

学 位 論 文 題 名

Possible Roles of an Adult T-Cell Leukemia
(ATL)-Derived Factor/Thioredoxin in the
Drug Resistance of ATL to Adriamycin

(成人T細胞性白血病由来因子／チオレドキシンの成人T細胞性
白血病のアドリアマイシン耐性における役割)

学位論文内容の要旨

I. 背景と目的

成人 T 細胞性白血病 adult T-cell leukemia(ATL)は癌化学療法剤 (抗癌剤) に感受性が低く、また、薬剤耐性を獲得しやすいために、治療成績が極端に悪い白血病とされる。ATL 症例の生存期間の中央値は 8 ヶ月であり、長期生存率は約 10% すぎないと報告されている。ATL 由来因子 ATL-derived factor(ADF)は、当初 interleukin-2 receptor- α の発現を誘導する因子として同定された。その後これが抗酸化酵素チオレドキシンのヒトホモログであることが明らかになり、活性酸素スカベンジャーとして働きうることが想定されている。抗癌剤 adriamycin(ADM)は ATL の治療に中心的に用いられる薬剤であり、その作用機序の一つとして活性酸素による DNA 損傷が関与すると考えられている。従って、ATL 細胞に大量に誘導される ADF が ADM 耐性に直接関与している可能性が考えらる。そこで、ATL 細胞の ADM 耐性における ADF の役割を明らかにするために、ATL 細胞の ADF 蛋白量と ADM 耐性の程度との相関関係を検討すると共に、ADF 蛋白量を人為的に減少させることによって ADM 耐性が克服されるか否かを検討した。

II. 材料と方法

- 1) 白血病細胞株：ATL 細胞として ATL-2、SALT-3、ED-S の 3 株、T 細胞性白血病細胞として Jurkat、MOLT-3 の 2 株および前骨髄性白血病 HL-60 の 1 株とその ADM 耐性株 HL-60/ADM を用いた。
- 2) MTT 法による薬剤感受性の測定：96 穴プレートにて各細胞株を階段希釈した抗癌剤を含む培地にて 48 時間培養後、MTT 試薬を加えてさらに 4 時間培養し、HCl 添加イソプロパノールを加えて細胞を完全に溶解した。マイクロプレートリーダーにて OD 値を測定し、50% の細胞を殺す薬剤濃度 (IC_{50}) を算定した。
- 3) ADM 耐性株の樹立株：ATL 細胞株 ATL-2、SALT-3、ED-S をそれぞれ ADM 存在下にて培養し、増殖してくる細胞をさらに ADM の濃度を上げた培地で培養することを繰り返し耐性株を樹立した。樹立した耐性株をそれぞれ ATL-2/ADM、SALT-3/ADM、ED-S/ADM と名付けた。
- 4) Western blot：各株細胞の cell lysate を SDS-PAGE にて泳動後、PVDF メンブレンにブロットし、抗 ADF 抗体、抗 GSH-Px 抗体を用いて検出した。
- 5) FACS による P-glycoprotein 発現の検討：それぞれの細胞を 1 次抗体として抗 P-

glycoprotein 抗体、2 次抗体として FITC-抗マウス IgG 抗体を用いて免疫染色した後、FACSCan にて P-glycoprotein 発現を検討した。

6) トポイソメラーゼ II 活性の測定：各株細胞の核蛋白を回収した後、トポイソメラーゼ II 測定キット (TopoGen Inc.) を用いて測定した。

7) ADM の細胞内蓄積と排出：FACSCan を用いて ADM の蛍光を経時的に測定した。

III. 結果

1) ATL 細胞株である ATL-2、SALT-3 および ED-S の IC_{50} はそれぞれ 0.759、0.399 および $0.102\mu M$ であり、T 細胞性白血病株 Jurkat、MOLT-3 のそれぞれ 0.050、 $0.028\mu M$ に比較して高かった。

2) ADM 耐性株 ATL-2/ADM cl-1、ATL-2/ADM cl-2、SALT-3/ADM および ED-S/ADM の IC_{50} はそれぞれ 1.659、4.403、1.910 および $0.655\mu M$ であり、それぞれの親株に比較して 2 倍、6 倍、5 倍、6 倍に増強し、ADM に対して強い耐性を獲得していた。

3) ADF 蛋白量は ATL-細胞株 ATL-2、SALT-3、ED-S で、T 細胞性白血病由来株 Jurkat に比較してそれぞれ 12.1 倍、9.6 倍、2.8 倍多かった。また、ADM 耐性株 ATL-2/ADM cl-1、ATL-2/ADM cl-2、SALT-3/ADM および ED-S/ADM の ADF 蛋白量は、それぞれの親株に比較して 4.8 倍、6.6 倍、4.6 倍および 5.2 倍に増加していた。

4) 各細胞株における ADF 蛋白量と ADM の IC_{50} は正の相関を示した ($r=0.891$ 、 $p<0.01$)。しかし、各細胞株における ADM の IC_{50} は、GSH-Px 量 ($r=0.22$) とともにトポイソメラーゼ活性 ($r=0.19$) とともに相関していなかった。

