

### 第3回 造血器腫瘍シンポジウム

【研究報告】

## UbemimexとIL-8によるAMLのapoptosis

財団法人癌研究会附属病院  
化学療法科

畠 清彦 先生

ベスタチンとIL-8による急性骨髄性白血病細胞のapoptosisについて話題を提供したいと思います。

私達はこれまでに、白血病細胞株HL-60の培養上清中にアポトーシスを誘導する可溶性因子の一つとして内皮細胞由来のインターロイキン8 (eIL-8)があるということを報告してまいりました。このeIL-8によるアポトーシス誘導作用を7種類の白血病細胞株に対して検討を行ったところ、急性前骨髄球性白血病由来の細胞株である、NB4だけがアポトーシス誘導に抵抗性を示しました。そこで、アミノペプチダーゼN (APN) というものがこのeIL-8の分解酵素の一つであるということが知られておりましたので、NB4はもしかするとこのAPNというCD13が強発現しているのではないかとということで検討しましたところ、非常に発現していることがわかりました。その後このCD13のAPN活性とeIL-8によるアポトーシス誘導作用の相関を各種APNのインヒビター、またはCD13の遺伝子導入株細胞を作成しまして、解析をいたしました。

まず、白血病細胞に対するeIL-8のアポトーシス誘導作用抵抗性の機構を解明して、CD13を強発現しているような急性骨髄性白血病で治療に抵抗性のあるようなものの治療に発展させられればよいかと考えております。

方法ですが、まず各種白血病由来の細胞株CD13の発現 (FACS) とAPN活性の定量を合成基質法を用いて行いました。次に抗CD13抗体、WM15というのがありますが、それと各種APNインヒビター、ベスタチンを含むものですが、APN活性の阻害作用の検討を行いました。また、eIL-8誘導アポトーシスの耐性白血病細胞株におけるAPNインヒビターの与える影響を検討いたしました。最後にCD13の遺伝子導入をした細胞株におきまして、このeIL-8によるアポトーシス誘導活性

に対して感受性がどのようになっているかという検討を行いました。

まず、ここに皆さんよくご存知の7種類の白血病由来の細胞株を提示いたしましたが、単球由来のIL-8はアポトーシスを誘導しませんが、eIL-8はアポトーシスを誘導します。た

図1 ヒト白血病細胞株に対するhrIL-8によるアポトーシス誘導効果

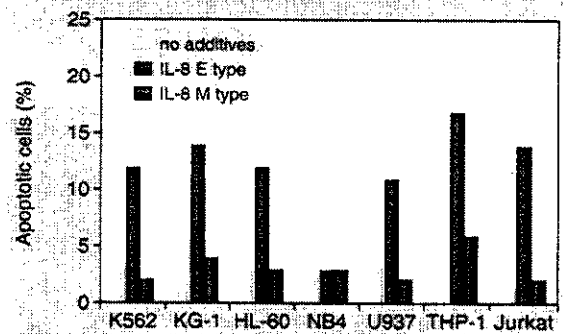
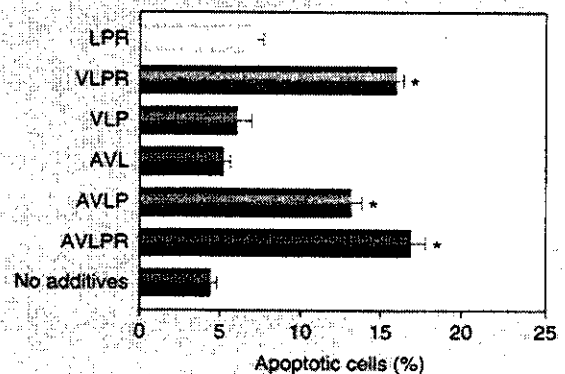


図2 内皮細胞IL-8N末端領域ペプチドのアポトーシス誘導効果



だ、この急性前骨髄球性白血病の由来細胞株でありますNB4という細胞は、このeタイプのIL-8を入れても細胞死が全く誘導されません。(図1)

なお、eIL-8は活性がございますが、単球由来のIL-8は活性がないということから、その両者の違いでありますN末端の5つのペプチド、これが5つのペプチド結合であります、この領域のペプチドに活性があると考えまして、合成ペプチドを作りまして活性があるかどうかを見ますと、5つ揃っていると最も活性がございまして、右端の1つ、もしくは左端の1つを削っても4つ揃ってれば活性があるということがわかりました。(図2)

