

## 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5月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009-2011

課題番号 21591196

研究課題名（和文） Bcl-2 を高発現する濾胞性リンパ腫におけるオートファジーの分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of autophagy in follicular lymphoma cells.

研究代表者

吉田 明 (YOSHIDA AKIRA)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80252005

研究成果の概要（和文）：Bcl-2 を強制発現させた 697-Bcl-2 細胞に抗がん薬であるエトポシドを添加しその影響を検討したところオートファジーに特徴的な所見である LC3-II の出現や Beclin-1 蛋白の増加が認められた。オートファジーの阻害剤であるクロロキンを併用した場合は、エトポシドの細胞増殖抑制作用は増強された。同様の現象は Bcl-2 を高発現する濾胞性リンパ腫由来の細胞株でも認められた。以上より、Bcl-2 高発現細胞においてエトポシドによるオートファジーは防御的に作用することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the cell death mechanism of Bcl-2 over expressing human leukemia and lymphoma cells. We found that etoposide treatment increased Beclin-1 expression, the conversion of the soluble form of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) to the autophagic vesicle-associated form LC3-II and the occurrence of lysosomes/autophagosomes in Bcl-2 over expressing cells. The autophagy inhibitor chloroquine enhanced the cytotoxicity of etoposide in Bcl-2 over expressing lymphoma cells. These data indicate that autophagy may play an important role as protective response after etoposide treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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：Bcl-2, 濾胞性リンパ腫、オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞質成分をリソソームで分解するための主要な機構であり、本来は、細胞が、飢餓状態などのストレスに暴露され

た時の防御的な生理的反応であると考えられていた。しかし、最近では、脳腫瘍由来の細胞株に抗がん薬を加えた系などで、オートフ

アジーを伴った細胞死が誘導されることが報告されるようになった。このオートファジーを伴った細胞死は、従来のアポトーシスとは、異なった、もう一つのcell deathとして注目を集めつつある。我々はBcl-2を高発現させたB細胞性白血病細胞株(697細胞)を用いて、Bcl-2の抗アポトーシス作用を克服する薬剤を探索する研究をおこなってきた。この研究の過程で、興味深いことにBcl-2を高発現させた細胞では、抗がん薬を加えた場合にnon-apoptoticな細胞死が誘導されることを見いだした

(Yoshida A, et al. *Cancer Res.* 66(11): 5772-5780, 2006). 具体的には、caspase-3/7, 8の活性化を欠如し、DNA ladderの形成も認められなかった。形態学的にも、アポトーシスに特徴的な核の断片化は欠如していた。この細胞に抗がん薬であるエトポシドを加えた場合 p53の発現上昇は認められたが、ミトコンドリアに存在するpro-apoptotic proteinであるPuma, Noxaの発現上昇は認められずcytochrome-cの放出はなかった。したがってBcl-2高発現細胞では、ミトコンドリアをバイパスするユニークな経路で抗がん薬による細胞死が誘導されると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) Bcl-2を高発現する、濾胞性リンパ腫由来の細胞株において、抗がん薬であるエトポシド、アドリマイシンを加えた場合に、オートファジーが誘導されるかどうかについて、LC3蛋白のプロセッシング、Beclin-1蛋白発現などの、オートファジーの重要な指標となるマーカーについて検証する。電子顕微鏡を用いてオートファジーに特異的なオートリソソーム、オートファゴソームなどの形態学的な特徴について確認する。

(2) オートファジー誘導に際して重要な役割を果たす遺伝子として、ATG5、Beclin-1が知られているが、この遺伝子の発現上昇がみられるかどうかについて検討する。さらにsiRNAを用いて、これらの遺伝子をノックア

ウトした場合、抗がん薬によるオートファジー誘導が阻害されるかどうかについて検討する。

(3) オートファジーは、細胞に対して防御的に働くため、オートファジー誘導が阻害されると、細胞死は増強されると予想されるが、未だ十分には検証されていない。オートファジーが阻害された場合、抗がん薬による細胞死が増強されるかどうか検討する。また、その際の細胞死はアポトーシスなのかどうかについて検討する。

(4) 治療学的な観点からは、各種のオートファジーの阻害剤であるクロロキン、3-methyladenineを、通常の抗がん薬と併用した場合、より強力に細胞死が誘導されるかどうかについて検討する。

## 3. 方法

ヒト由来のB細胞白血病細胞株である697細胞を使用する。さらに、この細胞にレトロウイルスを用いてBcl-2を恒常的に高発現させた細胞697-Bcl-2を用いた。GFP-LC3の発現ベクターを用いて、各々の細胞にトランスフェクションする(バイオラッド社のGene Pulsarを用いる)。LC3蛋白の動態はオートファゴソーム形成の有無を判定する際に重要である。抗がん薬を加えて細胞死を誘導するが、その際にGFP-LC3がpunctate dotsを形成するかどうか蛍光顕微鏡で観察することにより、オートファゴソームの有無をしらべる。