5) ADM の細胞内蓄積と排出は、ATL-2 と ATL-2/ADM との間で差を認めなかった。

6) P-glycoprotein は、陽性コントロールの HL-60 では発現されており、HL-60/ADM ではさらに増加していたが、ATL 由来細胞株では親株でも耐性株でも発現されていなかった。

7) これら ADM 耐性 ATL 細胞の ADM 以外の抗癌剤に対する耐性を検討した。その結果、耐性株は VP-16 および cisplatinum (CDDP) に対してはそれぞれの親株に比較すると耐性を示したが、bleomycin に対しては一定の傾向を示さなかった。また、各細胞株における ADF 蛋白量および GSH-Px 量と VP-16、CDDP の IC_{50} との間に相関は認められなかった。

8) Selenite 及び Diamide 処理によって、ATL 細胞株およびその ADM 耐性株における ADF 蛋白量が減少させると共に ADM の IC_{50} も減少し、ADM 耐性が克服された。

IV. 考案

以上の結果から、ADF/チオレドキシンが ATL 細胞の ADM に対する自然耐性と獲得耐性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方既知の薬剤耐性因子である P-glycoprotein、GSH-Px、トポイソメラーゼ活性などは、ATL 細胞の ADM 耐性にはほとんど関与していないと考えられた。また、ADF 蛋白量を減少させる Selenite および Diamide によって ATL の ADM 耐性を克服できる可能性が示された。ADF 蛋白が ADM に対する耐性にどのように関与しているのかの詳細な機序は不明であるが、Mitsui らは ADF 蛋白が hydrogen peroxide などの活性酸素を減少させると報告している。彼等の報告と今回の結果を合わせると、ADF 蛋白が活性酸素スカベンジャーとして働くことによって、ADM の活性酸素を介した DNA 損傷を回避させる可能性が考えられる。しかし ADF 蛋白は、活性酸素の介在が否定的な Fas や TNF- α による癌細胞のアポトーシスをも阻害するとの報告もある。従って、ADF が活性酸素スカベンジャー作用以外の機構により ADM 耐性に関与する可能性も考慮する必要がある。この点を考える上で、耐性となった細胞においては ADM が核内へ移行せず細胞質にのみ存在し、同時に ADF 蛋白が細胞質に局在することを観察した申請者の未発表の成績は興味深く、今後この観点からも検討する必要がある。ADF 蛋白は、protein-refolding 活性を有するとされており、ADM の核内への移行に何らかの働きをして

いるのかもしれない。また、今回の研究によって得られた ATL の ADM 耐性を Selenite に
よって克服できるという成績は、Selenite がすでに HBs 抗原陽性患者の肝癌発症予防に安全
に使用されており、今後 ATL の薬剤耐性克服方法の開発に寄与するものと期待される。

V. 結語

成人 T 細胞性白血病 (ATL) 細胞が産生する ADF/チオレドキシンが、ATL 細胞の
adriamycin 耐性に関与することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

Possible Roles of an Adult T-Cell Leukemia (ATL)-Derived Factor/Thioredoxin in the Drug Resistance of ATL to Adriamycin

(成人T細胞性白血病由来因子／チオレドキシンの成人T細胞性
白血病のアドリアマイシン耐性における役割)

成人T細胞性白血病adult T-cell leukemia(ATL)は癌化学療法剤(抗癌剤)に感受性が低く、また、薬剤耐性を獲得しやすいために、治療成績が極端に悪い白血病とされる。HTLV-I感染によって誘発されるATL細胞で強い発現が予想されるATL由来因子ATL-derived factor(ADF)は、当初、interleukin-2 receptor- α の発現誘導因子として同定されたものであるが、その後、これが抗酸化酵素チオレドキシンのヒトホモログであることが明らかになり、活性酸素スカベンジャーとして働きうることが想定されている。一方、adriamycin (ADM)はATLの治療に中心的に用いられる抗癌剤であり、その作用機序の一つとして活性酸素によるDNA損傷が関与すると考えられている。従って、ATL細胞に大量に誘導されるADFがADM耐性に直接関与している可能性が考えられる。そこで、申請者はATL細胞のADM耐性におけるADFの役割を明らかにするために、ATL細胞のADF蛋白量とADM耐性の程度との相関関係を検討すると共に、ADF蛋白量を人為的に減少させることによってADM耐性が克服されるか否かを検討した。