ちなみに、CD13について簡単にレビューいたしますと、遺伝子は15番に存在しておりまして、広範囲にCD13の分子は

分布しております。主として肝臓や腎臓、小腸、胎盤等の絨毛に存在しておりまして、血液細胞では骨髄単球系の前駆細胞や、成熟した単球、好塩基球、好酸球、好中球にCD13が発現しております。作用はどういう作用があるかと申しますと、N末端の中性アミノ酸、アラニンとかフェニルアラニンなのですが、これを遊離する exopeptidase というように考えられておりまして、proline残基がありますとそこで切れなくなるような抵抗性があります。通常、活性を測るにはアラニンが入っている基質を用いることになっていると思います。皆さんご存知の阻害剤としては、EDTAとかそういうものもありますが、ご承知のようにベスタチンもその一つであります。生体内では血管作動性のペプチド、ブラジキニンとかアンギオテンシンなどを分解したり、神経系に働くようなエンケファ

図3 CD13の遺伝子構造と生化学

- ヒト遺伝子座:15q25-q28; サイズ:35kb
- mRNA 3.5kb; 20 exons
- Occurrence:広範囲に分布、主として肝臓、腎臓、絨毛、小腸絨毛、胎盤絨毛、骨髄単球系の前駆細胞、好中球、好塩基球、好酸球、好中球。末梢および骨髄中のT/NK球には発現しない。
- Action:好中球のN末端の中性アミノ酸 (Ala>Phe>Leu>Gly) を遊離する metalloexopeptidase proline 残基は抵抗性である。
- Routine substrate: Ala-pNA at pH7.0
- Inhibitors: o-phenanthroline, EDTA, amastatin, actinonin, probestatin, bestatin.
- Natural substrates: vasoactive peptides (lyso-bradykinin, angiotensin III), neuropeptide hormones (leu- and met-enkephalin, neurokinin A, somatostatin), cytosine and immunomodulating peptide (interleukin 8, tuftsin, thymopentin).

