

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790722
 研究課題名(和文) HDAC 阻害剤による ALL 細胞のアポトーシス・細胞周期停止・分化誘導のメカニズム
 研究課題名(英文) Differential mechanism of HDACi induce cell cycle arrest, apoptosis and differentiation between B-precursor and T-lineage leukemia cells
 研究代表者
 佐藤 広樹 (SATO HIROKI)
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員
 研究者番号：70422681

研究成果の概要(和文)：HDAC 阻害剤である TSA を白血病細胞株に添加することで細胞死、細胞周期停止を誘導し、B-precursor ALL と T-lineage ALL の差異を解析した。B-precursor ALL では細胞死は Bim が、細胞周期停止は p21 の関与が、T-lineage ALL では細胞死には PUMA が、細胞周期停止には CDC25C、CDC2、cyclin の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We added TSA which was HDAC inhibitor in Leukemia cell lines. And we analyzed TSA induced apoptosis and cell cycle arrest in Leukemia cell lines. We used B-precursor ALL and T-lineage ALL, and analyzed difference of each other. When apoptosis was induced, Bim was up-regulated in B-precursor ALL and PUMA was up-regulated in T-lineage ALL. About cell cycle arrest, it was suggested p21 associated with G0/G1 arrest in B-precursor ALL, and CDC25C, CDC2, and cyclins contribute G2/M arrest in T-lineage ALL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学、シグナル伝達、アポトーシス、細胞周期停止、HDAC inhibitor

1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ性白血病(ALL)の予後は治療法の発達に伴い近年大きく改善しているが、11q23 転座型や Philadelphia 染色体を含む症例は未だ難治である。これらを含む腫瘍

細胞に対してエピジェネティックに作用するヒストン脱アセチル化阻害剤(HDAC inhibitor)が細胞死や細胞周期停止を誘導することが知られているが、その機序は不明な点が多く残っている。

2. 研究の目的

本研究は難治性急性リンパ性白血病である 11q23 型を含めた B-precursor ALL 細胞株及び T-lineage ALL 細胞株を用いて HDAC inhibitor、メチル化阻害剤などのエピジェネティックな機序を介する薬剤による細胞死、細胞周期停止のメカニズムの鍵となる蛋白の活性化の機序や、多剤併用における分化誘導の機序を解明すること、そして B-lineage ALL と T-lineage ALL に対する差異の解明を目指すものである。

3. 研究の方法

本研究ではすでに確立されている白血病細胞株に対して HDAC inhibitor である TSA(trichostatin A)に 100nM 添加して解析を行った。

本研究開始前に予備的な実験を行い、B-precursor ALL(KOCL45, KOCL58, KOCL69, KOPN1, KOCL33, KOCL44)、T-lineage ALL(Jurkat, KOPT6, MOLT4)は TSA 添加によって細胞増殖が抑制されることが 3H-thymidine uptake によって確認されていた。

今回は B-precursor ALL、T-lineage ALL の一部の細胞株に対して追加実験を行い以下の解析を行った。

(1)細胞死の誘導: apoptosis が誘導されることの確認は MBL 社から購入した apoptosis kit を用いた。TNF family を介する経路と、主にミトコンドリアを介する経路について検討を行う。具体的対象としては caspase の断片化、チトクロム C の細胞質への放出、Bcl family、BH3 only protein についてであり、これらのうち関与が認められた経路について、検討を重ねていく。検討の方法としては Western blotting 法、Northern blotting 法、RNase Protection assay 法(RiboQuant, Phamingen から解析キットを購入)の手法を用いて行った。

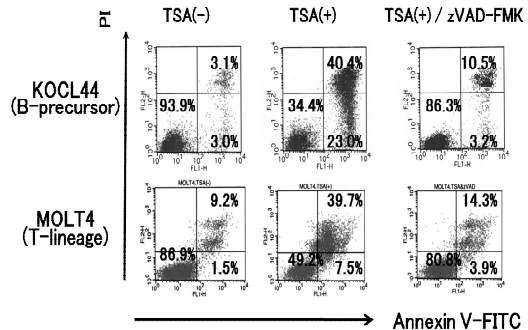
(2)細胞周期停止の誘導: 予備的な実験で TSA 100nM 単独投与後 24 時間で T-lineage ALL で G2/M 期、B-precursor ALL で G0/G1 期に細胞周期停止を来すことが確認されている。G2/M 期に関しては CDC2, CDC25C を、G0/G1 期に関しては、CDK inhibitor, Cyclin, CDK の発現変化について Western blotting 法、Northern blotting 法、RNase Protection assay 法で検討を行う。

