

厚生科学研究研究費補助金
厚生科学特別研究事業

遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の
分化による血小板の生成の研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 島 清彦

平成13年度(2001)年3月

目 次

I . 総括研究報告

遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による

血小板の生成の研究

畠 清彦

----- 1

II . 分担研究報告

1 . 遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による

血小板の生成の研究

照井康仁

----- 5

2 . 遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による

血小板の生成の研究

森 政樹

----- 7

3 . 遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による

血小板の生成の研究

三嶋雄二

----- 9

III . 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 11

IV . 研究成果の刊行物・別刷

----- 13

総括研究報告書

遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による血小板の生成の研究

主任研究者 畠清彦 財団法人 癌研究会附属病院 化学療法科 部長

巨核球系白血病細胞株にトロンボポエチン受容体遺伝子を導入した株細胞を樹立したところ、形態的に突起に富んだ細胞に変化した。しかし血小板構造が形成されるには不十分であった。白血病細胞の分化後に細胞死をコントロールするための誘導については、内皮細胞由来インターロイキン8と β 2-ミクログロブリン、補体蛋白ファクター Bbが応用可能となる系であることを見出した。

照井康仁	自治医大・血液内科	講師
森 政樹	自治医大・血液内科	大学院生
三嶋雄二	癌研究会・臨床部	研究生

A. 研究目的

血小板は現在健康保険制度上、2万/mm³以下であるか、または出血傾向を呈している状態に輸血することが認められている。血小板産生を刺激するサイトカインの同定及び解析の結果、インターロイキン6、11、マクロファージコロニー刺激因子、トロンボポエチンがある。本研究では血小板の分化、機能を刺激する至適なサイトカインと巨核球への分化を誘導する遺伝子、転写因子GATAを用いて巨核球系白血病を分化させ、血小板の生成を計画する研究を行う。

B. 研究方法

HLA分子の発現していない白血病細胞株K562細胞を標的細胞とし、トロンボポエチン受容体遺伝子c-mplを導入した。トロンボポエチンに反応する細胞株を樹立した。また巨核球系白血病細胞で、トロンボポエチン受容体遺伝子c-mplを導入した。電顕で解析した。種々のサイトカインについてはさらに添加する種類を加えた

C. 研究結果

トロンボポエチン受容体遺伝子c-mplを導入した。トロンボポエチンに反応する細胞株を樹立した（論文投稿中）。血小板は出現していないが、アポトーシス、細胞の周期や分化、核数を制御する遺

伝子やサイトカインを解析した。細胞の分化と多核化する遺伝子のひとつとして、ヒトHuman Immunodeficiency Virus由来蛋白の遺伝子Vprによる制御を研究した。白血病細胞は遺伝子導入により分化し、多核化した。血小板は出現しなかった。骨髄系への分化は促進するものの、巨核球系への分化や細胞の多核化したあとの変化は認められなかった。K562, TF-1細胞を標的として、血小板の構造物の産生、抗原性の有無について検討した。いくらか改善が認められて、突起物が出現したものの、血小板そのものは出現させられなかった。分化の方向の決定にCalmodulin-dependent kinase IVが重要である事を示した（投稿中）。遺伝子導入した細胞を移植、投与することを考えると、移植または投与後の白血病細胞や遺伝子導入した細胞の細胞死を制御することが重要であり、アポトーシスの制御する機構を研究した。

D. 考察

mpl遺伝子を導入して、いくつかの株細胞の形態変化を検討した。mpl導入株細胞は突起に富んでおり、興味深い。またHLAに関係なく白血病細胞のアポトーシスを誘導する因子として β 2-ミクログロブリン、さらに補体蛋白ファクター Bbを同定し、作用機序を検討した。細胞死の誘導に有用である。

E. 結論

これまでの遺伝子導入またはサイトカインだけでは血小板または血小板構造物は出現できていない。最近神経細胞の突起を延長させるサイトカインが発見されたので、ヒトではK562, TF-1細胞の

