

論文内容の要旨

YM155 suppresses cell proliferation and induces cell death in human adult T-cell leukemia/lymphoma cells

(成人 T 細胞白血病細胞において YM155 は細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導する)

(佐々木了政, 伊藤薫樹, 旭真来, 石田陽治)

(Leukemia Research 39 巻, 12 号 平成 27 年 12 月掲載)

I. 研究目的

成人 T 細胞白血病 [Adult T-cell leukemia (ATL)] はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 [Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I)] の感染による末梢性 T 細胞腫瘍である。ATL の急性型やリンパ腫型は、既存の治療に抵抗性であり、生存期間中央値は 13 カ月と極めて予後不良である。そのため、新規治療薬の開発が急務である。

近年、ATL 細胞株での細胞内シグナル分子の発現についての報告がされている。サバイピンは悪性腫瘍の進行や悪性腫瘍の薬剤耐性において重要な役割を果たしている。サバイピンは ATL を含む悪性腫瘍で発現しており、潜在的な治療標的とされている。

YM155 はサバイピン活性化を抑制する新規の分子標的治療薬である。マウスを使用した ATL モデルに対して YM155 単独または YM155 に抗 CD52 モノクローナル抗体を併用することにより生存期間の延長および治療効果を上げている。しかし ATL における YM155 の細胞障害メカニズムについては不明である。本研究では ATL 細胞株における YM155 の細胞障害メカニズムを解析することを目的とした。

II. 研究対象ならび方法

対象は、ATL 細胞株である S1T と MT-1 および HTLV-1 感染細胞株である MT-2 を使用した。細胞は RPMI 1640 medium + 10%ウシ胎児血清で培養した。

YM155 を濃度別に添加し、各細胞株を 24 時間と 48 時間培養し、MTT アッセイにより増殖抑制効果を検討した。次に、YM155 の存在・非存在下で各細胞株を 24 時間と 48 時間培養後、annexin V/propidium iodide (PI) 染色後に annexin V 陽性/PI 陽性細胞および annexin V 陽性/PI 陰性細胞の割合をフローサイトメトリ法で解析し、細胞死誘導効果を検討した。

さらに YM155 存在・非存在下で 24 時間培養した各細胞株を溶解して SDS-PAGE を行い、メンブレンに転写後、各種抗体を用いて Western blotting を行った。YM155 によりサバイピン mRNA が抑制されていることを確認するために各細胞株内のサバイピン mRNA を RT-PCR を行い定量した。

STAT3 が MT-2 細胞株において増殖や生存に関与していることを確認するために、STAT3 阻害薬 (S3I-201) を YM155 とともに細胞株に添加し細胞増殖抑制効果を検討した。統計学的解析では Wilcoxon test を用いた。カスパーゼ依存性のアポトーシスを検証するためにカスパーゼ 3 阻害薬を YM155 処理時に加え、MTT およびアポトーシスアッセイを行った。

