



The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 張, 文傑 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1167

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 3 1 4 号	学位授与年月日	平成 1 2 年 3 月 2 7 日
氏 名	張 文 傑		
論文題目	The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms (亜砒酸のリンパ系腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導と細胞周期停止作用)		

博士(医学) 張 文 傑

論文題目

The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms

(亜砒酸のリンパ系腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導と細胞周期停止作用)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

亜砒酸(As_2O_3)は急性前骨髄球性白血病(APL)に対し著効を示し、APLの再発難治例にも有効であることが報告されている。その作用機序については、APL細胞に対し高濃度ではアポトーシスを誘導し、低濃度では部分的な分化を誘導することが判明している。APL以外の一部の急性骨髄性白血病細胞にも有効性が認められているが、リンパ系腫瘍細胞に対する効果はまだ明らかではない。我々は亜砒酸によるリンパ系腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果および作用機序について検討した。

〔材料ならびに方法〕

亜砒酸は水酸化アンモニウムにより溶解し、RPMI 1640で希釈した。リンパ系腫瘍細胞株NOP-1、NOL-3、Raji、Daudi、骨髄系細胞株NB4、NKM-1、HL-60、患者よりの慢性リンパ性白血病細胞、リンパ腫細胞および正常人末梢血単核球を各種濃度の亜砒酸とともに5日間培養し、細胞の増殖、生存率を経時的にトリパンプルー法およびMTT法により測定した。アポトーシスについては形態ならびにpropidium iodide(PI)染色によりフローサイトメトリーで解析し、電気泳動によりDNA断片で確認した。細胞周期はPI染色によりフローサイトメトリーで解析、Bcl-2蛋白の発現は免疫染色によりフローサイトメトリーで解析した。

〔結果〕

亜砒酸($0.5-2\mu\text{M}$)により、全ての細胞の増殖は抑制された。 $1\mu\text{M}$ の亜砒酸によりNOP-1、NOL-3、NB4、NKM-1および慢性リンパ性白血病細胞、リンパ腫細胞、正常人末梢血単核球においてアポトーシス誘導効果が認められた。HL-60、Raji、Daudi細胞に対し亜砒酸によるアポトーシス誘導効果は認められなかったが、G0/G1期からS期の細胞周期を抑制することが認められた。アポトーシスが誘導された細胞ではBcl-2蛋白の発現が減少していた。

〔考察〕

亜砒酸はヒト造血腫瘍細胞に抗腫瘍作用を示し、その作用機序としては一部の細胞に対してはアポトーシス誘導、一部に対しては細胞周期停止作用が考えられた。アポトーシスを誘導する機序は細胞内Bcl-2発現のdown-regulationが関わっていることが示唆された。亜砒酸はリンパ系細胞に対しても抗腫瘍効果を示し、APL以外の造血器腫瘍に対しての臨床応用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

亜砒酸(As_2O_3)は急性前骨髄球性白血病(APL)に対し著効を示し、all-transレチノイン酸で治療した後の再発難治例にも有効であることが報告されている。その作用機序については、APL細胞に対し高濃度ではアポトーシスを誘導し、低濃度では部分的な分化を誘導することが判明している。亜砒酸の有効はAPL以外の一部の急性骨髄性白血病細胞でも認められているが、リンパ系腫瘍細胞に対する効果はまだ明らかではない。申請者は亜砒酸によるリンパ系腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果および作用機序についてin vitroで検討した。

亜砒酸は水酸化アンモニウム液に溶解し、RPMI 1640で希釈した。リンパ系腫瘍細胞株NOP-1、NOL-3、Raji、Daudi、骨髄系細胞株NB4、NKM-1、HL-60、患者よりの慢性リンパ性白血病細胞、リンパ腫細胞および正常人末梢血単核球を0.1～2 μM の亜砒酸とともに5日間培養し、細胞の増殖、生存率を経時的にトリパンブルー法およびMTT法により測定した。アポトーシスについては形態ならびにpropidium iodide(PI)染色によりフローサイトメトリーで解析し、電気泳動によりDNA断片で確認した。細胞周期はPI染色によりフローサイトメトリーで解析、Bcl-2蛋白の発現は免疫染色によりフローサイトメトリーで解析した。

亜砒酸により、全ての細胞の増殖は抑制された。1 μM の亜砒酸によりNOP-1、NOL-3、NB4、NKM-1および慢性リンパ性白血病細胞、リンパ腫細胞、正常人末梢血単核球においてアポトーシス誘導効果が認められた。HL-60、Raji、Daudi細胞に対し亜砒酸によるアポトーシス誘導効果は認められなかったが、G0/G1期からS期の細胞周期を抑制することが認められた。アポトーシスが誘導された細胞ではBcl-2蛋白の発現が減少していた。

以上の結果から、亜砒酸はAPL以外のヒト造血腫瘍細胞にも抗腫瘍作用があることが示唆された。その作用機序としてはアポトーシス誘導及び細胞周期停止作用が考えられた。アポトーシスには細胞内Bcl-2発現のdown-regulationが関わっていることが示唆された。この研究は今後亜砒酸がAPL以外の造血細胞腫の治療にも有用であることを示唆したものとして評価できる。

申請者の発表に対して審査員から次のような質問が出された。

- 1) 急性前骨髄球性白血病の治療の際の亜砒酸の投与方法と血中濃度について
- 2) Trypan blueでアポトーシス細胞を染色する場合、細胞にどの程度の変化が起きるとアポトーシス細胞が識別できるか
- 3) 亜砒酸の作用を0.1、1、2 μM の濃度で調べているが、0.5 μM ではどのような効果が見られるか
- 4) Cell lineが異なる場合は増殖速度はどのように異なるか、また増殖速度とアポトーシスの関係はどうか
- 5) 患者から分離された細胞が実験条件下で自然に死亡する理由は何か
- 6) 亜砒酸は低濃度で増殖促進効果が見られるが、この効果の時間経過はどうか
- 7) 亜砒酸によるBcl-2のdown regulationは作用させてから何日目くらいから見られるか
- 8) Bcl-2のdown regulationの程度とアポトーシスの程度は相関しているか
- 9) 亜砒酸によるアポトーシスと細胞周期停止との関連について
- 10) Caspaseの活性はどのように変化しているか

- 11) Bcl-2 のファミリーは変化している可能性はないか
- 12) 亜砒酸の副作用である催不整脈作用の機序について
- 13) 亜砒酸が急性前骨髄球性白血病に特に有効性が高いのはなぜか
- 14) 亜砒酸と all-trans レチノイン酸の急性前骨髄球性白血病に対する作用の機序の相違

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 橋 本 久 邦

副査 梅 村 和 夫 副査 今 野 弘 之