

機関番号：32645

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790324

研究課題名 (和文) SURVIVIN を標的とした成人 T 細胞白血病の治療法の開発

研究課題名 (英文) development of survivin targeted therapy for Adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者

車 暁芳 (CHE XIAO-FANG)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10437973

研究成果の概要 (和文)：

成人 T 細胞白血病 (Adult T cell Leukemia, ATL) における survivin の高発現が抗がん剤耐性の一つの要因である。survivin は特異的に腫瘍細胞で発現し、がん治療の標的分子として魅力的である。Survivin は dimer を形成して働き、BIR 領域を通じて XIAP と結合し、XIAP を安定化させ、caspase-9 の活性化を阻害することによってアポトーシスを抑制していると考えられる。我々は survivin が dimer を形成する領域 (89-103aa) と XIAP と結合する部位 (15-38aa) の N 末端に膜透過キャリアー (TAT 蛋白の Protein transduction domains, PTD) をつけたペプチド (PTD-(89-103aa) と PTD-(15-38aa)) を作製した。そのうちの PTD-(15-38aa) は種々の白血病細胞株 (成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞株 S1T と MT2、白血病細胞株 HL60、NB4、K562、Jurkat、) に対して、濃度と時間に依存して細胞の増殖を抑制するが、正常細胞の肺線維芽細胞株 HEL と正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC の増殖に影響しないことを見出した。ATL 細胞株 S1T に対して短時間 (2 時間) の処理でも、細胞死を誘導したことを Giemsa 染色で観察した。PTD-(15-38aa) で S1T 細胞を 2 時間処理し、Annexin V と PI による FACS 解析を行い、アポトーシスが誘導されたことを確認したが、Caspase-3 活性の上昇が認められなかった。免疫ブロット法でも、Caspase-9、caspase-3、PARP の分解が見られなかった。一方、LC3-II の発現レベルが PTD-(15-38aa) の濃度に依存して上昇し、p62 の発現レベルが低下した。以上の結果から、S1T 細胞において、PTD-(15-38aa) がオートファージ誘導によってアポトーシスを引き起こしたことを示唆した。COS 細胞に Flag-XIAP と Myc-survivin をトランスフェクションし、PTD-(15-38aa) の survivin と XIAP の結合に対する影響を免疫沈降法で調べ、survivin と XIAP の結合を増強した結果が得られた。以上の結果は、PTD-(15-38aa) が白血病細胞、特に ATL 細胞の増殖を抑制し、オートファージ誘導によってアポトーシスを引き起こすことを明らかにした。このアポトーシス誘導作用は caspase 活性化に関与しないことを示唆した。これらの研究によりこの survivin を標的とした PTD-(15-38aa) が caspase-3 の活性化に関与しないオートファージ誘導によって腫瘍細胞、特に ATL 細胞のアポトーシスを誘導したことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Survivin, an inhibitor of apoptosis protein, is highly expressed in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), and associated with chemotherapy resistance. Specifically overexpression of survivin has been reported in almost all human malignancies, but not

