

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591147

研究課題名 (和文) 白血病細胞増殖における神経栄養因子の役割の解明とその治療への応用

研究課題名 (英文) Effect of BDNF on proliferation of leukemic cells and application to the treatment.

研究代表者 吉田 安宏 (YOSHIDA YASUHIRO)

産業医大・医学部・准教授

研究者番号 10309958

研究成果の概要：

申請者は神経栄養因子の一つである BDNF が白血病細胞株より恒常的に産生されていることを見出した。BDNF は免疫細胞 (例えばマクロファージなど) のはたらきを抑制することで、白血病細胞が増殖しやすい環境を整えていることがわかった。特に CD3 により BDNF の受容体である TrkB が誘導されること、また BDNF により制御性 T 細胞が誘導されることは、抗腫瘍効果を考える上で非常に興味深い知見である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2080,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：血液内科学 研究分野コード：7209

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：白血病、BDNF、マクロファージ、サイトカイン、Treg

1. 研究開始当初の背景

白血病細胞の生存・増殖に種々の液性因子、例えばサイトカインなどの関与が報告されている。これらの因子や HTLV-1 遺伝子産物である Tax により種々の遺伝子が活性化され、成人 T 細胞白血病 (ATL) では高カルシウム血症や腫瘍熱といった炎症反応に関与することが知られている。しかしながら今までに報告のある因子による影響だけでは白血病細胞の活性化・異常増殖を説明することはできない。そのため他の因子の探索も精力的に行われており、それに伴い細胞内活性化機構

の解析が分子レベルで検討されている。

平成 17-18 年度科学研究費若手研究 (B) において、申請者は白血病細胞で恒常的に活性化されている STAT 分子に注目し、その増殖メカニズムを解析し報告した (参考文献 Yoshida et al., The complex of NF- κ B and STAT1 in macrophage is involved in endotoxin shock. J Immunol, 176, sp194 (Abstract), 2006)。その課題の中で STAT3 と会合している分子として TrkB レセプターが存在することを免疫沈降法により観察していた (図 1 参照)。そこで申請者は TrkB の

リガンドで神経栄養因子の一つである、BDNFの発現を調べたところ、白血病細胞株が恒常的に BDNF 及び TrkB の mRNA を発現していることを見出した (図 2、参考文献 Yoshida et al., The BDNF production in HTLV-1 infected cell lines, MT-2 and HUT102. European Cytokine Network, 17, sp45 (Abstract), 2006)。BDNF は神経の増殖に関与する分子として広く知られており、これらを考え合わせると、白血病細胞株において BDNF が何らかの形で細胞増殖に関与している事、更には BDNF によるオートクライン機構の存在を想起させる。

白血病細胞の増殖には STAT3 が不可欠であるという報告が最近なされており (参考文献 Chiarle et al., Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. Nat. Medicine, 11, 623, 2005)、我々も白血病細胞株において恒常的な STAT の活性化を観察している。また BDNF の刺激により STAT が活性化されるという報告に加え (参考文献 Ng et al., STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling. J Biol Chem, 281, 15636, 2006)、我々も BDNF の特異的なレセプターである TrkB と STAT3 が会合している事、更には抗 BDNF 抗体による部分的な増殖の阻害も予備実験にて観察している。以上を鑑みると STAT3 分子の恒常的な活性化に BDNF の関与は十分考えられるものの、血球細胞及び白血病細胞においては未だ十分な解析がされていない。

2. 研究の目的

本研究では白血球増殖性疾患における BDNF-TrkB の役割を細胞内イベントから解析し、新たな創薬の焦点・治療法の確立につなげることを目的としている。

本課題ではまず、初年度に細胞株などを用いた in vitro での解析を中心に行っていく。特に BDNF 産生に伴う細胞内イベント (転写因子の活性化、シグナル伝達経路) 及び細胞増殖と分泌タンパク (BDNF や他のサイトカイン) の関係を明らかにしていく事を目的とする。また、TrkB の血球細胞系および癌細胞における発現様式について解析する。

さらに次年度においては、産生された BDNF が周りの正常免疫細胞に及ぼす影響について特に制御性 (抑制性) T 細胞を中心に解析を進める。この制御性 T 細胞を誘導することにより、癌細胞が免疫系から回避している可能性を調べる。加えて、実際の白血病患者から血清、及びリンパ球を採取し、細胞株で観察された活性化機構が存在するかを調べ、BDNF と白血病細胞の異常増殖との関連をヒトサンプルで評価する計画を立てている。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞株を用いた細胞増殖反応の検討

