

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4月10日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591357

研究課題名（和文）分子標的療法を目指した難治性白血病における ROS による癌形質獲得の分子基盤の確立

研究課題名（英文）Establishment of basic molecular mechanism of carcinogenesis by ROS in malignant leukemia in aim of molecular targeting therapy

研究代表者

塩原 正明（SHIOHARA MASAOKI）

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00293514

研究成果の概要（和文）：NADPH oxidase (Nox)依存性に産生される活性酸素種(ROS)が急性リンパ性白血病(ALL)におけるがん形質発現に関与するメカニズムについて解析を行った。一部の ALL 細胞に発現する Nox5 が産生する ROS は白血病細胞の増殖やアポトーシス抑制に関与していることが示され、治療の際の分子標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the mechanism of carcinogenesis mediated by Nox-generating ROS in acute lymphoblastic leukemia. ROS generated by Nox5 expressed in part of ALL cells were related to the growth and inhibition of apoptosis of tumor cells. It was shown that Nox5 can be a molecular target of the therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ性白血病(ALL)は小児期の悪性腫瘍の中で最も頻度の高い疾患である。小児 ALL の治療成績は多施設共同研究によるリスク別層別化による治療方法の改良、支持療法の進歩で目覚ましい進歩をとげた。さらに一部の小児 ALL では遺伝子レベルでの原因が明らかになりつつあり、治療への応用が期待される。一方、ハイリスク症例や再発 ALL 症例は治療抵抗性かつ難治性で、それらの予後は造血幹細胞移植をもってしても極めて

不良であり、今までの化学療法剤による total cell killing の概念に基づいた治療には限界があると言わざるを得ない状況にある。このような事実を踏まえた上で、いままで着目されなかった小児 ALL の新たな癌形質の発現機序に基づいた新規治療法の開発が緊急の課題である。

2. 研究の目的

スーパーオキシド (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2) 等の活性酸素 (reactive oxygen

species, ROS)は細胞内ミトコンドリア、ペルオキシソーム、NADPH oxidase (Nox)ファミリーや電離放射線などから産生され、酸化ストレスや細胞障害に関与する。一部の癌細胞にも発現がみられるが、その分子腫瘍学的役割として、癌細胞から産生されるROSは遺伝子にストレスを与えることでDNAに不安定性をもたらし、ひいては癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の不活性化をもたらすと考えられてきた。しかし近年のROS研究から注目すべきことは、Noxファミリーが産生するROSに依存したシグナルが、細胞増殖・形態等の生理的シグナル伝達を直接攪乱することにより、癌細胞への形質転換、癌細胞の増殖能や運動能など癌形質の獲得に深く関わっていることが明らかになりつつあることである (Cancer Res 64:3580, 2004, J Biol Chem 282:17640, 2007)。我々は好中球における酸素非依存性殺菌タンパクとともに Nox2 による自然免疫機構に注目してきた。その中で好中球以外の末梢血細胞における Nox ファミリー分子発現を解析中に、血液中の CD34 陽性細胞やリンパ節における T および B 細胞に Nox 分子の発現がみられること、さらに Nox5 を高発現する複数の ALL 細胞株および再発小児 ALL 患者検体を見出した。これらの細胞が実際 ROS を産生すること、また活性酸素阻害剤の添加による Nox5 高発現 ALL 細胞株の顕著な増殖抑制効果を確認済みである。このことを踏まえた上で、本研究では小児 ALL の細胞生物学的特性における Nox ファミリー分子の関与を分子生物学的に明らかにするとともに、Nox に依存した ROS によるシグナルを制御コントロールすることによる難治性小児 ALL に対する新たな分子標的療法を開発するための基礎的根拠を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)小児 ALL サンプルおよび ALL 細胞株における Nox 遺伝子およびタンパクの発現解析：7種類の Nox 遺伝子の発現を RT-PCR により、東京小児がん研究グループより供与された 100 サンプル (初発および再発時) および 15 種類の細胞株につき RT-PCR 法を用いて解析した。特に Nox 5 に着目した。

(2)siRNA 発現細胞株の樹立：Nox5 の発現が確認された細胞株につき siRNA および scrambled siRNA 発現レトロウイルスベクターを作製した。Nox5 発現細胞株にレトロウイルスを感染させ puromycin に対する薬剤感受性をもとに siRNA 発現細胞のクローニングを

行った (J Biol Chem 281: 20368, 2006)。樹立した複数の細胞株における Nox5 発現低下を real-time RT-PCR およびウエスタン解析により確認した (control として用いる scrambled siRNA 導入株では発現低下はみられない)。さらに ROS 産生低下をフローサイトメトリーで確認した (Cancer Res 64:3580, 2004)。