detectable in normal tissues, making survivin targeted therapy an attractive ATL therapy strategy. Survivin is functioning as a homodimer, and interacts with XIAP through N-terminal single globular baculovirus IAP repeat (BIR) domain, protecting XIAP from ubiquitination and increasing its stability that promotes caspase-9 inhibition. In this study, peptides containing the survivin sequence for homodimer formation between Val89 and Lys103 (PTD-(89-103aa)), and the sequence for interacting with XIAP between Lys15 and Met38 (PTD-(15-38aa)), adding the protein transduction domains (PTD) of TAT protein to their amino-terminals for cell permeable, were synthesized. The growth of various leukemia cell lines (ATL cell lines S1T and MT2, leukemia cell lines HL60, NB4, K562, Jurkat) was strongly inhibited after 2 hr incubation with PTD-(15-38aa). However, no growth suppression was observed in the normal cell lines, lung fibroblast cells HEL and Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells HUVEC. Significant cell death of S1T cells was observed after 2hr treatment with PTD-(15-38aa) by Giemsa staining. The proportion of apoptosis fraction estimated by FACS with Annexin V and PI staining in S1T cells was increased in the dose dependent manner. However, Degradation of caspase-9, caspase-3 and PARP was not detected by immunoblotting. Unexpectedly, we found that PTD-(15-38aa) treatment caused a dose dependent increase in the expression of LC3-II and decrease in the expression of p62. These results indicated that autophagy involved in the PTD-(15-38aa)-induced apoptosis in S1T cells. The effect of PTD-(15-38aa) on the interacting of survivin with XIAP was investigated in COS cells co-transfected with Flag-XIAP and Myc-survivin by immunoprecipitation. Contrary to expectation, PTD-(15-38aa) dose dependently enhanced the binding of survivin with XIAP. These results suggested that PTD-(15-38aa) strongly inhibited the proliferation of leukemia cells, specifically ATL cells, and caspase activation is not involved in the induction of autophagy-mediated apoptosis by PTD-(15-38aa).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010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：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ATL、survivin、XIAP

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-1 の感染による T 細胞白血病である。ATL の抗癌剤治療抵抗性が高いため予後は極めて不良である。ATL の薬剤耐性は P-糖蛋白質や MRP1 などの薬剤排出ポンプの発現と survivin などのアポトーシス阻害因子の過剰発現と関係あることが知られている。我々は、アポトーシスを抑制する因子である survivin が ATL、特に急性型 ATL に高発現することを見出し、ATL 細胞の抗癌剤耐性の一つの要因と考えている。Survivin は胎児期を除き、ほとんどの正常組織では検出できない。一方、各種の固形腫瘍やリンパ腫、白血病などの造血器悪性腫瘍細胞で高発現している。Survivin は特異的に腫瘍で高発現するので、治療の標的分子として魅力的である。

survivin は抗アポトーシス蛋白質である IAP (inhibitor-of-apoptosis) ファミリーのメンバーであり、17q25 に位置し、142 アミノ酸、分子量 16.5KDa の小さい分子である。Survivin は、一つの BIR 領域を有し、C 末端に coiled coil と呼ばれるヘリックス構造を持ち、微小管と結合し、Ring finger 領域がないにも関わらずユビキチン化される、などの特徴を有している。Survivin はホモダイマーを形成して働いている。

Survivin は Caspase-3、7、9 と結合し、caspase3、7、9 の活性化を阻害することによってアポトーシスを抑制するという報告がある。一方、survivin は caspase3、

7 と直接結合することができず、hepatitis B X-interacting protein (HBXIP) を介して、caspase9 の活性化を抑制するという報告もある。*In vitro* では、survivin が caspase3、7 と結合する能力は、XIAP よりかなり弱い。Survivin は BIR 領域を通じて XIAP と結合し、XIAP を安定化させ、caspase9 の活性化を阻害する。Cell free system において、survivin の caspase 活性化の抑制は Smac/Diablo と XIAP 両方の存在が必要である。Survivin の K79 ~L87 は HSP90 と結合する部位で、この部位のペプチド (Shepherdin) は survivin と HSP90 の結合を阻害し、がん細胞にだけ増殖抑制作用を示した。Survivin のアポトーシス抑制機構は、細胞内では直接 caspase3、7 と結合するのではなく、他分子との相互作用によってアポトーシスを抑制していると考えられる。

2. 研究の目的

Survivin の癌特異的発現は、survivin をがん治療のための標的分子として魅力的にしている。Survivin の機能を抑制するペプチドは Shepherdin 以外にまだ報告がない。ATL 細胞では、Tax の発現と関係なく survivin が高発現している。我々は ATL 細胞株 S1T と MT2 を用いて実験を行い、survivin が他の分子と結合する部位を標的とするオリゴペプチドを合成し、細胞の増殖、アポトーシスに対するこれらのペプチドの影響を調べ、影響力の強いペプチドが survivin と他の分子の結合を阻害するかを調べ、ATL 細胞の生存に、重