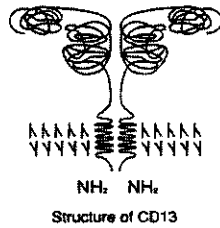


表1 内皮細胞IL-8によるアポトーシス誘導効果の検討

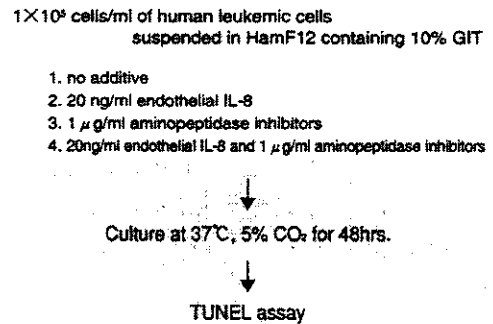


図4 各種ヒト白血病細胞株におけるCD13の発現

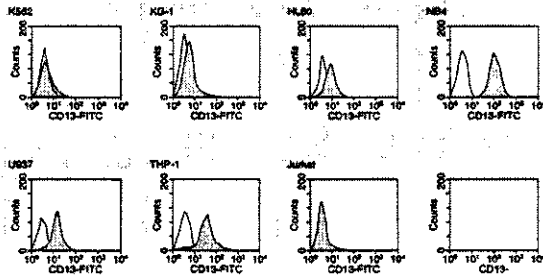


図6 各種aminopeptidase inhibitorのNB4における内皮細胞IL-8によるアポトーシス誘導に与える効果

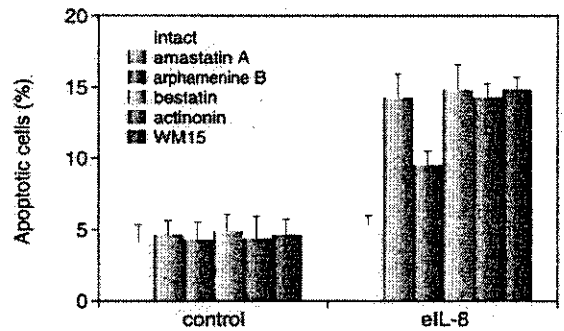


図5 各種aminopeptidase inhibitorのNB4に対するアミノペプチダーゼ活性抑制効果

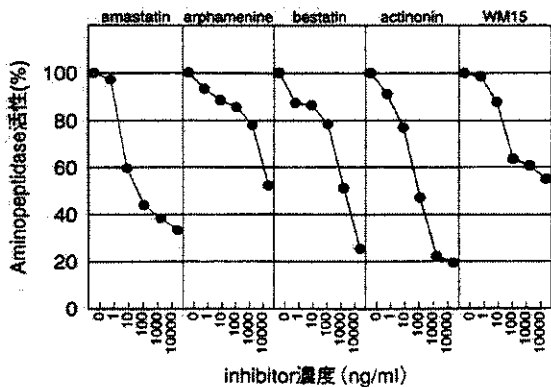
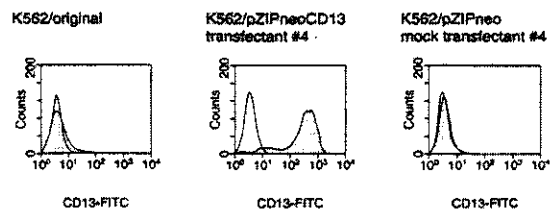


図7 CD13表面抗原の発現



リンとかニューロキニンなどを分解したりします。サイトカインに対しては、IL-8の分解に関係すると考えられております。(図3)

APNの活性の測定ですが、96穴のplateに細胞を入れてペプチドに基質のついたものを入れて、37度で1時間培養したあと、EDTAを入れて反応を停止させます。その後、吸光度計で測定しまして、ペプチダーゼ活性としました。

そのようにして測りますと、各種白血病細胞株の中では、この急性前骨髄球性白血病由来のNB4が、非常に高くなってあります。JurkatのようにT細胞系などは非常に低い活性となっています。これは先ほどお見せしましたCD13が発現した量と相関をしております。

またFACSを用いましてCD13の発現を見ますと、NB4ではこのように非常に強くCD13が発現しております。一方Jurkatでは全く発現をしておりません。(図4)

CD13に対する中和モノクローナル抗体WM15というのを用い、doseを振ってみますとAPN活性が抑制されます。NB4は非常に高いですが、中和抗体を投与しますと活性は低下します。

これは各種APNのインヒビターをNB4細胞に添加しまして、APN活性が抑制されているかというのを見たものです。ここに代表的にベスタチンを入れてありますが、dose dependentに活性が抑制されます。このWM15というのが中和抗体であります。(図5)

eIL-8について、アポトーシスの誘導効果があるかどうかを検討するため、 $1 \times 10^5$ のヒト白血病細胞を播きまして、HamF12というものを含んだ10%の培地に入れまして、陽性controlとして20ng/mLのeIL-8、APNのインヒビター $1 \mu\text{g/mL}$ 、もしくはその両者を添加した場合ということで、これらを48時間培養してTUNEL assayを行いました。(表1)

そうしますと、control群ではもちろんほとんど変わっておりませんが、eIL-8を添加してアポトーシスが行われた系では、WM15という中和抗体を入れますとアポトーシスがcontrolに比べて行くようになります。また、ベスタチンでも同じように行くことがわかりました。(図6)

次に、CD13の遺伝子導入をいたしました細胞株の作製に入りました。

CD13の高発現しているK562細胞をピックアップするためにコロニーでいくつかの細胞を取りますと、4番と6番というクローンにCD13の遺伝子がたくさん入っている事がわかりましたので、こういうトランスフェクタントした細胞をcontrolにして細胞株を培養いたしました。

そうしますと、K562をオリジナル細胞に対してCD13が遺

伝子導入された細胞ではCD13が高発現しております。右端はcontrolであります。(図7)

またこのCD13を高発現させた、K562細胞ではAPNの活性が高くなっており、これに各種抑制剤を入れるとdose dependentに抑制がかかることがわかります。(図8)

さらに、このCD13が遺伝子導入されたK562細胞にeIL-8を入れて誘導したアポトーシスに対する効果として各種のAPNインヒビターを入れますと左のカラムがcontrol、右のカラムがIL8を添加した系ですけれども、CD13が入っている系ではIL8だけではアポトーシスが全く行きませんが、そこにいくつかのペプチダーゼのインヒビターを入れますとアポトーシスが起るようになります。(図9)

