

平成21年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790239  
 研究課題名（和文） ATL細胞でのヒ素によるNF- $\kappa$ B活性抑制とsurvivin発現抑制の分子機序  
 研究課題名（英文） The mechanism of suppression of NF- $\kappa$ B activity and survivin expression by sodium arsenite in ATL cells  
 研究代表者  
 車 暁芳（CHE XIAO-FANG）  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：10437973

## 研究成果の概要：

成人T細胞白血病（ATL）は抗癌剤治療抵抗性が高いため、予後は極めて不良である。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 に高発現することとヒ素は ATL 細胞の survivin 発現レベルを低下させることを見出した。Survivin の発現は、ATL 細胞の抗癌剤耐性の一つの要因と考えられ、ATL 治療の標的分子として注目されている。今回の研究で、ヒ素が I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解を抑制することによって、NF- $\kappa$ B の核への移行を阻害し、NF- $\kappa$ B を介する survivin の転写を抑制し、ATL 細胞のアポトーシスを誘導したことは明らかにした。また、Survivin が XIAP と結合する部位（15-38aa）を標的としたオリゴペプチドは ATL 細胞株 S1T と MT2 の細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを見出した。このペプチドによる ATL 細胞のアポトーシス誘導のメカニズムを解明すれば、ATL の新しい治療法の開発に貢献できると考えている。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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、NF- $\kappa$ B、sodium arsenite

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 成人T細胞白血病（ATL）は、1976年に高月清らによって発見、命名された疾患である。レトロウイルス、腫瘍ウイルスである HTLV-1（ヒトT細胞白血病ウイルスI型）の感染により発症する腫瘍性疾患である。日本

では西日本、特に九州に HTLV-1 感染者が多く、HTLV-1 に感染している人の 0.07% が 40～60 年の潜伏期を経て成人T細胞白血病を発症する。HTLV-1 のコードする Tax は ATL 発症の初期段階に主要な病原因子である。Tax は強力な転写因子で、ウイルス遺伝子の転写を活性化させる一方、CREB、NF- $\kappa$ B および

SRFなどの細胞の遺伝子の発現も制御する。これらの転写因子が活性化され、細胞の増殖、トランスフォーメーションを促進し、悪性化を引き起こす。ATLは急性型、リンパ腫型、慢性型とくすぶり型の4種類と急性転化型の1つの病態に分けられる。慢性型とくすぶり型ATLは治療しないで、経過を観察するが、急性型とリンパ腫型ATLは通常、ビンクリスチン、アドリマイシン、エトポシドなどの抗がん剤併用療法で治療が行われる。しかしながら治療抵抗性のため、ATLの予後は極めて不良である。平均生存期間は約1年に過ぎず、新しい治療法の開発が待ち望まれている。ATLの薬剤耐性のメカニズムはP-糖蛋白質、MRP1、LRPなどの発現のほか、TaxによるNF- $\kappa$ Bの活性化も、ATL細胞のトランスフォーメーションとアポトーシス抵抗性に重要な役割を果たしている。ほとんどのATL症例の末梢血にはTaxの発現が見られないにもかかわらず、NF- $\kappa$ Bが恒常的に活性化している。

