

小児癌細胞における細胞死誘導耐性化機序の解明とその克服手段の開発

(課題番号 17390301)

平成17年度～平成19年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成20年4月

研究代表者 駒田美弘

(三重大学大学院医学系研究科教授)

はしがき

平成17年度～平成19年度

科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））研究成果報告書

研究課題 小児癌細胞における細胞死誘導耐性化機序の解明とその克服手段の開発

課題番号 17390301

研究組織

（平成17年度）

研究代表者 駒田美弘（三重大学大学院医学系研究科教授）

研究分担者 東 英一（三重大学医学部附属病院准教授）

研究分担者 堀 浩樹（三重大学大学院医学系研究科准教授）

（平成18年度）

研究代表者 駒田美弘（三重大学大学院医学系研究科教授）

研究分担者 東 英一（三重大学医学部附属病院准教授）

研究分担者 堀 浩樹（三重大学大学院医学系研究科准教授）

（平成19年度）

研究代表者 駒田美弘（三重大学大学院医学系研究科教授）

研究分担者 東 英一（三重大学医学部附属病院准教授）

研究分担者 堀 浩樹（三重大学大学院医学系研究科准教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	10,200	0	10,200
平成18年度	2,400	0	2,400
平成19年度	2,800	840	3,640
総計	15,400	840	16,240

研究発表

（1）雑誌論文

- 1 Kagawa Y, Noge I, Higashigawa M, Komada Y. Combined antitumor effect of cyclophosphamide and bromodeoxyuridine in BDF1 mice bearing L1210 ascites tumors. Biol Pharm Bull. 2008 Jan;31(1):57-61.
- 2 Nashida Y, Yamakado K, Kumamoto T, Suga S, Takaki H, Hori H, Azuma E, Komada Y. Radiofrequency ablation used for the treatment of frequently recurrent rhabdomyosarcoma in the masticator space in a 10-year-old girl. J Pediatr Hematol Oncol. 2007 Sep;29(9):640-2.
- 3 Li Y, Dida F, Iwao A, Deguchi T, Azuma E, Komada Y. Cell cycle dependency of caspase activation in Fas-induced apoptosis in leukemia cells. Cancer Sci. 2007 Aug;98(8):1174-83.

- 4 Nashida Y, Kumamoto T, Azuma E, Hirayama M, Araki M, Yamada H, Dida F, Iwamoto S, Tamaki S, Ido M, Ihara T, Komada Y. Development of a dendritic cell vaccine against measles for patients following hematopoietic cell transplantation. *Transplantation*. 2006 Oct 27;82(8):1104-7.
- 5 Hirayama M, Azuma E, Araki M, Komada Y, Nakagawa A. Evidence of graft-versus-tumor effect in refractory metastatic neuroblastoma. *Transplantation*. 2006 Jul 15;82(1):142-4.
- 6 Hirayama M, Azuma E, Kumamoto T, Iwamoto S, Nashida Y, Araki M, Yamada H, Dida F, Tamaki S, Kawakami K, Kageyama S, Nakano T, Yamamoto H, Komada Y. Discrimination of acute graft-versus-host disease from infections by enumeration of peripheral blood interferon-gamma spot-forming cells. *Transplantation*. 2006 Feb 27;81(4):632-5.
- 7 Inaba H, Shimada K, Zhou YW, Ido M, Buck S, Yonehara S, Kaplan J, Komada Y. Acquisition of Fas resistance by Fas receptor mutation in a childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia cell line, MML-1. *Int J Oncol*. 2005 Aug;27(2):573-9.
- 8 Hirayama M, Azuma E, Kumamoto T, Iwamoto S, Yamada H, Nashida Y, Araki M, Kageyama S, Tamaki S, Kawakami K, Yamamoto H, Komada Y. Prediction of acute graft-versus-host disease and detection of distinct end-organ targets by enumeration of peripheral blood cytokine spot-forming cells. *Transplantation*. 2005 Jul 15;80(1):58-65.
- 9 Ogawa M, Hori H, Ohta T, Onozato K, Miyahara M, Komada Y. Sensitivity to gemcitabine and its metabolizing enzymes in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3485-93.

10 Ogawa M, Hori H, Hirayama M, Kobayashi M, Shiraishi T, Watanabe Y, Komada Y.
Anaplastic transformation from papillary thyroid carcinoma with increased serum
CA19-9. *Pediatr Blood Cancer*. 2005 Jul;45(1):64-7.

