



Phenylarsine oxide (PAO) more intensely induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia (APL) and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-resistant APL cell lines than As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by activating the mitochondrial pathway

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐原, 直日 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/258">http://hdl.handle.net/10271/258</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 438号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏 名	佐 原 直 日		
論文題目	<p>Phenylarsine oxide (PAO) more intensely induces apoptosis in accute promyelocytic leukemia (APL) and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-resistant APL cell lines than As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by activating the mitochondrial pathway                      (フェニルアルシンオキシドは急性前骨髄球性白血病およびその亜砒酸耐性細胞株に対し、ミトコンドリア経路を活性化することによって亜砒酸よりも強力にアポトーシスを誘導する)</p>		

博士(医学) 佐 原 直 日

## 論文題目

Phenylarsine oxide (PAO) more intensely induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-resistant APL cell lines than As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by activating the mitochondrial pathway

(フェニルアルシンオキシドは急性前骨髄球性白血病およびその亜砒酸耐性細胞株に対し、ミトコンドリア経路を活性化することによって亜砒酸よりも強力にアポトーシスを誘導する)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

活性化ビタミンAを含む化学療法後再発した急性前骨髄球性白血病(APL)症例に対し亜砒酸が有効であることが報告されている。しかし、亜砒酸治療後の寛解持続期間は短く、亜砒酸耐性を獲得した症例も見られる。そのため新規の抗癌剤の開発が必要である。有機砒素化合物であるフェニルアルシンオキシド(PAO)は膜透過性の高いリン酸化チロシンホスファターゼ(PTP)インヒビターで血液細胞にも殺細胞効果をあらわす。これまでにAPL以外の白血病細胞に及ぼす影響の報告は散見されるが、APLおよび亜砒酸耐性APL細胞に対する検討は行われていない。今回我々はAPL細胞株(NB4)およびその亜砒酸耐性株(NB4/As)を用いてPAOの殺細胞効果とその作用機序を亜砒酸と比較した。

### 〔材料ならびに方法〕

NB4、NB4/Asを亜砒酸(0.1-10 $\mu$ M)、PAO(0.01-0.5 $\mu$ M)存在下に4日間培養し、生細胞数、生存率をトリパンブルー染色にて測定した。アポトーシスの評価として細胞周期、フォスファチジルセリン発現量、ミトコンドリア膜電位変化、細胞内の活性酸素産生量をフローサイトメトリーで測定した。細胞の形態変化はヘキスト33258染色後蛍光顕微鏡で観察した。分化誘導効果の指標としてCD11b発現量の変化をフローサイトメトリーで測定した。NB4、NB4/As細胞内のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)濃度を吸光光度計にて測定した。アポトーシス抑制蛋白であるBcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>の発現量の変化をウエスタンブロット法にて測定した。

### 〔結果〕

PAOはNB4の細胞増殖を亜砒酸の10分の1の濃度で抑制した。NB4の培養48時間でのIC<sub>50</sub>は亜砒酸では0.54 $\mu$ M、PAOでは0.06 $\mu$ Mであった(P=0.025)。NB4/AsにおけるIC<sub>50</sub>は亜砒酸では2.8 $\mu$ M、PAOでは0.08 $\mu$ Mと、亜砒酸では上昇したがPAOでは変化が見られなかった。細胞周期解析、フォスファチジルセリン発現の解析をしたところ、PAOはNB4に亜砒酸よりも強力にアポトーシスを誘導した。ヘキスト33258染色でも核の断片化やアポトーシス小体などの形態変化が見られた。0.1 $\mu$ M PAOは1 $\mu$ M亜砒酸よりもミトコンドリア膜電位を下げ、細胞内活性酸素を多く発生させた。PAOはNB4細胞表面上のCD11b発現量を変化させなかった。NB4/As細胞内のGST濃度はNB4よりも有意に高かった(593 vs 70.8 $\mu$ g/ml、P<0.0001)。ウエスタンブロット解析では、PAOはBcl-2に加えBcl-X<sub>L</sub>の発現量も低下させたが、亜砒酸では後者の反応は見られなかった。