実験には、ATL細胞としてATL-2、SALT-3、ED-Sの3株、T細胞性白血病細胞としてJurkat、MOLT-3の2株および前骨髄性白血病HL-60の1株とそのADM耐性株HL-60/ADMなどの白血病細胞株を用いた。MTT法により、各細胞株のADM感受性を測定し50%の細胞を殺す薬剤濃度(IC₅₀)を算定し、その薬剤耐性の程度を比較した。また、ATL細胞株ATL-2、SALT-3、ED-SをそれぞれADM存在下にて培養し、増殖してくる細胞をさらにADMの濃度を上げた培地で培養することを繰り返し、新たに、それぞれの耐性株ATL-2/ADM、SALT-3/ADM、ED-S/ADMを樹立した。各細胞株におけるADF、GSH-Px、P-glycoproteinなどの蛋白分子産生量は、Western blot法およびFACSscanにより、半定量的に測定した。また、トポイソメラーゼII活性は各細胞株の核蛋白を回収した後、トポイソメラーゼII測定キット(TopoGen Inc.)を用いて測定し、ADMの細胞

内蓄積と排出をFACScanを用いてADMの蛍光を経時的に測定した。各細胞をDiamideあるいはSeleniteにて処理し、ADF発現量を低下させた細胞のADMのIC₅₀を検討した。

実験の結果、1)ATL細胞株であるATL-2、SALT-3およびED-SのIC₅₀はそれぞれ0.759、0.399および0.102 μ Mであり、T細胞性白血病株Jurkat、MOLT-3のそれぞれ0.050、0.028 μ Mに比較して高かった。2)ADM耐性株ATL-2/ADM cl-1、ATL-2/ADM cl-2、SALT-3/ADMおよびED-S/ADMのIC₅₀はそれぞれ1.659、4.403、1.910および0.655 μ Mであり、それぞれの親株に比較して2倍、6倍、5倍、6倍に増強し、ADMに対して強い耐性を獲得していた。3)ADF蛋白量はATL細胞株ATL-2、SALT-3、ED-Sで、T細胞性白血病株Jurkatに比較してそれぞれ12.1倍、9.6倍、2.8倍多かった。また、ADM耐性株ATL-2/ADM cl-1、ATL-2/ADM cl-2、SALT-3/ADMおよびED-S/ADMのADF蛋白量は、それぞれの親株に比較して4.8倍、6.6倍、4.6倍および5.2倍に増加していた。4)各細胞株におけるADF蛋白量とADMのIC₅₀は正の相関を示した($r=0.891$ 、 $p<0.01$)が、GSH-Px量($r=0.22$)ともトポイソメラーゼ活性($r=0.19$)とも相関していなかった。5)ADMの細胞内蓄積と排出は、ATL-2とATL-2/ADMとの間で差を認めなかった。6)P-glycoproteinは、陽性コントロールのHL-60では発現されており、HL-60/ADMではさらに増加していたが、ATL由来細胞株では親株でもADM耐性株でも発現されていなかった。7)これらADM耐性ATL細胞のADM以外の抗癌剤VP-16およびcisplatinum(CDDP)に対してはそれぞれの親株に比較すると耐性を示したが、bleomycinに対しては一定の傾向を示さなかった。また、各細胞株におけるADF蛋白量およびGSH-Px量とVP-16、CDDPのIC₅₀との間に相関は認められなかった。8)Selenite及びDiamide処理によって、ATL細胞株およびそのADM耐性株におけるADF蛋白量を減少させることに伴いADMのIC₅₀も減少し、ADM耐性が克服された。

以上の結果から、ADF/チオレドキシンがATL細胞のADMに対する自然耐性と獲得耐性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、既知の薬剤耐性因子であるP-glycoprotein、GSH-Px、トポイソメラーゼ活性などは、ATL細胞のADM耐性にはほとんど関与していないと考えられた。また、ADF蛋白量を減少させるSeleniteおよびDiamideによってATLのADM耐性を克服できる可能性が示された。ADF蛋白がADMに対する耐性にどのように関与しているのかの詳細な機序は本研究では明らかにされていないが、申請者は、ADF蛋白が活性酸素スカベンジャーとして働くことによって、ADMの活性酸素を介したDNA損傷を回避させることを介し、あるいはADF蛋白が癌細胞のアポトーシスを阻害することを介して、ADM耐性へ関与する可能性を推察した。

公開発表において、副査浅香正博教授より、1)ADF遺伝子導入によるADM耐性の獲得、2)ADF低下に利用したSeleniteやDiamideの臨床への応用の可能性、3)ADFの抗酸化作用について、また、副査吉木敬教授より、4)ADFの抗アポプティック作用について、5)ATL以外の癌でのADFとADM薬剤耐性との関係について、6)ADM薬剤耐性細胞におけるHTLV-I遺伝子Taxの発現について、主査犬山征夫より、7)ATL症例における薬剤感受性試験の現状についてなど質問があったが、申請者は、豊富な研究経験により得た知識と文献的考察を駆使し、ほぼ妥当な回答をなし得た。

本研究は、成人T細胞性白血病(ATL)細胞が産生するADF/チオレドキシンが、ATL細胞のadriamycin耐性に関与することを初めて明らかにしたものである。この成果は、

通常の化学療法では治療の困難なATLの薬剤耐性克服方法の開発に重要な示唆を与え、ATLの今後の治療に寄与するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。