(2) 学会発表

- 1 篠木敏彦、熊本忠史、出口隆生、堀 浩樹、駒田美弘、大竹耕平、渡辺秀樹、井上幹広、内田恵一、櫻井洋至、上本伸二. 肝未分化肉腫の1例. 第21回日本小児がん学会学術集会、2005年11月、宇都宮.
- 2 五十嵐智美、日比美由紀、出口隆生、堀 浩樹、駒田美弘. 小児がん患児のトータルケア推進に向けて-CLSの導入と今後の課題-. 第21回日本小児がん学会学術集会、2005年11月、宇都宮.
- 3 小野里かおり、堀 浩樹、小川昌弘、駒田美弘. 進行神経芽腫に対する gemcitabine を key drug とした化学療法の開発. 第21回日本小児がん学会学術集会、2005年11月、宇都宮.
- 4 駒田美弘. 細胞死受容体を介して誘導される白血病細胞死. 第47回日本小児血液学会、2005年11月、宇都宮.
- 5 出口美智子、出口隆生、雨宮喜雄、駒田美弘. Common variable immunodeficiency の5歳女児例における免疫能解析. 第47回日本小児血液学会、2005年11月、宇都宮.
- 6 出口隆生、出口美智子、雨宮喜雄、駒田美弘. 寛解導入療法の違いによる早期治療反応性への影響についての検討. 第47回日本小児血液学会、2005年11月、宇都宮.
- 7 DIDA FRANCIS、李 玉峰、出口隆生、東 英一、駒田美弘. MECHANISMS OF ACQUIRED RESISTANCE TO TRAIL INDUCED APOPTOSIS IN B-LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. 第47回日本小児血液学会、2005年11月、宇都宮.

- 8 李 玉峰、DIDA FRANCIS、出口隆生、東 英一、駒田美弘. Cell cycle dependent of Fas-mediated cell death in leukaemia cells. 第47回日本小児血液学会、2005年11月、宇都宮.
- 9 小林三希子、熊本忠史、出口隆生、駒田美弘. Ewing sarcoma family of tumor 7例の検討. 第22回日本小児がん学会学術集会、2006年11月、大阪
- 10 平山雅浩、熊本忠史、出口隆生、菅 秀、堀 浩樹、東 英一、駒田美弘. 進行型神経芽細胞腫に対する同種造血細胞移植例におけるGraft-versus-Tumor効果の証明. 第22回日本小児がん学会学術集会、2006年11月、大阪
- 11 出口隆生、出口美智子、雨宮喜雄、駒田美弘. T-ALLにおけるMRD継続的フォローの意義についての考察. 第48回日本小児血液学会、2006年11月、大阪.
- 12 山城洋樹、熊本忠史、出口隆生、駒田美弘. 急性前骨髄球性白血病の寛解導入における問題点と対処法. 第48回日本小児血液学会、2006年11月、大阪.
- 13 平山雅浩、熊本忠史、出口隆生、菅 秀、堀 浩樹、井戸正流、東 英一、駒田美弘. JAK2 mutation を認めた慢性骨髄増殖疾患の一女兒例. 第48回日本小児血液学会、2006年11月、大阪.
- 14 熊本忠史、伊藤美津江、平山雅浩、東 英一、駒田美弘. 造血細胞移植後の抗ウイルス樹状細胞ワクチン. 第48回日本小児血液学会、2006年11月、大阪.
- 15 大橋 浩、細木興亜、熊本忠史、堀 浩樹、東 英一、駒田美弘. 大量¹³¹I-MIBG療法後同種骨髄移植を施行した神経芽腫1再発例. 第23回日本小児がん学会学術集会、2007年12月、仙台
- 16 堀 浩樹、美濃部こころ、小野里かおり、駒田美弘. T細胞型白血病の6MPおよびMTX感受性に対するMTAP欠損の意義. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血