また、細胞死と細胞周期停止の関連を検討するために、caspase3 と cyclin および caspase3 と PI staining 法の二重染色を行いフローサイトメーターで解析を行う。

4. 研究成果

(1)細胞死の誘導

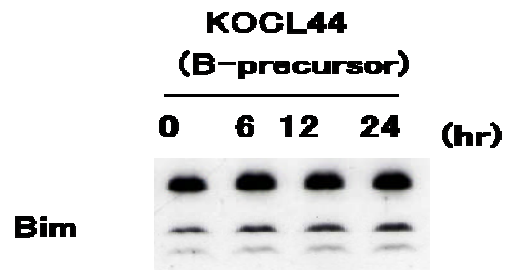
TSA 100nM 添加により B-precursor ALL、T-lineage ALL とともに細胞死が誘導され、caspase 阻害剤である zVAD-FMK により細胞死が阻害された。



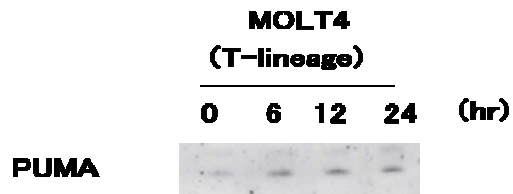
(図 1) TSA 添加により Annexin-TITC 陽性細胞が増加し、細胞死が誘導される。また zVAD-FMK を添加することで細胞死が抑制された。

Western blotting 法を用いて TSA100nM 添加による細胞死の誘導に関連する蛋白発現の変化を解析した。TSA 添加に伴う B-precursor ALL および T-lineage ALL の共通事項として anti-apoptotic 蛋白である Bcl-xL の発現低下、pro-apoptotic 蛋白である Bak、Bid の発現増加を認めた。

また、TSA 添加後経時的に、B-precursor ALL では Bim の発現が増加し、T-lineage ALL では PUMA の発現が増加することを認めた。



(図 2) TSA 添加により B-precursor ALL で BH3 only protein である Bim の発現が増加した。

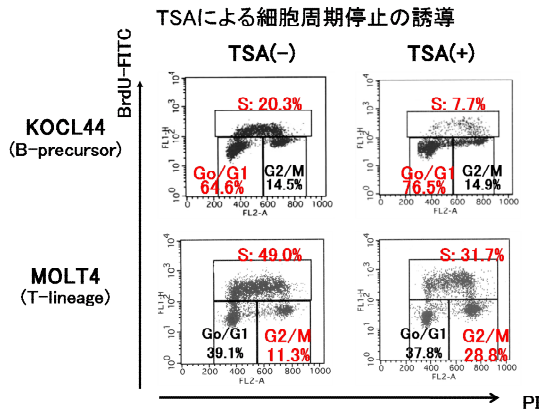


(図 3) TSA 添加により T-lineage ALL で BH3

only protein である PUMA の発現が増加した。

(2)細胞周期停止の誘導

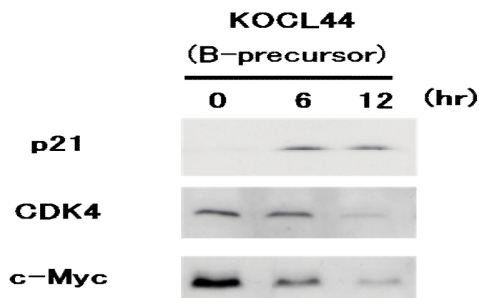
TSA を 100nM 添加し 24 時間で B-precursor ALL、T-lineage ALL ともに細胞周期停止が誘導された。B-precursor ALL では G0/G1 期で、T-lineage ALL では G2/M 期で細胞周期停止が誘導されることが確認できた。



(図 4) TSA 添加により B-precursor ALL、T-lineage ALL とも細胞周期停止が誘導された。両細胞株ともに S 期が減少して細胞周期停止をしているが、B-precursor ALL では G0/G1 期、T-lineage ALL では G2/M 期の細胞が増加している。