(2) NF- $\kappa$ BファミリーはRelホモロジドメインをもつNF- $\kappa$ B/Rel Proteinsとアンキリンリピートを持つI $\kappa$ B Proteinsからなる。細胞に一番多く存在するのはp65とp50のヘテロダイマーである。通常p65/p50ヘテロダイマーはI $\kappa$ B $\alpha$ と結合して不活性化状態で細胞質に局在する。HTLV-1などのウイルス感染やcarcinogen、アポトーシス誘導剤などの刺激によってIKK複合体が活性化され、p65/p50と結合するI $\kappa$ B $\alpha$ がリン酸化され、ユビキチン化され、プロテアソームにより分解される。残されたp65/p50は核に移行し、標的遺伝子の発現を誘導する。NF- $\kappa$ Bはアポトーシス抑制、細胞増殖、血管新生、免疫、炎症反応などに重要な役割を果たしている。HTLV-1のTax蛋白質は細胞質と核の両方でNF- $\kappa$ Bの活性化に寄与している。細胞内では、TaxはIKK $\gamma$ あるいはIKK $\gamma$ 上流のMEKK1、NIKと結合し、IKK複合体を活性化する。TaxはIKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ にも直接結合でき、それらの分子のキナーゼ活性を亢進させる。また直接I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$ に結合してI $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$ の分解を促進する。核内では、NF- $\kappa$ Bに結合してその2量体化を促進して転写活性を亢進する。TaxはCBP/P300、P/CAFなどのNF- $\kappa$ Bのコアクチベーターとも結合できる。このことによりNF- $\kappa$ Bとそのコアクチベーターとの結合を促すことによりNF- $\kappa$ Bの転写活性を増強する。アポトーシス抑制因子のsurvivinはNF- $\kappa$ Bの標的遺伝子の一つである。

(3) Survivinは胎児期を除くとほとんどの正常細胞で見られないが、各種の固形腫瘍や白血病細胞で高発現する。Survivinは、健康人の末梢血で検出されなかったが、ATL症例、ATL細胞株とHTLV-1をトランスフォームした細胞でsurvivin mRNAが高発現することが報告された。survivinの発現は癌の進行と予後のマーカーだが、ATLにおいてもsurvivin高発現症例の平均生存期間6.4ヶ月に対して、survivin低発現症例は18ヶ月であった。survivinはATLにおいて高発現し、予後に関わる因子であることが示唆された。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は細胞分裂の調節とアポトーシス抑制の二つの機能を持っている。細胞分裂のmetaphaseとanaphaseにおいて、survivinは主に二つのプールに局在する。一つは、直接的に中心体、metaphaseの微小管、anaphaseの紡錘体と結合し、微小管のダイナミクスを調節する。もう一つは、Aurora Bキナーゼ、INCENP、Borealinと結合しchromosomal passenger complex (CPC)を形成して、metaphase染色体のキネトコアに局在し、染色体分裂と細胞質分裂を調節する。形成されたCPCのキネトコアへの正確な局在と微小管の安定化は両極性紡錘体形成に重要である。Survivinはカスパーゼ-3、7、9と結合し、カスパーゼ-3、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ことができるが、survivinがカスパーゼ-3、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、カスパーゼ-9の活性化を阻害する。Survivinのアポトーシス抑制機構は、細胞内では直接カスパーゼ-3、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。Survivinは、癌での特異的な発現と予後に関わるため、がん治療の標的分子として注目されている。

(4) ヒ素は前骨髄性白血病 (APL) 治療に有効な薬として知られている。APL以外の白血病および固形腫瘍においては、ヒ素はbcl-2の発現を低下させ、NF- $\kappa$ Bの活性を抑制するこ

となどによって、これらの細胞のアポトーシスも誘導できる。近年、ヒ素と IFN- $\alpha$  の併用が、ATL の新しい治療法として注目されている。Hermine らは、再発 ATL と難治性 ATL にヒ素と IFN- $\alpha$  を併用する Phase II の臨床試験を行った。7 例中 1 例が完全寛解、3 例が部分寛解、そのうちの 1 例が 32 ヶ月の時点で、disease-free を維持した。この臨床試験の結果は、ヒ素が ATL の新しい治療法として有望であることを示している。

## 2. 研究の目的

我々は、38 例の ATL と 18 人の健常人の末梢血細胞を用いて real-time PCR 解析を行い、ATL、特に急性型 ATL 症例で *survivin* mRNA レベルが健常人より有意に高く、Performance status (PS) 3-4 の ATL は PS 1-2 の ATL より *survivin* の発現が高いという結果を得た。ヒ素で ATL 細胞を処理すると、*survivin* の発現レベルが低下し、アポトーシスが誘導された。