### 〔考察〕

PAOは膜透過性の高いPTPインヒビターで高濃度(10-50 $\mu$ M)ではミトコンドリア膜透過性トランジッ

ションポア (PTpore) を開口させる。今回私たちの検討ではPAOはNB4に対し亜砒酸よりも約9倍強い殺細胞効果を示し、その効果は亜砒酸耐性細胞株であるNB4/Asでも減弱しなかった。これより、亜砒酸耐性APL症例に対してPAOが治療効果を発揮する可能性が示唆された。PAOの殺細胞効果の作用機序はアポトーシスが中心で、分化誘導効果はむしろ亜砒酸よりも弱かった。アポトーシスの機序は、PAOがミトコンドリア膜電位を強力に下げ活性酸素を多量に発生させたことより、ミトコンドリア経路の活性化が主であると考えられた。Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>は、ミトコンドリア内でPTporeの開口を抑制しミトコンドリア膜電位を維持することによってアポトーシスを抑制しているが、PAOはBcl-2以外にBcl-X<sub>L</sub>の発現を低下させることによってより強力にミトコンドリア経路を活性化していると考えられた。NB4/AsはNB4と比較してグルタチオンが高いとの報告があるが、今回私たちはさらにGST濃度が高いことを明らかにした。これらの活性酸素スカベンジャー酵素が亜砒酸耐性の原因となっている可能性が高いが、なぜPAOがこれらのスカベンジャー酵素に勝る活性酸素を発生させることができるのかは今後の検討課題である。

#### 〔結論〕

NB4に対しPAOは亜砒酸よりも約9倍強い殺細胞効果を示し、その効果は亜砒酸耐性細胞株でも同様であった。その作用機序は、Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>を減弱させ、ミトコンドリア経路を活性化しアポトーシスを誘導するというメカニズムが主であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

活性化ビタミンAを含む化学療法後再発した急性前骨髄球性白血病 (APL) 症例に対し亜砒酸が有効であることが報告されている。しかし、亜砒酸治療後の寛解持続期間は短く、亜砒酸耐性を獲得した症例も見られる。そのため新規の抗癌剤の開発が必要である。有機砒素化合物であるフェニルアルシンオキシド (PAO) はAPL以外の白血病細胞に及ぼす影響の報告は散見されるが、APLおよび亜砒酸耐性APL細胞に対する検討は行われていない。そこで申請者はAPL細胞株 (NB4) およびその亜砒酸耐性株 (NB4/As) を用いてPAOの殺細胞効果とその作用機序を亜砒酸と比較した。

NB4、NB4/Asを亜砒酸及びPAO存在下に4日間培養し、生細胞数、生存率をトリパンブルー染色にて測定した。アポトーシスの評価として細胞周期、フォスファチジルセリン発現量、ミトコンドリア膜電位変化、細胞内の活性酸素産生量をフローサイトメトリーで測定した。細胞の形態変化はヘキスト33258染色後蛍光顕微鏡で観察した。分化誘導効果の指標としてCD11b発現量の変化をフローサイトメトリーで測定した。NB4、NB4/As細胞内のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX)、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 濃度を吸光光度計にて測定した。アポトーシス抑制蛋白であるBcl-2、Bcl-X<sub>L</sub>の発現量の変化をウエスタンブロット法にて測定した。

申請者の検討結果では、PAOはNB4に対し亜砒酸よりも約9倍強い殺細胞効果を示し、その効果は亜砒酸耐性細胞株であるNB4/Asでも減弱しなかった。また、PAOはミトコンドリア膜電位を下げ、細胞内活性酸素を多く発生させ、強力にアポトーシスを誘導した。強力なアポトーシスの誘導には、PAOがBcl-2に加えBcl-X<sub>L</sub>の発現量も低下させたことが関与していると思われた。PAOの殺細胞効果はアポトーシスによるものが中心で、分化誘導効果はむしろ亜砒酸よりも弱かった。また、NB4/As細胞内のGST濃度はNB4よりも有意に高かった。これらの活性酸素スカベンジャーの変化が亜砒酸耐性の原因となっていることが示唆された。

審査委員会では、PAOの毒性については十分な検討がされてはいないが、その強力な殺細胞作用のメカニズムを解明し、新規薬物の開発につながる研究と高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) As203耐性株(NB4/As)における活性酸素の細胞内蓄積について
- 2) NB4株およびNB4/As株の特徴について
- 3) PAOおよびAs203の活性酸素の産生メカニズムについて
- 4) As203耐性株(NB4/As)においてPAOの効果が減弱しない理由について
- 5) PAOの薬物動態について
- 6) PAOおよびAs203の副作用について
- 7) PAOが分化誘導を起こさない理由について
- 8) チロシンホスファターゼ活性と抗腫瘍効果について
- 9) PAOの他の血液腫瘍に対する効果について
- 10) 臨床応用の可能性について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梅 村 和 夫		
	副査	浦 野 哲 盟	副査	本 郷 輝 明