## 4. 研究成果

(1) Bcl-2を高発現する697-Bcl-2にエトポシドを添加した後のcaspaseの活性の変化。

エトポシドを添加し、6時間、12時間、24時間、経過した時点で細胞を回収し、細胞溶解液を調整した。caspase-3、caspase-7の活性を測定した。親株である697細胞ではcaspase-3およびcaspase-7の活性の明らかな上昇を認めたが、一方、697-Bcl-2細胞では、caspase-3およびcaspase-7の活性の上昇は、まったく認められ

なかった。また、BSOとエトポシドの両者を添加して細胞溶解液を調整して、caspase-3, caspase-7の活性を測定したが、この場合も有意な上昇は認められなかった。

**(2) 697-Bcl-2細胞にエトポシドを添加したあとのLC3蛋白とBeclin-1の変化について。**

エトポシドを添加し、12時間、24時間、経過した時点で細胞を回収し、細胞溶解液を調整した。抗LC3抗体を用いてWestern blot法で検討した。その結果、24時間後よりLC3-1からLC3-2への変換が認められた。また抗LC3抗体を用いて免疫蛍光抗体法での細胞染色を実施して蛍光顕微鏡で形態を観察したところ、緑色蛍光を示すドットの増加が認められた。またBeclin-1蛋白についてもWestern blotを用いて検討したところ12時間、18時間と時間依存性に蛋白の増加が認められた。

**(3) クロクロキンは697-Bcl-2細胞においてエトポシドの細胞増殖抑制作用を増強する。**オートファジーの阻害剤として知られているクロクロキシン(5 uM)をエトポシドと併用したところ細胞増殖抑制作用を明らかに増強した。

5. 主な発表論文等 (計 4 件)

1. Yoshida A, Zokumasu K, Wano Y, Yamauchi T, Imamura S, Takagi K, Kishi S, Urasaki Y, Tohyama K, Ueda T. Marked upregulation of Survivin and Aurora-B kinase are associated with disease progression in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 査読有 2012 Mar 14. doi:10.3324/haematol.2011.055681 [Epub ahead of print].
2. Yamauchi, T., Yoshida, A., Ueda T: Camptothecin induces DNA strand breaks and is cytotoxic in stimulated normal lymphocytes.. *Oncol Rep*, 査読有 25, 347-352, 2011.02,
3. Hosono, N., Kishi, S., Iho, S., Urasaki, Y., Yoshida, A., Kurooka, H., Yokota, Y., Ueda, T: Glutathione S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual

mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line. *Cancer Sci.*, 査読有 101 (3) , 767-773, 2010.03,

4. Yamauchi T, Negoro E, Kishi S, Takagi K, Yoshida A, Urasaki Y, Iwasaki H, Ueda T. Intracellular cytarabine triphosphate production correlates to deoxycytidine kinase/cytosolic 5'-nucleotidase II expression ratio in primary acute myeloid leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 査読有 77(12):1780-6. 2009

[学会発表] (計 6 件)

1. Yoshida, A, Zokumasu,k., Ueda T : The indolocarbazole derivative Go6976 suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations. American Association for Cancer Research Annual meeting 2012, Chicago Illinois, USA, 2012, 0402.
2. Yoshida,A. Zokumasu K., Yamauchi,T., Takagi,K., Kishi, S., Urasaki,Y., Tohyama,K., Ueda T.: Marked Upregulations of Survivin and Aurora-B Kinase Are Associated with Disease Progression in the Myelodysplastic Syndromes. 53rd American Society of Hematology Annual meeting, San Diego CA, USA, 2011,1212.
3. Yoshida,A.: Marked upregulation of Survivin and Aurora-B kinase are associated with disease progression in the Myelodysplastic Syndromes. The 2nd Japanese Society of Hematology International Symposium 2011.長崎, 2011, 0423.
4. Yoshida A, Zokumasu K, Ueda T. The indolocarbazole, Go6976, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋. 2011, 1004.
5. Yoshida A, Ueda T. Potent cytotoxic activity of Go6976 in FLT3-driven leukemic cells. 第72回日本血液学会学術集会、横浜. 2010, 0910.
6. 吉田明, 田中沙季, 山内高弘, 高木和貴, 岸慎治, 浦崎芳正, 通山薫, 上田孝典. ハイ

リスク MDS では Survivin の著明な高発現が  
検出される. 第 71 回日本血液学会学術集会.  
京都. 2009, 1012.

〔図書〕 (計 2 件)

1. 吉田 明, 上田孝典. 2. 造血器腫瘍の治  
療. 総論 A 化学療法剤. 木崎昌弘 (編),  
白血病・リンパ腫・骨髄腫-今日の診断と治  
療. 第 4 版, 東京. 中外医学社 2011.  
p. 15-30

2. 吉田 明, 上田孝典. 分子標的治療 5.  
ボルテゾミブ. 西條長宏、西尾和人(編), が  
ん化学療法・分子標的治療 update. 東京.  
中外医学社 2009. 167-171

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 明 (YOSHIDA AKIRA)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 80252005

研究の全てを担当した