うち *mpl* 遺伝子導入株細胞を標的として、抗原性の有無について検討する必要がある。細胞死の制御については多くの知見が得られた。

F. 健康危険情報
特にありません

G. 論文発表

1. 論文発表

Miyazato A, Ueno S, Nakamura Y, Yoshida K, Kaneko T, Tanaka T, Ohya K-I, Omine K, Mori M, Kirito K, Tushima M, Yamanaka T, Ikeda U, Shimada K, Nakamura Y, Hatake K, Furusawa S, Ozawa K, Mano H. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by Background-matched population(BAMP) screening. *Blood*, 2001. 印刷中。
Mori M, Terui Y, Tanaka M, Tomizuka H, Mishima Y, Ikeda M, Kasahara T, Uwai M, Ueda M, Inoue R, Itoh T, Yamada M, Hayasawa H, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ozawa K, Hatake K. Anti-tumor effect of b2-microglobulin in leukemic cells-bearing mice via apoptosis-inducing activity: Activation of caspase-3 and NF-kB. *Cancer Res*. 2001, 印刷中。

Yuji Mishima Y, Yasuhito Terui Y, Hiroshi Tomizuka H, Masaki Mori M, Masaya Uwai M, Masuzu Ueda M, Miyuki Tanaka M, Muneo Yamada M, Hirotohi Hayasawa H, Keiyo Ozawa K, Noboru Horikoshi N, Hatake K. CD13/aminopeptidase-N is resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis. *ICCAS supplement*, 2001. 印刷中。

Mori M, Hatake K, Ozawa K. CAM.-cytarabine, aclarubicin plus macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia with trilineage dysplasia: Usefulness of in vitro apoptosis in leukaemic cells. *Leukemia and Lymphoma*. 2001, 印刷中。

Watanabe J-I, Kondo H, Iwazaki H, Hatake K, Horikoshi N. An unusual association of monoclonal gammopathy, paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and myelodysplastic syndrome transformed into acute myeloid leukaemia: coexistence of triple clonal disorders *Leukemia and Lymphoma*. 2001, 印刷中。

Watanabe J, Kondo H and Hatake K. Autologous Stem Cell Transplantations for Recurrent Adult T Cell Leukaemia/lymphoma Using Highly Purified CD34+ Cells Derived from Cryopreserved Peripheral Blood Stem Cell. *Leukemia and Lymphoma*. 2001, 印刷中。

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。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。臨床血液。42: 15-22, 2001。

Ichida M, Imagawa S, Ohmine K, Komatsu N, Hatake K, Ozawa K, Miura Y. Successful treatment of multiple myeloma-associated amyloidosis by interferon- α , dimethyl sulfoxide, and VAD(Vincristine, adriamycin, and dexamethasone) *Int J hematol*. 72:491-493, 2000。

Matsumoto Y, Kawano C, Kametaka M, Otsuki T, Hatake K,

Muroi K, Ozawa K. Phenotypic conversion of T-lineage lymphoblasts in the lymph node to myeloblasts in the bone marrow during relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 2000 Aug;72(2):253-4.

Muroi K, Tarumoto T, Akioka T, Kirito K, Nagai T, Izumi T, Nakamura M, Hatake K, Hakomori S, Miura Y, Ozawa K. Sialyl-Tn- and neuron-specific enolase-positive minimally differentiated erythroleukemia. *Intern Med*. 2000 Oct;39(10): 843-6.

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. A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. *J Cell Physiol*. 2000 Nov;185(2):280-92.

Tabata M, Imagawa S, Tarumoto T, Ohmine K, Hatake K, Miura Y, Ozawa K. Essential thrombocythemia transformed to acute myelogenous leukemia with t(3;17)(p24; q12), del(5)(q13q34) after treatment with carboquone and hydroxyurea. *Jpn J Clin Oncol*. 2000 Jul;30(7):310-2.