III. 研究結果

1. YM155 はコントロールと比較し、濃度・時間依存性に S1T, MT-1, MT-2 の増殖を抑制した。IC₅₀ は YM155 50nM であった。
2. YM155 はコントロールと比較し、S1T, MT-1, MT-2 においてアポトーシスを誘導した。
S1T 細胞株 (annexin V 陽性: 10.3±2.9% vs. 4.5±2.2%, p<0.05)
MT-1 細胞株 (annexin V 陽性: 18.7±8.1% vs. 5.1±0.6%, p<0.05)
MT-2 細胞株 (annexin V 陽性: 7.7±0.7% vs. 7.9±0.9%, p=0.74)
S1T, MT-1 ではサンプル群で有意にアポトーシス誘導効果を認めた。
MT-2 では有意差をみとめなかった。
3. RT-PCR の結果: YM155 を添加したいずれの細胞株においてもサバイビンの転写抑制を認めた。培養 12 時間後・24 時間後それぞれで転写抑制を認めた。
4. ウェスタンブロットの結果: YM155 を添加し培養した細胞株ではいずれの細胞株においてもサバイビンの発現抑制を認めた。S1T においては YM155 を添加すると Mc1-1 発現の抑制を認めた。しかしながら YM155 は XIAP, cIAP-1/2, and Bcl-2 といったタンパク質の発現には影響しなかった。YM155 は S1T, MT-1 においてカスパーゼの活性化や PARP の発現を増加したが、MT-2 では認められなかった。
MT-2 の YM155 耐性機序を解析するために S1T, MT-1, MT-2 における各分子のリン酸化状態をウェスタンブロットで確認した。STAT3, STAT5, AKT の恒常的なリン酸化を MT-2 において認めたが、S1T, MT-1 においては認めなかった。STAT3 阻害薬である S3I-201 を YM155 とともに MT-2 に投与し 24 時間後に MTT アッセイを行った。YM155 と S3I-201 を投与した群は YM155 単独群に比べ約 55% の細胞増殖抑制効果を認めた。
5. Tax 蛋白の発現は MT-2 細胞株に認められたが、S1T および MT-1 細胞には認められなかった。
6. YM155 により誘導されたアポトーシスと細胞増殖抑制は、カスパーゼ 3 阻害薬により阻害された。
7. MT-2 細胞を YM155 と S3I-201 で 48 時間処理すると、アポトーシスが明らかに増加した。
8. MT-2 細胞を S3I-201 で処理すると、Mc1-1 蛋白の発現が低下し、カスパーゼ 3 や PARP も活性化された。

IV. 結 語

YM155 は ATL 細胞株においてサバイビンの発現を抑制することでアポトーシスを誘導する。STAT3 のリン酸化を有する細胞株においては YM155 に抵抗性を示すことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 増田 友之(病理学講座機能病態学分野)

副査 講師 西塚 哲(外科学講座)

副査 教授 佐藤 孝(病理学講座機能病態学分野)

成人性 T 細胞性白血病は既存の治療に抵抗性であり，新規治療薬の開発が望まれる．本研究論文はサバイビン活性化を抑制する治療薬 YM155 の細胞障害機序を解析する事を目的として，ATL 細胞株および HTLV-1 感染細胞株に YM155 を添加・培養した細胞の経時的变化およびアポトーシス関連蛋白を解析した意欲的な研究である．YM155 添加によりサバイビンタンパク質の発現が抑制され，アポトーシス経路で細胞死が誘導されることを明らかにした．更に YM155 抵抗性の細胞株は STAT3 の恒常的リン酸化により治療抵抗性を示し，STAT3 阻害薬併用により治療抵抗性が解除されることを明らかにした．

これら知見は ATL 細胞の STAT3 リン酸化状態を検索することにより，治療薬の選択に示唆を与える可能性を示した研究と言える．学位に値する論文である．

試験・試問の結果の要旨

細胞培養の条件、実験の行程について試問し，適切な解答を得た．学位に値する学識を有していると考ええる．

参考論文

- 1) Resveratrol suppresses cell proliferation via inhibition of STAT3 phosphorylation and Mcl-1 and cIAP-2 expression in HTLV-1-infected T cells (ヒトリンパ球向性白血病ウイルス 1 に感染した T リンパ球においてレスベラトロールは STAT3 リン酸化と Mcl-1 および cIAP-2 の発現抑制により細胞増殖を抑制する) (筆頭著者 Yuzo Suzuki, 他 4 人と共著)
Leukemia Research 37 号, 1674-1679 2013 年 9 月掲載
- 2) Dose-adjustment of lenalidomide according to patient age and vulnerability is feasible in relapsed or refractory multiple myeloma: retrospective analysis of 20 cases (患者年齢や脆弱性に応じたレナリドマイドの用量調整は，再発または難治性の多発性骨髄腫で忍容性がある：20 例の後方視的解析) (筆頭著者 Shigeki Ito, 他 10 人と共著)
Open Journal of Hematology 5-9 2014 年 10 月掲載