要な survivin 結合分子を探り、この結合部位を標的とした ATL の新しい治療法を開発する。

3. 研究の方法

- ① survivin のダイマー形成に関与する部位 (89-103aa)、XIAP と結合する部位 (15-38aa)、HSP90 と結合する部位 (79-87aa) の N 末端に膜透過キャリアー (TAT 蛋白質の protein transduction domains, PTD) をつけたペプチド (PTD-(89-103aa)、PTD-(15-38aa)、PTD-Shepherdin) を作製する。ペプチドが細胞に入れるかを観察するために、FITC で標識した FITC-PTD-(89-103aa) を作製する。コントロールとしては GFP のアミノ酸配列を持つオリゴペプチドを用いる。
- ② 各濃度の FITC-PTD-(89-103aa) で ATL 細胞株 S1T と MT2 を 2 時間処理し、各ペプチドが確実に細胞に入るかを共焦点顕微鏡で確かめる。
- ③ 各ペプチドの S1T と MT2 細胞に対する毒性を MTT assay で調べ、各ペプチドの S1T と MT2 細胞に対する増殖抑制効果を評価し、その効果を比較する。
- ④ 各ペプチドで ATL 細胞株 S1T を処理し、Giemsa 染色で細胞死を観察する。
- ⑤ 各ペプチドで処理した ATL 細胞を Annexin V と PI で染色し、FACS で解析し、各ペプチドのアポトーシス誘導効果を比較する。
- ⑥ 各ペプチドで ATL 細胞を処理し、caspase-3、caspase-9、PARP、LC3、p62、XIAP、survivin などの発現レベルの変化をイムノブロット法で調べる。
- ⑦ His-survivin と Flag-XIAP を作製し、COS 細胞に導入し、PTD-(15-38aa) の処

理による XIAP の崩壊変化を免疫沈降法で調べる。

4. 研究成果

結果：

- ① 我々は survivin の dimer を形成する領域 (89-103aa) の N 末端に膜透過キャリアー (TAT 蛋白質の Protein transduction domains, PTD) をつけ、FITC で標識したペプチド (FITC-PTD-(89-103aa)) を作製した。ATL 細胞株 S1T と MT2 を 2 時間処理し、FITC-PTD-(89-103aa) の ATL 細胞への分布を共焦点顕微鏡で確かめた。
- ② PTD-(89-103aa)、PTD-(15-38aa)、PTD-Shepherdin などのペプチドで S1T と MT2 細胞を処理し、MTT assay で評価した結果、各ペプチドの濃度に依存して S1T と MT2 細胞の増殖が抑制された。特に PTD-(15-38aa) は報告された Shepherdin と同じ程度の細胞増殖抑制効果を示した。PTD-(89-103aa) と PTD-(15-38aa) の短時間 (2 時間から) 処理でも、S1T と MT2 細胞の増殖を抑制した。以上の結果から survivin の XIAP と結合する部位を標的とするペプチド PTD-(15-38aa) は短時間で強い細胞増殖抑制効果があることを示した。
- ③ PTD-(89-103aa) あるいは PTD-(15-38aa) で処理した S1T と MT2 細胞を Annexin V/PI で二重染色し、アポトーシスを誘導することを FACS で確認した。
- ④ PTD-(15-38aa) の白血病細胞株 HL60、Jurkat、K562、NB4、肺線維芽細胞株 HEL、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に対する毒性があるかを MTT assay で調べ、正常細胞株 HEL と HUVEC の増殖に影響しないが、白血病細胞株 HL60、Jurkat、K562、NB4 に対して、濃度に依存して細胞の増殖を抑制することを見出した。