① 白血病細胞株 (MT-2、HUT102 など、及び対照群として Jurkat 細胞株) の培養液中に BDNF 或いは抗 BDNF 抗体、抗 BDNF レセプター抗体を作用させ、その増殖への影響を時間経過と共に検討する (図 2-A)。解析は³H]チミジンの取り込み、或いは AlamarBlue により評価する。

また、我々は恒常的な BDNF の産生を HTLV-1 感染細胞株で見つけた。HTLV-1 感染細胞株では種々のタンパク、kinase の活性化に癌遺伝子である Tax の関与が強く示唆されている。そこで BDNF 産生に Tax が関与しているかどうかを Tax negative 白血病細胞株を用いて検討する。

(2) BDNF と特異的レセプターである TrkB からのシグナル伝達の解析

TrkB のアミノ酸配列を調べたところ、C 末端側に YxxQ(749-752) という配列が含まれていることが分かった。この配列は STAT3 がレセプターに結合する際の特徴的な配列であることがわかっている (参考文献 Sekine et al., J Immunol. 176 380-390, 2006)。

① 白血病細胞株では恒常的な癌遺伝子・転写因子の活性化が観察される事を我々は報告している。そこで STAT3、NF- κ B、BDNF シグナルへの関与が知られている CREB (参考文献 Lonze et al., Neuron 35, 605-623, 2002) の BDNF による活性化への影響を、レポータープラスミド及び特異的プローブを用いたルシフェラーゼアッセイとゲルシフトアッセイにより検討する。

② ①における BDNF の産生をブロックした際の活性化を検討する。ブロックの方法としては抗体による BDNF 産生のブロック、また siRNA をトランスフェクションした細胞を用いた細胞内 (遺伝子レベル) でのブロックの方法を計画している。

③ リンパ球の細胞溶解液を調製し、上記シグナルに関与するリン酸化酵素 (例えば、IKK、MAPK など) の活性化をウエスタンブロット法にて解析する。

④ ①-③を踏まえ、それぞれの条件下で STAT3、NF- κ B、CREB 依存的なサイトカイン産生 (IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-6 など) を ELISA 法により測定する。

(3) BDNF の免疫細胞への影響の検討

白血病細胞株から産生された BDNF が正常免疫細胞に及ぼす影響を解析する。Sharma らは肺癌細胞から分泌される物質により制御性 (抑制性) T 細胞が誘導され、それにより

癌細胞は正常細胞からの攻撃を回避していることを報告している(参考文献 Sharma et al., Cancer Re. 65 5211-5220, 2005.)。制御性 T 細胞は表面マーカーとして CD4⁺CD25⁺、細胞内マーカーとして FoxP3 が知られている。そこでこれらをモニターする事(フローサイトメトリー及び RT-PCR 法)により、BDNF による制御性 T 細胞の誘導について解析する。

4. 研究成果

(1) 白血病細胞株を用いた細胞増殖反応の検討

白血病細胞株(MT-2、HUT102、Jurkat 細胞株など)の培養液中に BDNF 或いは抗 BDNF 抗体を作用させ、その増殖への影響を時間経過と共に AlamarBlue の呈色により評価した。抗 BDNF 抗体による顕著な細胞増殖阻害は認められなかった。これは抗体が中和抗体としての親和性が低かった要因が挙げられ、更なる検討が必要であると考えられた。

(2) BDNF の免疫細胞への影響の検討

白血病細胞株から産生された BDNF が正常免疫細胞に及ぼす影響をチオグリコレートで誘導した腹腔マクロファージを用いて解析した。まずこれら腹腔マクロファージが BDNF のレセプターである TrkB を発現していることをウエスタンブロットにより確認した。マクロファージは抗腫瘍サイトカインを産生し(TNF- α や IL-12)、抗腫瘍作用を発揮する免疫細胞である。腹腔マクロファージを BDNF で前処理すると LPS により誘導される TNF- α 、IL-12 の産生が有意に減少した。更に BDNF で前処理した腹腔マクロファージは A20 細胞株に対する細胞障害活性も低下していた(図3)。