*Survivin* は ATL で高発現している。*Survivin* は XIAP などの他分子との結合することにより機能している。それらの結合を阻害すれば、*survivin* の機能を抑制でき、*survivin* の抗アポトーシス作用と分裂進行作用を抑制することができると考えられ、がん治療の標的分子として魅力的である。我々は、ATL において、ヒ素による *survivin* 発現の低下のメカニズムを調べるとともに、*survivin* を標的とした治療法の開発を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) ヒ素による *survivin* 発現レベル低下の解析。

ATL においては NF- $\kappa$ B が活性化している。*survivin* が NF- $\kappa$ B の標的遺伝子の一つで、ヒ素が Tax を抑制し、I $\kappa$ B のリン酸化を抑制することにより NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することは知られている。我々は ATL 細胞株 S1T と MT2 をヒ素で処理し、*survivin* の発現レベル変化と NF- $\kappa$ B が活性化するかを調べた。

① ヒ素で処理した MT2 と S1T 細胞の増殖を MTT Assay で調べる。

② ヒ素で処理した MT2 と S1T 細胞のアポトーシス変化を FACS で調べ、sub-G<sub>1</sub> で評価する。

③ ヒ素で処理した MT2 と S1T 細胞の *survivin* RNA と蛋白質レベルの変化を RT-PCT とイムノブロット法で調べる。

④ ヒ素で処理した MT2 と S1T 細胞を細胞質と核に分けて、NF- $\kappa$ B の p65 と p50、I $\kappa$ B- $\alpha$  の変化をイムノブロット法で調べる。

(2) *Survivin* はホモダイマーを形成して機能し、XIAP と結合することによって XIAP を安定化させ、caspase9 の活性化を抑制している。*Survivin* のダイマー形成あるいは XIAP との結合を阻害すれば、*survivin* の機能を抑制でき、*survivin* の抗アポトーシス作用と分裂進行作用を抑制することができると考えられる。ATL の新しい治療法を開発するために、我々は *survivin* のダイマー形成部位 (89-103aa) と、XIAP と結合する部位 (15-38aa) を標的としたオリゴペプチドを合成し、ATL 細胞株 S1T と MT2 をそれらのオリゴペプチドで処理し、細胞の増殖、分裂、アポトーシスに対するこれらのペプチドの影響を調べる。

① *survivin* のダイマー形成に関与するアミノ酸配列部位 (89-103aa)、XIAP と結合する *survivin* の部位 (15-38aa) の N 末端に膜透過キャリアー (TAT 蛋白質の protein transduction domains, PTD) をつけて、FITC で標識したペプチドと FITC で標識していないペプチドを作製する。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 FITC で標識した各ペプチドで ATL 細胞株 S1T と MT2 を処理し、各ペプチドが確実に細胞に入ることを共焦点顕微鏡で確かめる。

③ FITC で標識していない各ペプチドの 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 FITC で標識していない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。

## 4. 研究成果

(1) 我々は、Tax を発現する MT2 細胞と Tax を発現しない S1T 細胞の 2 つの ATL 細胞株を 2  $\mu$ M のヒ素で処理し、*survivin* の発現を低下させると、2 つの細胞ともヒ素の濃度と処理時間に依存して増殖が抑えられた。MT2 細胞では核内の p50 と p65 はヒ素の濃度と処理時間に依存して低下した。一方、細胞質の I $\kappa$ B- $\alpha$  は増加した。S1T 細胞でも核の p50 と p65 はヒ素に依存して低下した。ATL 細胞では、Tax の発現とは関係なく、ヒ素が I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解を抑制することによって、NF- $\kappa$ B の核への移行を阻害し、NF- $\kappa$ B を介する *survivin* の転写を抑制し、ATL 細胞のアポトーシスを誘導したことが示唆された。