(3)siRNA 発現細胞株を用いた癌形質にかかわる細胞特性の比較：(2)で樹立した細胞株 (親株、Nox5 発現低下株、コントロール) を用いて解析した。増殖能は液体培養で経時的に MT Assay を行った。アポトーシスに関しては doxorubicin 添加および serum starvation により annexin V/7-AAD の発現をフローサイトメトリーで比較検討した。

(4)細胞増殖および cell survival に関するシグナル伝達経路の解析：Nox5 siRNA およびコントロール siRNA を導入した MT2 細胞株を 10% FCS 存在下で 48 時間培養し、p38MAP kinase, Akt, ERK のリン酸化をウエスタン解析により比較検討した。

(5)融合遺伝子の導入による Nox5 発現解析 (1)で Nox5 発現と相関が明らかになった転座型遺伝子変異 (融合遺伝子、BCR-ABL) を HEK293 細胞に遺伝子導入することにより Nox5 の発現誘導が観察できるか real-time PCR で検討した。

(6)免疫不全マウスにおける腫瘍造成能の比較検討：Nox5 siRNA およびコントロール siRNA を導入した MT2 細胞株をそれぞれ免疫不全マウスに移植し、造腫瘍能を比較検討した。

4. 研究成果

(1)小児 ALL 臨牀検体のうち 20% に Nox5 の高発現がみられた。また細胞株では複数の細胞で Nox5 の発現がみられたが、特に HTLV-1 感染細胞である MT1 および MT2 細胞に Nox5 の高発現を認めた。それぞれの細胞株に抗酸化剤である DPI, NAC および PDTC 添加により 10% FCS 存在下液体培養をしたところ、非添加の細胞に比し細胞増殖の抑制を認めた。以下の実験では MT1 または MT2 細胞を用いた。

(2)Nox5 siRNA および scrambled siRNA 発現レトロウイルスを感染させて、親株に比し Nox5 発現低下した MT1 siRNA, MT2 siRNA および発現の変化がない MT1 control, MT2 control を樹立した。フローサイトメーターで MT1 siRNA, および MT2 siRNA における ROS 発現低下を確認した。

(3) MTT assay による増殖能の比較では MT1 siRNA および MT2 siRNA はそれぞれのコントロールに比し約 40%の増殖能低下を認めた。フローサイトメーターによる adriamycin 添加での apoptosis 誘導の解析では、MT1 siRNA および MT1 control での Annexin(+)7-AAD(-) 細胞分画は adriamycin 添加前ではそれぞれ 18%, 29%だったが adriamycin 添加後でそれぞれ 30%, 48%に増加した。抗酸化剤 PDTC 添加による cleaved PARP 生成をウエスタン解析したところ MT1 および MT2 control に比し MT1 および MT2 siRNA で PDTC 添加前に比べ PDTC 添加後に明らかな cleaved PARP の増加を認めた。

(4) MT2 siRNA 細胞株は MT2 control コントロールに比し、培養 48 時間後のリン酸化 Akt および ERK の減少すなわち活性化の抑制が明らかになった (図 1)。P38MAP kinase のリン酸化には変化はみられなかった。

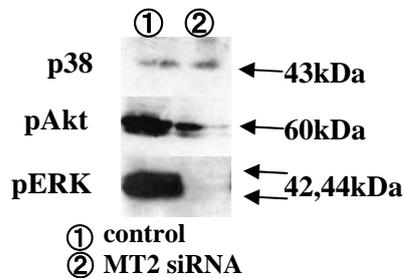


図 1 リン酸化 Akt、ERK のウエスタン解析

(5) (1)においてBCR-ABL陽性細胞株においてNox5発現がみられた。BCR/ABLによるNox5発現の誘導を検討するためにHEK293細胞にBCR-ABL発現ベクターを導入したところNox5発現が誘導された。さらにHEK293細胞へのBCR-ABL発現ベクター導入時にJAK inhibitorやSTI571を添加するとNox5誘導の抑制が観察された。またSTAT5B siRNAを添加してBCR-ABL発現ベクターをtransfectしたところNox5発現誘導は抑制された。これらのことからNox5はBCR-ABLにより誘導され、そのシグナル伝達経路としてJAK/STAT5B経路が関与していることが示唆された。