これらのことから白血病細胞株から産生された BDNF がマクロファージに作用し抗腫瘍活性を低下させることで、白血病細胞の増殖を促進している可能性が示唆された。

(3) ヒト末梢血細胞を用いた BDNF の細胞増殖反応及びサイトカイン産生への影響

ヒト末梢血細胞を調製し、細胞増殖反応を [³H]-thymidine の取り込みによる DNA 合成能により解析した。ConA により誘導された増殖を BDNF は顕著に抑制した(図4)。また LPS で 24 時間刺激し、細胞上清中のサイトカイン産生を ELISA 法により測定した。IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12p40 が誘導され、BDNF は IL-12p40 の産生を抑制した。

(4) BDNF のレセプターである TrkB 発現誘導の検討

マウス脾臓細胞から CD4⁺、CD8⁺、B220⁺細胞を磁気ビーズ法により分離し、抗 CD3 抗体で刺激後 24 時間で harvest した。その細胞溶解液を用いて、ウエスタンブロットを行った。CD4⁺細胞を抗 CD3 抗体で刺激した場合に、

TrkB の発現誘導が認められた(図5)。

(5) CD3 刺激及び BDNF による制御性 T 細胞の誘導の検討

マウス脾臓細胞から CD4⁺細胞を分離し、抗 CD3 抗体或いは BDNF により 48 時間刺激し harvest した。その細胞溶解液を用いて、ウエスタンブロットを行ったところ、抗 CD3 抗体及び BDNF により、制御性 T 細胞のマーカーである Foxp3 の発現誘導が認められた(図6)。

以上より、白血病細胞から産生される BDNF は免疫システムに作用し、抗腫瘍効果を持つサイトカイン産生の抑制や制御性 T 細胞の誘導により、白血病細胞増殖の環境を整えている可能性が示唆された。

IP with
TrkB
STAT3
WB with anti-STAT3

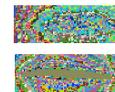


図1

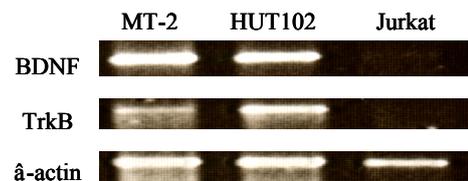


図2

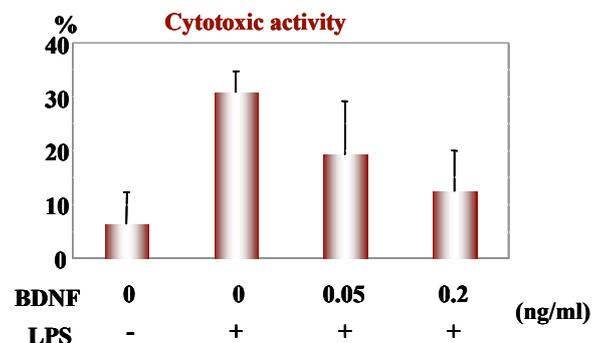


図3

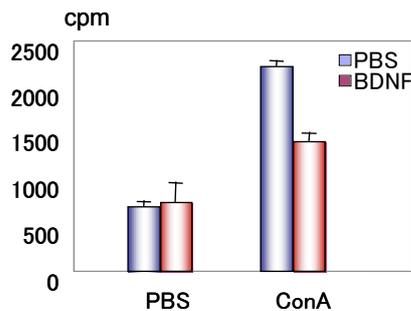


図4

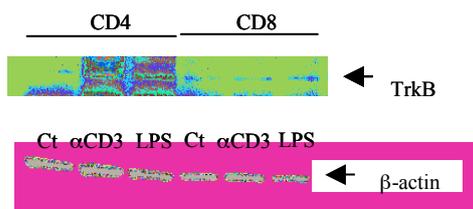


図5

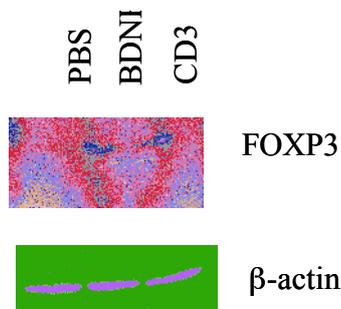


図6

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 8 件)

1. Yoshida, Y., Nakano, Y., Ueno, S., Liu, J. Q., Fueta, Y., Ishidao, T., Kunugita, N., Yanagihara, N., Sugiura, T., Yamashita, U. and Hori, H. :
Effects of 1-bromopropane, a substitute for chlorofluorocarbons, on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression. Int ImmPharma, 9:433-438, 2009 査読有