⑤PTD-(15-38aa)は survivin と XIAP の結合を阻害し、survivin による XIAP の安定化ができなくなって、崩壊し、caspase-9、caspase-3 が活性化し、アポトーシスを誘導すると予測したが、PTD-(15-38aa)による caspase-9 と caspase-3 の活性化、PARP の分解がイムノブロットで認められなかった。

⑥PTD-(15-38aa)で S1T 細胞を処理し、LC3-II の発現レベルが PTD-(15-38aa)の濃度に依存して上昇し、p62 の発現レベルが低下した。この結果は PTD-(15-38aa)が S1T 細胞のオートファージを誘導したことを示唆した。

⑦COS細胞に Flag-XIAP と Myc-survivin をトランスフェクションし、PTD-(15-38aa)の survivin と XIAP の結合に対する影響を免疫沈降法で調べ、survivin と XIAP の結合を増強した結果が得られた。

まとめ：

以上の結果は、XIAP と結合する部位を標的とするオリゴペプチド PTD-(15-38aa)が正常細胞の増殖に影響がないが、白血病細胞、特に ATL 細胞の増殖を抑制し、オートファージによるアポトーシスを誘導することを明らかにした。PTD-(15-38aa)が survivin と XIAP の結合を増強させたことと、caspase-9 と caspase-3 が活性化しなかったことから、このアポトーシス誘導作用は caspase 活性化に関与しないことを示唆した。

結論：

survivin を標的とした PTD-(15-38aa)が caspase の活性化に関与しないオートファージ誘導によって白血病細胞、特に ATL 細胞のアポトーシスを誘導したことを明らかにした。

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)

①Che X-F, Zheng C-L, Akiyama S, Tomoda A. 2-Aminophenoxazine-3-one and 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α ,7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one cause cellular apoptosis by reducing higher intracellular pH in cancer cells. **Pro. Jpn. Acad., Ser.B.** 87: 199-213, 2011 (査読有)

②Kawaguchi T, Che X-F. (他 6 名 5 番目) Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. **Int J Oncol.** 38: 643-654, 2011. (査読有)

③Nagata H, Che X-F. (他 5 名 2 番目) Rapid decrease of intracellular pH associated with inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger precedes apoptotic events in the MNK45 and MNK74 gastric cancer cell lines treated with 2-aminophenoxazine-3-one. **Oncol Rep.** 25: 341-346, 2011. (査読有)

④Matsushita S, Che X-F. (他 15 人 4 番目) The role of thymidine phosphorylase in the induction of early growth response protein-1 and thrombospondin-1 by 5-fluorouracil in human cancer carcinoma cells. **Int J Oncol.** 36: 1193-2000, 2010 (査読有)

⑤Zheng C-L, Che X-F. (他 3 名 2 番目) 2-Aminophenoxazine-3-one induces cellular apoptosis by causing rapid intracellular acidification and generating reactive oxygen species in human lung adenocarcinoma cells. **Int J Oncol.** 36:641-650, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 田畑 祥

チミジンホスホリラーゼ発現腫瘍細胞における NF-κB の活性化機構. 第 13 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2009 年 6 月 徳島市

② Sho Tabata

Molecular basis for the activation of NF-κB by thymidine phosphorylase. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 横浜

③ Kentaro Minami

The expression of CNT1 and RRM1 are related to the Gemcitabine resistance in the pancreatic Gemcitabine resistant cells. 第 69 回日本癌学会総会 2010 年 9 月 大阪

④ Yoshinari Shinsato

The repression of MLH1 is related to TMZ resistance of the human glioma U251 cells. 第 69 回日本癌学会総会 2010 年 9 月 大阪

⑤ Shota Moriya

Bafilomycin A1 induces ER stress and enhances the cytotoxic effect of bortezomib in U266 myeloma cells (Linkage among proteasome, autophagy and ER stress.) 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

車 曉芳 (CHE XIAO-FANG)

東京医科大学・助教

研究者番号 : 10437973