液学会合同総会、2005年9月、横浜。

- 17 岩尾 篤、出口隆生、熊本忠史、平山雅浩、堀 浩樹、東 英一、駒田美弘。小児再発 ALL への化学療法についての検討。第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会、2005年9月、横浜。
- 18 東川正宗、西森久史、駒田美弘、小林正夫、谷広ミサエ、平岡朝子。母体由来抗好中球抗体 HNA-1b による Isoimmune Neonatal Neutropenia の二卵性双生児例。第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会、2005年9月、横浜。
- 19 細木興亜、出口隆生、松田和之、山城洋樹、岩尾 篤、堀 浩樹、駒田美弘。小児造血器腫瘍化学療法における第 4 世代セフェムを中心とした抗生剤予防投与の有効性。第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会、2006年10月、福岡。
- 20 平山雅浩、東 英一、玉木茂久、川上恵基、影山慎一、駒田美弘。IFN- γ 産生細胞数算定により急性 GVHD はその発症 4 日前に予測可能である。第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006年2月、東京。
- 21 梨田裕志、熊本忠史、東 英一、駒田美弘。カルシウム拮抗薬による肝血管内皮細胞の Heme oxygenase-1 の産生誘導-Hepatic veno-occlusive disease の予防・治療。第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006年2月、東京。
- 22 鎌田尚樹、岩佐 正、熊本忠史、出口隆生、平山雅浩、東 英一、駒田美弘。骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植後に好酸球増多症を来した 3 例の検討。第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006年2月、東京。
- 23 荒木まり子、平山雅浩、伊藤美津江、熊本忠史、東 英一、駒田美弘。マウスモデルを用いた造血細胞移植における NIMA 不一致ドナーの反応性について。第 29 回日本造血細胞移植学会総会、2007年2月、福岡。

- 24 伊藤美津江、熊本忠史、平山雅浩、東 英一、駒田美弘、樹状細胞ワクチンを用いた造血細胞移植後のウイルス感染予防法の開発. 第29回日本造血細胞移植学会総会、2007年2月、福岡.
- 25 平山雅浩、東 英一、熊本忠史、荒木まり子、伊藤美津江、玉木茂久、駒田美弘. 慢性GVHDにおけるIL-10産生細胞の意義. 第29回日本造血細胞移植学会総会、2007年2月、福岡.
- 26 木平健太郎、熊本忠史、出口隆生、平山雅浩、堀 浩樹、東 英一、駒田美弘. 造血細胞移植後に発症した somnolence 症候群の4例. 第29回日本造血細胞移植学会総会、2007年2月、福岡.
- 27 松下理恵、熊本忠史、平山雅浩、駒田美弘、東 英一、中村明子、登 勉. 造血細胞移植間患者における細菌・真菌感染症のPCR迅速遺伝子診断法の有用性. 第30回日本造血細胞移植学会総会、2008年2月、大阪.
- 28 平山雅浩、東 英一、熊本忠史、岩本彰太郎、伊藤美津江、玉木茂久、駒田美弘. ELISPOT法を用いた慢性GVHDの診断及び治療効果判定について. 第30回日本造血細胞移植学会総会、2008年2月、大阪.

研究成果

(平成17年度研究成果)

抗 Fas 抗体、あるいは TRAIL 刺激によりアポトーシス細胞死が誘導される白血病細胞を用いて、カスパーゼ-8、カスパーゼ-3の活性化がどの細胞周期において誘導されるかを明らかにすることを目的に以下の解析を行った。カスパーゼ-8、カスパーゼ-3の活性化の検討には、抗活性化カスパーゼ-8、抗活性化カスパーゼ-3抗体、および活性化カスパーゼ-8、活性化カスパーゼ-3に特異的に結合する標識ペ

プチドを用いて、抗 Fas 抗体、あるいは TRAIL にて刺激した白血病細胞株を染色し、その反応（結合）性をフローサイトメトリーにて解析した。また、細胞周期（回転）の検索には、propidium iodide 染色による DNA 量測定法を用い、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、カスパーゼ-8 の活性化された細胞分画は、G0/G1 期の細胞集団から連続性に認められた。また、カスパーゼ-3 の活性化された細胞分画は、G0/G1 期から S 期の細胞集団から連続性に認められた。さらに、カスパーゼ-8、あるいはカスパーゼ-3 の活性化の細胞周期特異性の有無を詳細に検討するために、カスパーゼ-8、あるいはカスパーゼ-3 の活性化した細胞における細胞周期特異的サイクリン蛋白の発現プロフィールを検索した。サイクリン蛋白の発現は、抗サイクリン A (S 期特異的) 抗体、抗サイクリン B1 (G2-M 期特異的) 抗体、抗サイクリン E (late G1-early S 期早期特異的) 抗体にて染色し、フローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、カスパーゼ-8 の活性化された細胞、カスパーゼ-3 の活性化された細胞は、ともにサイクリン A 陰性、サイクリン B1 陰性、サイクリン E 陽性を示した。以上の結果より、細胞死受容体を介して誘導されるカスパーゼの活性化には細胞周期特異性が認められ、カスパーゼ-8 の活性化は、G0/G1 期において、カスパーゼ-3 の活性化は、G0/G1 期から early S 期にかけて誘導されることが示唆された。次年度においては、細胞回転を阻害することにより、細胞死受容体を介する刺激によるカスパーゼの活性化が抑制され、その結果として細胞死の誘導が障害されるかを検討する予定である。また、細胞周期による、細胞死シグナル伝達に関与する種々の蛋白分子（カスパーゼ、アポトーシス抑制蛋白）の発現の変化についても検討を加えたい。