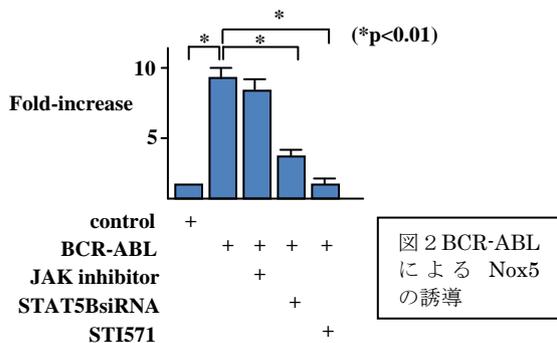


図 2 BCR-ABL による Nox5 の誘導

(6) 免疫不全マウスへの移植実験では、コントロールに比し Nox5 siRNA 導入した細胞での造腫瘍速度およびサイズの減少がみられた。

以上の結果から一部の ALL 細胞に発現する Nox5 が産生する ROS は白血病細胞の増殖やアポトーシス抑制に関与していることが示唆された (図 3)。

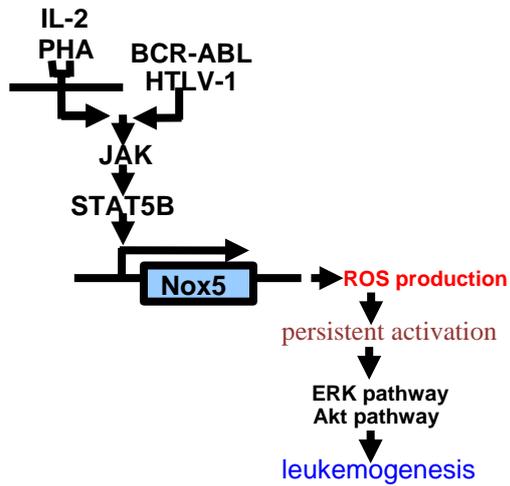


図 3 Nox5 発現にかかわるシグナル伝達経路

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 19 件)

①. Hirabayashi K, Shiohara M, Suzuki T, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Tsuruta G, Fukuyama T, Hidaka Y, Nakazawa Y, Shimizu T, Sakashita K, Koike K. Critical illness polyneuropathy and myopathy caused by Bacillus Cereus sepsis in acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 34; e110-113, 2012.

査読：有

DOI:10.1097/MPH.0b013e318234620b

②. Shiohara J, Takata M, Shiohara M, Ito T, Ishida F. Hyperacute graft-versus-host disease: histological assessment of skin biopsy specimens from 19 cases. Clin Exp Dermatol (in press 2012). 査読：有
DOI:10.1111/j.1365-2230.2011.04261.x.
[Epub ahead of print]

③. 塩原正明：好中球二次顆粒欠損症。溝口秀昭、齋藤英彦、吉田弥太郎、小澤敬也 (編) 標本に学ぶ血液疾患症例 医薬ジャー

ナル、東京、pp148-153, 2012. 査読：無
<http://www.iyaku-j.com/>

④. 草刈麻衣、塩原正明、齋藤章治、田中美幸、柳沢龍、坂下一夫、加藤忠明、藤本純一郎、小池健一 小児慢性特定疾患治療研究事業における「血小板の異常をきたす疾患」の登録状況 日小血会誌 25:74-80, 2011 査読：有

⑤. 新倉冬子、徳田安孝、小金平容子、中澤功、塩原正明、奥山隆平 先天性線状黄色腫の一例 皮膚病診療 33:945-948, 2011 査読：有

⑥. Saito S, Matsuda K, Taira C, Sano K, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, Koike K. Genetic analysis of TP53 in childhood myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. Leuk Res 35:1578-84, 2011. 査読：有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2011.06.027>,

⑦. Yanagisawa R, Katsuyama Y, Shigemura T, Saito S, Tanaka M, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, Koike K. Engraftment syndrome, but not acute GVHD, younger age, CYP3A5 or MDR1 polymorphisms, increases tacrolimus clearance in pediatric hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 46:90-97, 2011. 査読：有
DOI:10.1038/bmt.2010.64

⑧. Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. Am J Med Genet 158(A): 412-416, 2011. 査読：有
DOI: 10.1002/ajmg.a.34395. Epub 2011 Dec 2.

⑨. Hirabayashi K, Shiohara M, Takahashi D, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Nakamura T, Ishii E, Koike K. Retrospective analysis of risk factors for development of liver dysfunction in transient leukemia of Down syndrome. Luek Lymphoma 52: 1523-1527, 2011. 査読：有
DOI:10.3109/10428194.2011.573888

⑩. Suzuki M, Paesschen WV, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, Jonghe PD, Li Yuehong, Sekine T, Igarashi T, Fujimoto I, Mikoshiba K, Shimadzu M, Shiohara M, Braverman N, Al-Gazal L, Fujita T, Seki G. Defective membrane expression of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. Proc Natl Acad Sci USA 107: 15963-15968, 2010. 査読：有
DOI: 10.1073/pnas.1008705107