以上まとめですが、各種細胞株におきましてCD13の抗原発現量とAPN活性にはほぼ相関が認められてきて、特に内皮細胞由来IL8のアポトーシス誘導作用に抵抗性である急性前骨髄球性白血病の由来細胞である。NB4細胞は強発現しておりました。また活性も高く示しておりました。次に、各種細胞株において、WM15という中和抗体を用いましたところ、APNの活性は抑制が認められました。ベスタチンを含む各種APNインヒビターの濃度依存性にNB4細胞では活性が抑制され、

図8 各種aminopeptidase inhibitorのCD13高発現K562細胞に対するアミノペプチダーゼ活性抑制効果

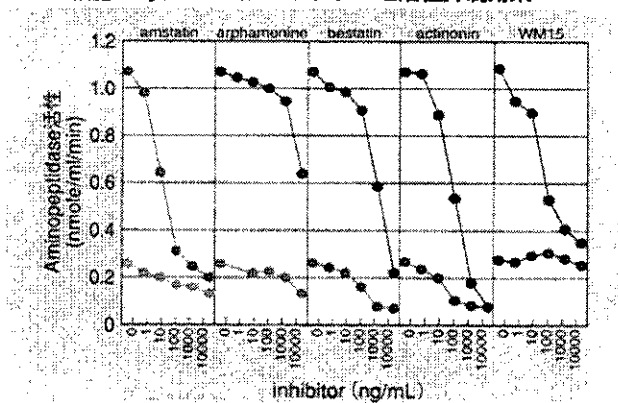
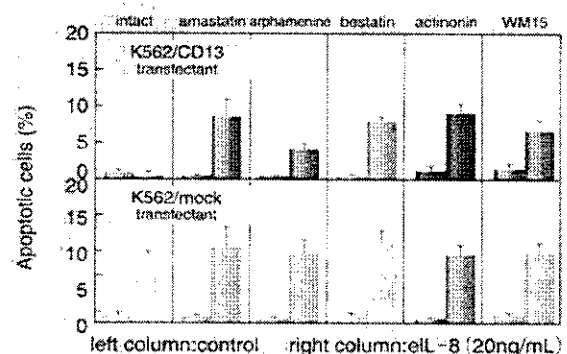


図9 各種aminopeptidase inhibitorのCD13高発現K562細胞における内皮細胞IL-8によるアポトーシス誘導に与える効果



さらに内皮細胞由来IL-8のアポトーシス誘導作用は、インヒビターで有意に促進されました。

最後に、CD13強発現を図りました遺伝子導入株のK562細胞では、APN活性は非常に高くなっておりませんが、これは各種APNインヒビターで濃度依存的に抑制されました。

この細胞はNB4の細胞と同じようにCD13が高発現しておりますので、内皮細胞由来のIL-8誘導性のアポトーシスに抵抗性でありまして、APNインヒビターで有意にアポトーシスが促進されることがわかりました。(表2)

表2 まとめ

1. 各種細胞株においてCD13抗原発現量とAPN活性にはほぼ相関がみられ、特に内皮細胞IL-8のアポトーシス誘導作用に抵抗性であるNB4細胞は強発現、高活性を示した。
2. 各種細胞株において抗CD13抗体(WM15)の濃度依存性にAPN活性の抑制がみられた。
3. 各種APNインヒビターの濃度依存性にNB4細胞のAPN活性が抑制された。さらに、内皮細胞IL-8のアポトーシス誘導作用はaminopeptidaseNのインヒビターで有意に促進された。
4. CD13強発現形質転換K562細胞のAPN活性は各種APNインヒビターの濃度依存性に抑制された。また、この形質転換細胞はNB4細胞と同様に内皮細胞IL-8誘導性アポトーシスに抵抗性であり、aminopeptidaseNのインヒビターで有意に促進された。

結語ですがCD13などのAPN活性の亢進が内皮細胞由来IL-8によって誘導されるアポトーシスの耐性機構の一つであることがわかりました。

また、ベスタチンなどのペプチダーゼ活性インヒビターを用いることが耐性機構を阻止する手段の一つであることが示されました。(表3)

最後にベスタチンを地固め療法に入れた急性骨髄性白血病の例を示します。この症例は、無事寛解を維持しております。この他にもう一例行っておりますが、安全に行われております。

以上のように生体内で起こる白血病細胞のアポトーシス耐性機構の一つとしてCD13があることがわかりました。CD13の活性を抑える物質の一つとしてベスタチンが治療法の中に入れられてもいいのではないかと考えられました。

表3 結語

CD13などのAPN活性の亢進がIL-8誘導性アポトーシス耐性機構のひとつである。

BestatinなどのAPN活性インヒビターは耐性機構を阻止する手段のひとつであることが示唆された。



抗悪性腫瘍剤 指定医薬品・要指示医薬品\*

**ベスタチン**®カプセル  
10・30

ウベニメクス製剤  
Bestatin Cap.

\*注意-医師等の処方せん・指示により使用すること。

資料請求先

 **日本化薬株式会社**  
東京都千代田区富士見一丁目11番2号

使用上の注意の改訂に  
十分ご留意ください。

'99.4作成

※ 効能・効果、用法・用量、使用上の注意などは、製品添付文書をご参照ください。

企画制作 日経メディカル開発  
東京都千代田区平河町2-7-1

BST-24 2000.11 03SA

20000137

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行物に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行物に関する一覧表」

**A case of bilateral heel ulcers associated with hydroxyurea therapy for chronic myelogenous leukemia.**

Tarumoto T, Imagawa S, Hotta T, Ohmine K, Nagai T, Takatoku M, Komatsu N, Hatake K, Ozawa K.

Jpn J Clin Oncol. 2000 Mar; 30(3) : 159-62.

**TUNEL 法.**

照井康仁, 畠清彦,

血液・腫瘍科. 40 (Suppl.3), 609-615, 2000

**DNA fragmentation assay 法.**

塩川大介, 田沼靖一.

血液・腫瘍科. 40 (Suppl.3), 616-622, 2000

**IL-4, but not vitamin D(3), induces monoblastic cell line UG3 to differentiate into multinucleated giant cells on osteoclast lineage.**

Kaji Y, Ikeda K, Ikeda T, Kawakami K, Sasaki K, Shindo M, Hatake K, Harada M, Motoyoshi K, Mori S, Norimatsu H, Takahara J.

J Cell Physiol. 2000 Feb;182(2):214-21.

**Phenotypic conversion of T-lineage lymphoblasts in the lymph node to myeloblasts in the bone marrow during relapse after allogeneic bone marrow transplantation.**

Matsumoto Y, Kawano C, Kametaka M, Otsuki T, Hatake K, Muroi K, Ozawa K.

Int J Hematol. 2000 Aug;72(2):253-4.

20000137

**IL-13 as well as IL-4 induces monocytes/macrophages and a monoblastic cell line (UG3) to differentiate into multinucleated giant cells in the presence of M-CSF.**

Ikeda T, Ikeda K, Sasaki K, Kawakami K, Hatake K, Kaji Y, Norimatsu H, Harada M, Takahara J.

Biochem Biophys Res Commun. 1998 Dec 18;253(2):265-72.

**Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells.**

Shimura M, Osawa Y, Yuo A, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y.

J Leukoc Biol. 2000 Jul;68(1):87-96.

**イダルビシンを用いて寛解導入療法を行った初発急性骨髄性白血病自験例 41 例の解析 特に t(8;21)を有する M2 の長期予後について**

松本裕子, 森政樹, 大月哲也, 室井一男, 畠清彦, 小松則夫, 小澤敬也  
臨床血液. 42 巻 1 号, 別刷, Page15-22(2001.01)

**A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb.**

Uwai M, Terui Y, Mishima Y, Tomizuka H, Ikeda M, Itoh T, Mori M, Ueda M, Inoue R, Yamada M, Hayasawa H, Horiuchi T, Niho Y, Matsumoto M, Ishizaka Y, Ikeda K, Ozawa K, Hatake K.

J Cell Physiol. 2000 Nov;185(2):280-92.

**(非特異的抗悪性腫瘍剤 その後の展開)ベスタチン  
畠清彦**

Biotherapy. 14 巻 9 号 Page887-895