この結果を踏まえ、細胞周期に関連する蛋白の発現を Western blotting 法を用いて解析した。

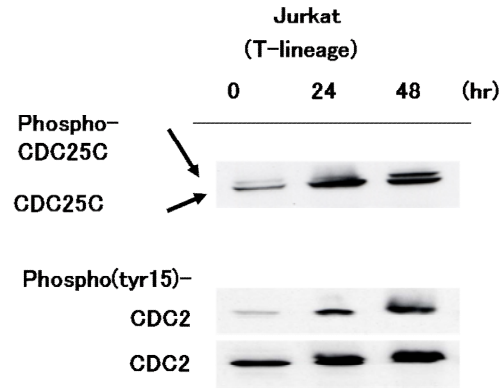
B-precursor ALL では p21 の発現増加、CDK4 および c-Myc の発現低下を認めた。これらの変化のために B-precursor ALL が G0/G1 期で細胞周期が停止することが示唆された。



(図 5) B-precursor ALL に TSA を 100nM 添加して Western blotting 法で解析した。p21 の発現増加、CDK4 および c-Myc の発現減少を認めた。

一方、T-lineage では p21 の発現低下があるものの long exposure を必要とした。また、リン酸化 CDC25C の発現増加による CDC25C の不活化、リン酸化 CDC2 の発現増加があり、これらの変化が G2/M 期での細胞周期停止と

関連していると考えられた。

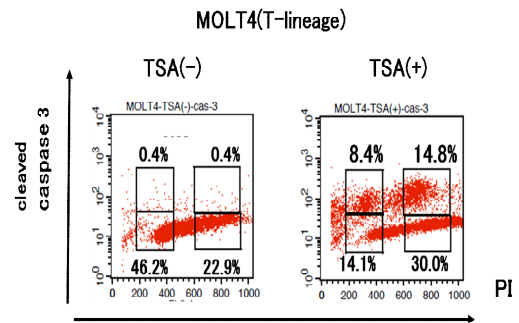


(図 6) TSA100nM 添加後、細胞周期関連蛋白を解析。TSA 添加によりリン酸化 CDC25C の発現が増加している。またリン酸化 CDC2 も同様に発現増加している。

(3) 細胞死と細胞周期停止の関連の解析

上記(1)、(2)から HDAC inhibitor である TSA を 100nM 添加することによって、B-precursor ALL、T-lineage ALL は細胞死とともに細胞周期停止が誘導されることが示された。続いて細胞死を起こす時期と細胞周期停止を起こす時期の関連を調べるために caspase3/PI、caspase3/cyclins の二重染色を行い、フローサイトメーターを用いて解析した。

TSA を 100 nM 添加し、24 時間で解析を行い B-precursor ALL では G0/G1 期で caspase3 陽性細胞が増加し、一方 T-lineage ALL では G2/M 期で caspase3 陽性細胞が増加することが確認できた。



(図 7) TSA 添加により T-lineage ALL である MOLT4 では PI staining で G2/M 期で細胞周期が停止し、caspase3 陽性細胞も G2/M 期で増加している。

また、caspase3/cyclin の解析で、B-precursor ALL である KOCL44 は TSA 添加により caspase3 陽性細胞の増加を来し、アポトーシスの誘導が確認できるがその際に

cyclin A、cyclin B1 の発現減少を認めた。このことから KOCL44 は TSA 添加でアポトーシスが誘導される際に、cyclin の発現が低下しているため G2/M 期に進むことなく細胞死を来すことが導かれた。

一方 T-lineage ALL である MOLT 4 では TSA 添加により caspase3 陽性細胞の増加とともに cyclin A、cyclin B1 の発現が増加していた。このことから MOLT4 では G0/G1 期で細胞周期停止を来すことなく G2/M 期に到るものと考えられた。

HDAC inhibitor によるアポトーシスおよび細胞周期停止が誘導されること、そして B-precursor ALL と T-lineage ALL の違いを解析した。今後は他の細胞株でも同様の結果が得られることの確認を行い、また各カスケードの上流の蛋白発現の変化を解析していく予定である。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 広樹 (SATO HIROKI)

山梨大学・大学院工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：70422681

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし