

論文内容の要旨

Resveratrol suppresses cell proliferation via inhibition of STAT3 phosphorylation and MCL-1 and IAP-2 expression in HTLV- I -infected T cells

(Resveratrol は STAT3 のリン酸化抑制と Mcl-1, cIAP-2 の発現低下を介して HTLV- I 感染 T 細胞の増殖を抑制する)

(鈴木雄造, 伊藤薫樹, 石田陽治)

(Leukemia Research (投稿審査中))

I. 研究目的

成人 T 細胞性白血病 [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 細胞性腫瘍である。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。Resveratrol (Res) はポリフェノール的一种で、抗腫瘍活性を有することが報告されている。また、Res は NF- κ B, STAT3, survivin 等の細胞内シグナル分子や抗アポトーシス分子を抑制することが知られている。HTLV- I 感染細胞において、Res が survivin 阻害を介してアポトーシスを誘導することが報告されているが、Res の HTLV- I 感染細胞のシグナル分子への影響については不明である。

本研究では、HTLV- I 感染細胞株である MT-2 細胞に対する Res の抗腫瘍効果とその細胞内メカニズムを検討した。

II. 研究対象ならび方法

対象は、HTLV- I 感染細胞株である MT-2 細胞を使用した。細胞は RPMI 1640 medium + 10% ウシ胎児血清で培養した。まず、Res を濃度別に添加し、MT-2 細胞を 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、Res の存在・非存在下で MT-2 細胞を 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。Res 存在・非存在下で 24 時間培養した MT-2 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。STAT3 が MT-2 細胞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) を用いて細胞増殖抑制効果および細胞死誘導効果を上記と同様の方法で、また、活性化 Caspase-3 測定をフローサイトメトリ法で検討した。統計学的解析では t 検定を用いた。

III. 研究結果

1. Res はコントロールと比較し、濃度・時間依存性に MT-2 細胞株の増殖を抑制しアポトーシスを誘導した。(annexin V 陽性/PI 陰性細胞: $19.2 \pm 4.0\%$ vs. $4.1 \pm 1.5\%$, $p < 0.01$, annexin V 陽性/PI 陽性細胞: $23.9 \pm 8.6\%$ vs. $3.1 \pm 1.4\%$, $p < 0.01$)

2. Resveratrol 処理により, MT-2 細胞の
 - 1) STAT3 のチロシンおよびセリンの恒常的リン酸化が抑制された.
 - 2) STAT5 のチロシンの恒常的リン酸化の抑制効果は軽度であった.
 - 3) 抗アポトーシス分子の cIAP-2 と Mc1-1 の発現低下が誘導された.
 - 4) Caspase-3 および PARP の活性化が誘導された.
3. STAT3 阻害薬はコントロールと比較し, 濃度依存性に MT-2 細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導した. [annexin V 陽性細胞 (48 時間後) :49.1±1.8% vs. 7.5±0.8%, p<0.01]
4. STAT3 阻害薬処理により, MT-2 細胞の
 - 1) STAT3 のチロシンの恒常的リン酸化が抑制された.
 - 2) Caspase-3 の活性化が認められた. (S3I-201 26.2±3.2% vs. control 8.0±2.1%, p<0.01)

IV. 結 語

Res は MT-2 細胞において, 抗アポトーシス分子の cIAP-2, Mc1-1 の発現低下を誘導したが, これらの抗アポトーシス分子の一部は STAT3 により制御されることが知られており, 少なくとも STAT3 の活性化の抑制を介して, 増殖抑制やアポトーシスを誘導すると考えられた. STAT3 阻害薬処理により MT-2 細胞の増殖が抑制され, アポトーシスが誘導されたことから, STAT3 は MT-2 細胞の標的分子の 1 つであることが確認された. Res は, STAT3 阻害薬と比べて, MT-2 細胞に対する増殖抑制効果が強く, Res には STAT3 の活性化抑制以外の他の機序の関与も示唆された.

MT-2 細胞株の増殖や生存は STAT3 に依存しており, Res は STAT3 のチロシンおよびセリンのリン酸化の抑制と, Mc1-1, cIAP-2 の発現低下を介して, カスパーゼ依存性にアポトーシスを誘導すると考えられた.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 前沢 千早 (腫瘍生物学研究部門)

副査 准教授 遠藤 幹也 (小児科学講座)

副査 教授 平 英一 (薬理学講座：情報伝達医学分野)

成人 T 細胞性白血病 [Adult T-cell leukemia (ATL)] の急性型およびリンパ腫型は、既存の治療に抵抗性を示し、新規治療薬の開発が急務である。ポリフェノールの一種であるレスベラトロールは、ATL の原因ウイルスである HTLV-I 感染細胞において、survivin 阻害を介して増殖抑制効果を誘導することが報告されているが、レスベラトロール投与で影響を受けるシグナル伝達経路の詳細は不明である。本研究は、HTLV-I 感染細胞株である MT-2 細胞に対するレスベラトロールの抗腫瘍効果とアポトーシス誘導に至る分子経路の検証を行った論文である。

レスベラトロール処理によって MT-2 細胞に誘導された時間・濃度依存性アポトーシスは、STAT3 の恒常的リン酸化の抑制に起因して生じた抗アポトーシス分子 cIAP-2 および Mc1-1 の発現低下が原因となっている可能性が示された。一方、レスベラトロール処理は STAT3 阻害薬に比較してアポトーシスの誘導効果が強く、レスベラトロールの抗腫瘍効果に STAT3 の恒常的活性化抑制機構以外の別経路での作用も期待された。

本研究は、ATL 細胞の新規治療薬としてのレスベラトロールの有用性に関して、STAT3 の活性化抑制に基づく、アポトーシス誘導機構を明らかにした初めての論文であり、学位に値する。

試験・試問の結果の要旨

ATL の病態、治療、レスベラトロールで誘導される細胞死の機構について試問を行い、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られる。

参考論文

- 1) 家族制レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)欠損症 (伊藤薫樹 他 1 名と共著)
血液症候群 I (2 版), 別冊 21 号 (2013)
- 2) 悪性リンパ腫 (伊藤薫樹と共著)
がんと歯科治療, 1 巻, 1 号 (2013)