する亜ヒ酸の影響. 戦略的研究基盤形成支援事業第7回発表会 2011年12月, 徳島
7. 角大悟, 福島佳代, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 2011年12月, 名古屋
8. 角大悟, 姫野誠一郎: レチノイン酸によるHL60細胞の分化誘導作用に対する亜ヒ酸製剤の有効性. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 2011年12月, 名古屋
9. 角大悟, 福島佳代, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング. 第17回ヒ素シンポジウム, 2011年11月, 茨城
10. 角大悟, 福島佳代, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011年10月, 金沢
11. 角大悟, 姫野誠一郎: レチノイン酸によるHL60細胞の分化誘導作用に対する亜ヒ酸製剤の有効性. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011年10月, 金沢
12. 津山博匡, 角大悟, 小川智子, 姫野誠一郎: ヒトNK細胞における亜ヒ酸の影響とその因子の探索. 第18回日本免疫毒性学会学術大会, 2011年9月, 千葉
13. 福島佳代, 角大悟, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ヒ素メチル基転移酵素のスプライシングフォームの解析. 第22回日本微量元素学会学術集会, 2011年7月, 京都
14. 角大悟, 姫野誠一郎: Efficacy of combination treatment with arsenic trioxide and all-trans retinoic acid on differentiation of HL60 cells. 第21回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2011年5月, 千葉
15. 津山博匡, 角大悟, 藤代瞳, 姫野誠一郎: interferon-beta の産生抑制を介した亜ヒ酸によるNO産生阻害機構. 第16回ヒ素シンポジウム, 2011年2月, 旭川
16. 角大悟, 瀬川実穂, 姫野誠一郎: レチノイン酸によるHL60分化誘導における亜ヒ酸製剤の相乗作用. 戦略的研究基盤形成支援事業第5回発表会 2010年12月, 徳島
17. 浅尾将史, 角大悟, 姫野誠一郎: インターロイキン6産生におけるマンガンとヒ素の相互作用. 第二回メタロミクスフォーラム, 2010年11月, 京都
18. 角大悟: ヒ素化合物の毒性を規定する因子. 戦略的研究基盤形成支援事業第4回発表会 2010年7月, 徳島
19. 角大悟, 清水由里, 藤代瞳, 佐藤雅彦, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸曝露に応答するCa²⁺結合タンパク質S100A9の発現上昇メカニズム. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010年9月, 東京
20. 浅尾将史, 角大悟, 姫野誠一郎: マンガンによるインターロイキン6酸性機序. 日本免疫毒性学会学術集会, 2010年9月, 茨城
21. 佐々木貴彦, 角大悟, 藤代瞳, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ラット肝臓・心臓由来細胞に対する亜ヒ酸毒性の比較(2). 戦略的研究基盤形成支援事業第3回発表会 2009年12月, 徳島
22. 津山博匡, 藤代瞳, 角大悟, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸によるマクロファージ活性化抑制作用とその機序. 戦略的研究基盤形成支援事業第3回発表会 2009年12月, 徳島
23. 土肥美和子, 藤代瞳, 角大悟, 姫野誠一郎: ラット好塩基球形白血病細胞(RBL-2H3)におけるカドミウム, マンガンの取り込みに関わる因子の解析. 戦略的研究基盤形成支援事業第3回発表会 2009年12月, 徳島
24. 小山知博, 藤代瞳, 角大悟, 姫野誠一郎: 近位尿細管不死化細胞におけるカド

- ミウムによる Nrf2 活性化亢進. 戦略的研究基盤形成支援事業第 3 回発表会 2009 年 12 月, 徳島
25. 清水由里, 角大悟, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸曝露による RBL-2H3 細胞の脱顆粒低下における store-operated can entry (SOCE) の関与. 戦略的研究基盤形成支援事業第 3 回発表会 2009 年 12 月, 徳島
 26. 角大悟, 姫野誠一郎: 白血病治療における亜ヒ酸製剤とレチノイン酸の併用療法の可能性. 戦略的研究基盤形成支援事業第 3 回発表会 2009 年 12 月, 徳島
 27. 角大悟, 佐々木貴彦, 藤代瞳, 宮高透喜, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸の心毒性に係る因子の解析. 第 15 回ヒ素シンポジウム 2009 年 11 月, 大阪
 28. 清水由里, 角大悟, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸は Ca 流入の抑制によりラット肥満細胞の脱顆粒を低下させる. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2009 年 11 月, 沖縄
 29. 佐々木貴彦, 角大悟, 藤代瞳, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ラット心臓細胞における亜ヒ酸感受性に係る因子の解析. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2009 年 11 月, 沖縄

[その他]

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab10/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角 大悟 (SUMI DAIGO)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号: 30400683