Miyawaki S, Tanimoto M, Kobayashi T, Minami S, Tamura J, Omoto E, Kuriyama K, Hatake K, Saito K, Ohno R. [Effect of etoposide added to individualized induction therapy of adult acute myeloid leukemia--the JALSG-AML-92 Study. Japan Adult Leukemia Study Group]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2000 Jul;27(8):1160-7.

Tarumoto T, Imagawa S, Ohmine K, Mano A, Nagai T, Takatoku M, Muroi K, Hatake K, Ozawa K. A de novo philadelphia chromosome-positive acute mixed-lineage leukemia with both major and minor BCR/ABL mRNA transcripts. *Am J Hematol*. 2000 Sep;65(1):72-4.

Shimura M, Osawa Y, Yuo A, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y. Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells. *J Leukoc Biol*. 2000 Jul;68(1):87-96.

Yamada M, Suzu S, Tanaka-Douzono M, Wakimoto N, Hatake K, Hayasawa H, Motoyoshi K. Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells. *J Cell Physiol*. 2000 Sep;184(3):351-5.

Tarumoto T, Imagawa S, Hotta T, Ohmine K, Nagai T, Takatoku M, Komatsu N, Hatake K, Ozawa K. A case of bilateral heel ulcers associated with hydroxyurea therapy for chronic myelogenous leukemia. *Jpn J Clin Oncol* 2000 Mar; 30(3):159-62.

Yano L, Shimura M, Taniguchi M, Hayashi Y, Suzuki T, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y. Improved gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. *Hum Gene Ther*. 2000 ;11:995-1004.

大嶺健、和泉透、室井一男、清水律子、今川重彦、小松則夫、佐々木龍平、畠清彦、小澤敬也。特発性血小板減少性紫斑病に対する低用量プレドニゾロン療法。臨床血液。41:8-11, 2000。

2. 学会発表
特にありません。

H. 知的財産権の出願。登録状況

1. 特許取得
特にありません。
2. 実用新案登録
特にありません。
3. その他
特にありません。

分担研究報告書

遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による血小板の生成の研究

分担研究者 照井康仁 自治医大・血液内科 講師

巨核球系白血病細胞株にトロンボポエチン受容体遺伝子を導入した株細胞を樹立したところ、形態的に突起に富んだ細胞に変化した。しかし血小板構造が形成されるには不十分であった。白血病細胞の分化後に細胞死をコントロールするための誘導については、内皮細胞由来インターロイキン8と β 2-ミクログロブリン、補体蛋白ファクターBbが応用可能となる系であることを見出した。

A. 研究目的

血小板は現在健康保険制度上、2万/mm³以下であるか、または出血傾向を呈している状態に輸血することが認められている。血小板産生を刺激するサイトカインの同定及び解析の結果、インターロイキン6、11、マクロファージコロニー刺激因子、トロンボポエチンがある。本研究では血小板の分化、機能を刺激する至適なサイトカインと巨核球への分化を誘導する遺伝子、転写因子GATAを用いて巨核球系白血病を分化させ、血小板の生成を計画する研究を行う。これにより緊急時や災害時に血小板製剤の要求に答えられる可能性を作る。

B. 研究方法

本研究では血小板の分化、機能を刺激する至適なサイトカインと巨核球への分化を誘導する遺伝子、転写因子GATAを用いて巨核球系白血病を分化させ、血小板の生成を計画する研究を行う。緊急に出血傾向を伴う患者さんの手術に対して出血の防止に作用できるものを開発する。凝固を補助できれば緊急時に血小板が入手できなくても出血傾向に対応できる可能性がある。HLA型は血小板輸血の際に抗体出現を促進し、反復して輸血する際の最も大きな弊害の一つである。そこでHLA分子の発現していない白血病細胞株K562細胞を標的細胞とし、トロンボポエチン受容体遺伝子c-mplを導入した。トロンボポエチンに反応する細胞株を樹立

