

長谷川 寛雄 論文内容の要旨

主 論 文

Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea balsamifera*, abrogates TRAIL resistance in leukemia cells

白血病細胞における TRAIL 抵抗性克服物質：天然植物 (*Blumea balsamifera*) 由来 Dihydroflavonol BB-1 の発見

長谷川寛雄, 山田恭暉, 小宮山寛機, 林正彦, 石橋正己, 吉田達士, 酒井敏行, 小谷野孝, Toh-Seok Kam, 村田健, 菅原和行, 鶴田一人, 赤松紀彦, 塚崎邦弘, 増田昌人, 高須信行, 上平憲

Blood 掲載予定

prepublished online October 4, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-05-1982

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学 専攻
(主任指導教員：上平 憲 教授)

緒 言

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) は様々な悪性腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するサイトカインであり、新規分子標的治療薬として海外では臨床試験が行われている。TRAIL と特異的に結合する細胞膜レセプターにはアポトーシスシグナルを伝達する TRAIL-R1 (DR4) と TRAIL-R2 (DR5)、およびアポトーシスシグナルを伝達せずむしろ decoy として機能する TRAIL-R3 (DcR1) と TRAIL-R4 (DcR2) の 4 種類が知られている。

私達はこれまでの研究から、健常人 CD4 リンパ球は TRAIL-R1 および TRAIL-R2 の何れも発現していないが、CD4 リンパ球由来の予後不良な疾患群である成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) 細胞は、これらのデスレセプターを発現していることを明らかにしている (Cell Immunol, Br J Haematol)。その特性から、ATLL 細胞の TRAIL 特異的なアポトーシス誘導を期待したが、残念ながら ATLL 細胞の多くは TRAIL に抵抗性であった。ATLL 細胞における TRAIL シグナル伝達の検討をおこなった結果、種々のアポトーシス抵抗因子の関与が示唆され、生体内においてもこのような抵抗因子が ATLL 細胞の生存や増殖に有利に働いていると推測された。

他の悪性腫瘍でも TRAIL 抵抗性が報告されていることから、本研究では ATLL を TRAIL 抵抗性のモデル腫瘍疾患と捉え、天然由来物質の中から TRAIL 抵抗性を克服するような物質の探索をおこなうこととした。

対象と方法

- (1) TRAIL 抵抗性 ATLL 細胞株 KOB を用い、160 種以上の天然由来物質をスクリーニングした。ATLL 細胞株 ST1 及び他の白血病細胞株 Jurkat, U937, K562, HL60, Ramos も使用した。

- (2) TRAIL レセプター発現の検討は各々のモノクローナル抗体を使用しフローサイトメトリー法にておこなった。
- (3) TRAIL 誘導アポトーシスは MTS アッセイ、アネキシンと PI による染色、caspase の活性化など様々な方法で検討した。またミトコンドリア膜電位低下の検討は Dioc6 を使用しフローサイトメトリー法でおこなった。
- (4) アポトーシス促進・抑制に関与する因子の解析は、種々の抗体を使用しウエスタンブロット法で検討した。
- (5) ルシフェラーゼアッセイにおいては既に公表されているレポータープラスミドを使用し、標的因子のノックダウンは既に効果の確認されている siRNA を使用し、いずれも Amaxa 社の Nucleofector を使用しエレクトロポレーションによるトランスフェクションをおこない検討した。

結 果

- (1) 約 160 種以上の天然由来物質と KOB 細胞を用いてスクリーニングをおこなった結果、単独で増殖抑制効果がほとんどなく、しかも TRAIL との併用でアポトーシスを増強する物質として、天然植物 (*Blumea balsamifera*) 由来 Dihydroflavonol BB-1 を発見した。BB-1 で処理した後に TRAIL を追加する Sequential な併用によって、さらなるアポトーシスの増強が認められた。
- (2) ウエスタンブロットによるアポトーシス関連因子の検討とミトコンドリア活性の変化から、BB-1 によってほとんど活性のみられなかった Intrinsic Pathway の活性化が引き起こされていることが明らかになった。一方、アポトーシス抑制に関わっている因子の発現にはほとんど変化が認められなかった。
- (3) さらに上流であるレセプター発現を解析すると、BB-1 処理によって TRAIL-R2 が 3 倍以上に発現増強していることが分かった。このことは、TRAIL と TRAIL-R2 の結合を阻害する TRAIL-R2Fc キメラタンパクを使用することによって BB-1 による TRAIL 感受性の増強が抑制されることから証明された。さらに TRAIL-R1、R2 を siRNA でノックダウンする実験を行った。TRAIL 感受性の増強が siTRAIL-R1 処理では変化が認められないのに対し、siTRAIL-R2 処理では抑制されることから、BB-1 による TRAIL 感受性の増強は TRAIL-R2 の発現増強によると考えられた。
- (4) BB-1 による同様の感受性増強は他の ATLL 細胞株や白血病細胞株でも認められることを確認した。その作用機序はやはり TRAIL-R2 の発現増強であった。
- (5) TRAIL-R2 Promotor 活性をルシフェラーゼアッセイで評価すると、BB-1 処理によって TRAIL-R2 の増強が見られた KOB, U937, K562 細胞においてのみ著名な活性の上昇が認められた。

考 察

TRAIL 感受性増強物質は新しい分子標的療法やがん予防医学の観点から注目されている。すでに、既存の抗がん剤や放射線療法との併用により TRAIL 感受性が増強することが知られており、最近その作用機序解析の報告も増えた。しかしその機序は種々の抵抗因子 (IAP や Bcl2 ファミリー等) の抑制によるものとする報告が多い。

今回の我々の検討では予想に反し、実際はデスレセプターの発現増強が TRAIL 感受性増強の原因であることが明らかになった。またこれまでのレセプター発現増強による TRAIL 感受性増強の報告のほとんどが既存の化学療法剤との併用によるものであったことから、天然物質による増強作用は新たな治療法の可能性を示唆していると思われる。一方、我々が発見したフラボノイドに類似した他のフラボノイドでも TRAIL 感受性増強作用があることが発見され、つい最近、同様の報告が相次いでいる (Cancer Res 2005:7815-23. BBRC 2005:833-8. Oncogene 2005:2050-8. Leukemia 2004:1780-8.)。我々の報告とのこのような類似は、ある種のフラボノイドが TRAIL の感受性増強作用を持つという新しいエビデンスの核心をついている可能性が高いといえる。