2. Takahashi, N., Yoshida, Y., Sugiura, T., Matsuno, K., Fujino, A. and Yamashita, U. :
Cucurbitacin D isolated from Trichosanthes kirilowii induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma. Int ImmPharma, 9:508-513, 2009 査読有

3. Yoshida, Y., Liu, J. Q., Sugiura, T., Ishitao, T., Ueno, S., Yanagita, H., Fueta, Y., Kunugita, N., Hori, H. and Yamashita, U. :
An indoor air pollutant 2-ethyl-hexanol activates CD4 cells
Chemico-Bio Intera, 177:137-141, 2009. 査読有

4. Liu, J., Yoshida, Y. and Yamashita, U. :
DNA-binding activity of NF-kappaB and phosphorylation of p65 are induced by N-acetylcysteine through phosphatidylinositol (PI) 3-kinase. Mol Imm, 45:3984-3989, 2008. 査読有

5. Mouri, F., Tsukada, J., Mizobe, T., Higashi, T., Yoshida, Y., Minami, Y., Izumi, H., Kominato, Y., Kohno, K. and Tanaka, Y. :
Intracellular HMGB1 transactivates the human IL1B gene promoter through association with an Ets transcription factor PU.1. Eur J Heamatology, 80:10-19, 2008. 査読有

6. Mizobe, T., Tsukada, J., Higashi, T., Mouri, F., Matsuura, A., Taniguchi, R., Minami, Y., Yoshida, Y. and Tanaka, Y. :
Constitutive association of MyD88 to IRAK1 in HTLV-1-transformed T-cells. Exp Hematology, 38:1812-1822, 2007. 査読有

7. Liu, J., Yoshida, Y. and Yamashita, U. :
Suppressive effect of reactive oxygen species on CD40-induced B cell activation. FEBS Lett, 581:5043-5049, 2007. 査読有

8. Unlu, S., Kumar, A., Waterman, WR., Tsukada, J., Wang, KZ., Galson, DL. and Auron, PE. :
Phosphorylation of IRF8 in a pre-associated complex with Spi-1/PU.1 and non-phosphorylated Stat1 is critical for LPS induction of the IL1B gene. Mol Immunol, 44:3364-3379, 2007. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 吉田 安宏, 劉 冀琴, 山下 優毅
Activation of NF- κ B is induced by
N-acetylcysteine through phosphatidyl
inositol (PI) 3-kinase
2008.12.03 第31回日本分子生物学会 (神
戸)
2. 吉田 安宏, 山下 優毅
BDNF attenuated cytokine production and
induced FOXP3 in CD4 cells
2008.12.12 第38回日本免疫学会 (京都)
3. Yoshida, Y. and Yamashita, U. :
A non-phosphorylated STAT1 enhanced
LPS-induced NF- κ B activation.
33rd FEBS Congress and 11th IUMBM
Conference
2008.06.29 Athens, Greece
4. 吉田 安宏, 劉 冀琴, 山下 優毅
TRAF6 C-terminal domain plays an
inhibitory role of VEGF gene in leukemic
cell line, HUT102.
2007.12.14 第30回日本分子生物学会 (横
浜)
5. 吉田 安宏, 劉 冀琴, 山下 優毅
Cytokine production in macrophage is
attenuated by Brain-derived neurotrophic
factor (BDNF) produced by leukemia cell
2007.11.22 第37回日本免疫学会 (東京)
6. Yoshida, Y., Liu JQ. and Yamashita, U. :
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
produced by leukemia cell attenuated
cytokine production in macrophage.
International Cytokine Society Conference
2007
2007.10.28 San Francisco, CA,
7. 吉田 安宏, 山下 優毅
IL-1 シグナルにおける分子標的薬
(Symposium session)
2007.07.06 第72回日本サイトカイン・イン
ターフェロン学術集会 (京都)

[図書] (計 1 件)

1. 吉田 安宏, 山下 優毅:
炎症と免疫における分子標的治療の新展開
IL-1
2007.9月号 83-88 先端医学社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 安宏 (YOSHIDA YASUHIRO)
産業医大・医学部・准教授
研究者番号 10309958

(2) 研究分担者

塚田 順一 (TSUKADA JUNICHI)
産業医大・医学部・准教授
研究者番号 20227367

岡田 和将 (OKADA KAZUMASA)
産業医大・医学部・助教
研究者番号 30341499