(2) FITC で標識した 89-103aa と 15-38aa ペ

プチドとコントロールの GFP ペプチドが ATL 細胞株 S1T と MT2 の細胞質に分布することを共焦点顕微鏡で観察した。89-103aa と 15-38 aa ペプチドの濃度と処理時間に依存して S1T と MT-2 細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導された。15-38aa ペプチドの細胞毒性とアポトーシス抑制作用は 89-103 aa より強かった。以上の結果から、survivin のダイマー形成部位と、XIAP と結合する部位を標的としたオリゴペプチド、特に XIAP と結合する部位を標的としたオリゴペプチドは、ATL 細胞のアポトーシスを強く誘導し、新しい ATL 治療薬として有望であることを示した。15-38aa ペプチドの ATL 細胞のアポトーシスを誘導するメカニズムとしては、15-38aa ペプチドが survivin と XIAP の結合を阻害し、XIAP が安定化できなくなり、caspase9 が活性化するためと予想し、現在、そのメカニズムを詳細に調べているところである。

#### 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ①Che X-F, Akiyama S, Tomoda A. Suppression of the proliferation of cancer cell lines, KB-3-1 and K562 cells preceded by a decrease in intracellular pH caused by phenoxazine derivatives. *Oncol Rep.* 19: 1253-1258, 2008. (査読有)
- ②Ikeda R, Che X-F. (他 14 名 4 番目) Thymidine phosphorylase inhibits the expression of proapoptotic protein BNIP3. *Biochem Biophys Res Commun.* 370: 220-224, 2008. (査読有)
- ③Shirato K, Che X-F. (他 6 人 6 番目) Apoptosis induction preceded by mitochondrial depolarization in multiple myeloma cell line U266 by 2-aminophenoxazine-3-one. *Biol Pharm Bull.* 31: 62-67, 2008 (査読有)
- ④Zhao H-Y, Che X-F. (他 13 名 8 番目) Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in KM12C cells. *Cancer Lett.*, 270: 156-163, 2008. (査読有)
- ⑤Ikeda R, Che X-F. (他 17 名 10 番目) Hyperosmotic Stress Up-regulates the Expression of Major Vault Protein in SW620 Human Colon Cancer Cells. *Exp. Cell Res.* 314: 3017-3026, 2008. (査読有)
- ⑥Zhao H-Y, Che X-F. (他 13 名 8 番目) Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU. *Cancer Res.*, 68: 7035-7041, 2008.

(査読有)

- ⑦Tachiwada T, Che X-F. (他 11 人 3 番目) Isolation and characterization of arsenite-resistant human epidermoid carcinoma KB cells. *Oncol Rep*, 18: 721-727, 2007. (査読有)
- ⑧Owatari S, Che X-F. (他 13 人中 6 番目) . Copper-Transporting P-Type ATPase, ATP7A, Confers Multidrug Resistance and Its Expression Is Related to Resistance to SN-38 in Clinical Colon Cancer. *Cancer Res.*, 67: 4860-4868, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 車 暁芳  
survivin ペプチド(89-104 アミノ酸)による ATL 細胞のアポトーシス誘導 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日 名古屋国際会議場
2. 王 嘉  
低酸素によるヒト線維芽細胞での PGIS の高発現 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日 名古屋国際会議場
3. 田畑 祥  
チジントホスホリラーゼ発現腫瘍細胞における NF- $\kappa$ B を介した IL-8 の発現亢進機講 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日 名古屋国際会議
4. 趙 紅業  
ヒト大腸癌における 5-FU による血管新生阻害因子 TSP-1 の誘導 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日 名古屋国際会議場
5. Xiao-Fang Che  
The effect of hypoxia on gene expression in human fibroblast WI-38 cells. 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜
6. Jia Wang  
Increased expression of PGIS in two human fibroblast cell lines under hypoxic condition. 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜
7. Ryuji Ikeda  
Thymidine phosphorylase suppresses the expression of proapoptotic protein BNIP3. 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 5 日 パシフィコ横浜
8. Hong-Ye Zhao  
Induction of angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 by 5-FU in human colon cancer cells. 第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜
9. Sho Tabata  
Molecular basis for the induction of interleukin-8 by thmidine phosphorylase.

第 66 回 日本癌学会学術総会 2007 年 10 月  
3 日 パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

車 曉芳 (CHE XIAO-FANG)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10437973