(平成18年度研究成果)

抗 Fas 抗体刺激によりアポトーシス細胞死が誘導される白血病細胞株を用いて、カスパーゼ-8、カスパーゼ-3の活性化がどの細胞周期において誘導されるかを明らかにした。その結果、カスパーゼ-8の活性化は、G0/G1期において、カスパーゼ-3の活性化は、G0/G1期から early S 期にかけて誘導されることが示唆された(平成17年度実績)。今年度においては、抗 Fas 抗体刺激によりカスパーゼ-3の活性化された細胞をセルソーティングにより分離し、細胞周期調節蛋白の発現を検討したところ、サイクリン E、サイクリン D1 陽性、サイクリン A、サイクリン B1、p27/kip-1、Ki67 陰性であり、カスパーゼ-3の活性化は、G1 後期から early S 期にかけて誘導されていることが確認された。

また、細胞増殖/生存に重要な PI3 Kinase/Akt 経路の活性と細胞死受容体を介した細胞死誘導の関連を検索した。TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 刺激による細胞死誘導に対して耐性を獲得した細胞においては、Akt のリン酸化が誘導されており、PI3 Kinase/Akt 経路が活性化されていた。耐性細胞を PI3 Kinase 阻害剤で前処理することにより、TRAIL による細胞死誘導が見られるようになり、PI3 Kinase/Akt 経路の活性化が細胞死誘導の耐性化に関与していると考えられた。また、Akt のリン酸化の亢進の機序に関しては、2つのフォスファターゼ (PTEN/phosphate and tensin homologue deleted on chromosome 10, PHLIP/PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) の発現を解析した。PHLIP の発現は、感受性細胞と耐性細胞の間に差は認められなかった。PTEN も

感受性細胞と耐性細胞ともに同程度の発現を認めたが、リン酸化（不活性化）PTEN の発現は、耐性細胞において著しく増加していた。すなわち、耐性細胞における Akt のリン酸化（活性化）の亢進は、Akt の活性化を抑制する PTEN のリン酸化亢進による不活性化によることが示唆された。

次年度においては、細胞回転を阻害することにより、細胞死受容体を介する刺激によるカスパーゼの活性化が抑制され、その結果として細胞死の誘導が障害されるかを検討する予定である。また、PI3 Kinase/Akt 経路と並んで細胞増殖／生存に重要な MEK/MAPK 経路に関しても検討を加える予定である。

（平成 19 年度研究成果）

抗 Fas 抗体刺激によりアポトーシス細胞死が誘導される白血病細胞株を用いて、細胞回転の休止の細胞死誘導への関与を検討した。Phobol Ester 処理により細胞回転を G1 早期に休止させることにより、抗 Fas 抗体刺激により誘導される細胞死、およびカスパーゼの活性化は著しく抑制された。この結果は、カスパーゼ-8 の活性化が G0/G1 期に、カスパーゼ-3 の活性化は G0/G1 期から early S 期にかけて誘導されるという結果（平成 17/18 年度実績）とよく一致していた。

さらに、PI3 Kinase/Akt 経路と並んで細胞増殖／生存に重要な MEK/MAPK 経路に関して、急性リンパ性白血病（ALL）細胞における役割について検討を加えた。MAPK のうち、JNK と p38 に関しては、解析した全ての ALL 細胞において活性化しており、細胞間の差異は認められなかった。これに対して、ERK1/2 の活性化は、B 細胞系 ALL、T 細胞 ALL とともに約 30%の細胞において活性化が認められた。さらに MEK1/2 活性化剤、

U0126 を用いて ERK1/2 活性を抑制することによる細胞増殖／細胞死への影響を検討した。その結果、ALL 細胞においては、U0126 添加により ERK1/2 活性は常に抑制されたが、細胞増殖が抑制される細胞群と、さらに細胞死が誘導される細胞の 2 群に分けられた。

細胞死誘導受容体を介したシグナル伝達系と PI3 Kinase/Akt 系(平成 18 年度実績)、あるいは MEK/MAPK 系(平成 19 年度実績)との関連性の検討は、複数のシグナル伝達系のクロストークによる細胞増殖・抑制の決定機構の解明に結びつく興味ある結果であると思われる。