⑪. Yanagisawa R, Matsuda K, Sakashita K, Nakazawa Y, Tanaka M, Saito S, Yoshikawa K, Kamijo T, Shiohara M, Koike K. Disappearance of minimal residual disease after the early withdrawal of immunosuppressants in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia. Pediatr Blood Cancer 56: 501-502, 2010. 査読：有
DOI: 10.1002/pbc.22849

⑫. Motoki N, Shimizu T, Akazawa Y, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Motoki H, Nakazawa Y, Sakashita K, Iwasaki Y, Shiohara M, Koike K. Increased pretransplant QT dispersion as a risk factor for the development of cardiac complications during and after preparative conditioning for pediatric hematopoietic stem cell transplantation. Pediatr Transplant 14: 986-992, 2010. 査読：有
DOI: 10.1111/j.1399-3046.2010.01389.x. Epub 2010 Sep 7.

⑬. Nakajima K; Takeoka, M; Mori M; Sakurai A; Nose H; Higuchi K; Itano N; Shiohara M; Taniguchi S. Exercise effects on methylation of ASC gene Int J Sports Med 31: 1-5, 2010. 査読：有
DOI: 10.1055/s-0029-1246140

⑭. Shigemura T, Shiohara M, Tanaka M., Takeuchi K., Koike K. Effect of the mutant microphthalmia-associated transcription factor found in Tietz syndrome on the in vitro development of mast cells. J Pediatr Hematol Oncol 32: 442-447, 2010. 査読：有
DOI:10.1097/MPH.0b013e3181d9da5d

⑮. Hirabayashi K, Shiohara M, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Tsuruta G, Fukuyama T, Hidaka Y, Nakazawa Y, Shimizu T, Sakashita K, Koike K.

Polymyxin-directed hemoperfusion for sepsis-induced multiple organ failure. *Pediatr Blood Cancer* 55; 202-205, 2010. 査読：有

DOI: 10.1002/psc.22447

⑯. Matsuda K, Taira C, Sakashita K, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Shiohara M, Fukushima K, Oda M, Honda T, Nakahata T, Koike K. Long-term survival after non-intensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with CBL mutations, and the possible presence of healthy persons with the mutations. *Blood* 115; 5429-5431, 2010. 査読：有

<http://intl.bloodjournal.org>

⑰. Tsuchida M, Ohara A, Manabe A, Kumagai M, Shimada H, Kikuchi A, Mori T, Saito M, Akiyama M, Fukushima T, Koike K, Shiohara M, Ogawa C, Kanazawa T, Noguchi Y, Oota S, Okimoto Y, Yabe H, Kajiwara M, Tomizawa D, Ko K, Sugita K, Kaneko T, Maeda M, Inukai T, Goto H, Takahashi H, Isoyama K, Hayashi Y, Hosoya R, Hanada R; Tokyo Children's Cancer Study Group. Long-term results of Tokyo Children's Cancer Study Group trials for childhood acute lymphoblastic leukemia, 1984-1999. *Leukemia* 24; 383-96, 2010. 査読：有

DOI:10.1038/leu.2009.260

⑱. Narumi Y, Kosho T, Tsuruta G, Shiohara M, Shimazaki E, Mori T, Shimizu A, Igawa Y, Nishizawa S, Takagi K, Kawamura R, Wakui K, Fukushima Y. Genital abnormalities in Pallister-Hall syndrome: Report of two patients and review of the literature. *Am J Med Genet* 152A: 3143-3147, 2010. 査読：有

DOI: 10.1002/ajmg.a.33720

⑲. Matsuda K, Sakashita K, Taira C, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Shiohara M, Kanegane H, Hasegawa D, Kawasaki K, Endo M, Yajima S, Sasaki S, Kato K, Koike K, Kikuchi A, Ogawa A,

Watanabe A, Sotomatsu M, Nonoyama S, Koike K. Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 141; 567-575, 2009. 査読：有

DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07968.x

[学会発表] (計3件)

①Shigemura T, Shiohara M, Fujii M, Tanaka Y, Furuta S, Kamata T. A critical mediating role of the superoxide-generating oxidase Nox5 in maintenance of HTLV-1 transformation phenotype. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋

②Shiohara M, Fujii M, Nakamura M, Mori N, Furuta S, Kamata T. A novel mediating role of ROS-generating Nox5 in growth and survival of HTLV-1-infected cells 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日 大阪

③Shigemura T, Shiohara M, Zhang Y, Kato M, Mori N, Fujii M, Tanaka Y, Kike K, Kamata T. A novel mediating role of ROS-generating Nox5 in growth and survival of HTLV-1-infected T-cells. 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月23日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩原 正明 (SHIOHARA MASAOKI)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00293514

(2) 研究分担者

樋口 司 (HIGUCHI TSUKASA)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：80397306

坂下 一夫 (SAKASHITA KAZUO)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10345746