した（論文投稿中）。血小板は出現していないが、血小板様構造物の出現が認められた。転写因子GATAとbcl-XL,mpl遺伝子を用いて巨核球系に分化することを制御し、分化した白血病株細胞または正常細胞から血小板様物質が最も多く出現する条件を検討した。しかし血小板そのものは出現していない。特にmpl遺伝子を導入して、いくつかの株細胞の形態変化を検討した。mpl導入株細胞は細胞表面の突起に富んでおり、興味深い。またHLAに関係なく白血病細胞のアポトーシスを誘導する因子として β 2-ミクログロブリンを同定し、作用機序を検討した。試験管内での細胞死の誘導に有用である。最近さらに神経細胞の突起を延長させるサイトカインが発見されたので、ヒトではK562, TF-1細胞を標的として、血小板の構造物の産生、抗原性の有無について検討した。いくらか改善が認められて、突起物が出現したものの、血小板そのものは出現させられなかった。

C. 結果、D. 考察

血小板輸血は、できるだけ節約し、輸血による副作用の発現を最小限におさえ、成分輸血のドナーの見つからないまれな血液型やHLAタイプの患者さんにも投与できるものが必要である。血小板輸血は癌化学療法後の血小板減少や再生不良性貧血での血小板減少時には必須のものである事は言うまでもないが、HLA型に対する血小板抗体の出現や高価である事を考えると、節約をし、ヒト由来の血小板製剤の使用を最低限に抑制すべきである。そのためには基礎的研究としてまず現在入手可能なサイトカインや種々の薬剤により血小板機能が亢進する事や受容体の存在する事の意義と作用機序を理解した上で、止血機能を保持した血小

板、巨核球系白血病から遺伝子導入とサイトカインにより血小板又は血小板に近いものが分化、機能できれば緊急の出血状態に対処できるものとなる。血小板減少と言っても、血小板ではなくても機能を有するものが一時的に機能が保持されれば危険は脱することができる。そのために血小板に近いものを株細胞から遺伝子導入の操作により分化させて作成することを目的とする。

(期待される成果)特に緊急災害時や出血をもたらす感染性疾患の流行時に対処する血小板製剤の代替物として期待できる。最近適応が拡大されたために対象患者の増加している末梢血幹細胞移植や臍帯血幹細胞移植では血小板数の回復に日数を要するため、この回復を促進するためにもこの研究は応用可能である。また一般薬として販売されているH₂ブロッカー(消化性潰瘍剤)の副作用や、抗腫瘍剤として用いられているプラチナ製剤の副作用としても血小板減少が重篤であり、これらの副作用による出血などの対策も可能となる。

平成11年度は、細胞の分化と多核化する遺伝子のひとつとして、ヒト Human Immunodeficiency Virus 由来蛋白の遺伝子 Vpr による制御を研究した。白血病細胞は遺伝子導入により分化し、多核化した。血小板は出現しなかった。骨髄系への分化は促進するものの、巨核球系への分化や細胞の多核化したあとの変化は認められなかった。また白血病細胞を分化させたものをヒトに投与したり、遺伝子導入した細胞を移植、投与することを考えると、移植または投与後の白血病細胞や遺伝子導入した細胞の細胞死を制御することが重要であり、アポトーシスの制御する機構を研究した。内皮細胞由来インターロイキン8の構造のうち、N末端アミノ酸配列の5ペプチドにより白血病細胞の細胞死を誘導できることがわかり、応用性が高いと考えられる。ヒトHLA遺伝子の制御機構を検討するために、HLA抗原に対する抗体を用いて細胞増殖に対する研究を行い、β₂-ミクログロブリンが新しい細胞死を誘導する因子のひとつとして、同定し、報告した。また体外で白血病細胞を細胞死誘導する生理的蛋白として、補体因子Bbが精製され、報告した(印刷中)。また投稿中であるが、トロンボポエチンに反応し、巨核球系マーカーも有する株細胞を樹立したので、活性化された時の電顕像を試みた。G-CSFにより活性化される遺伝子についても報告した(投稿中)。calmodulin-dependent kinase IVが分化によってdown-regulationされることがわかった。mpl遺伝子を導入して、いくつかの株細胞の形態変化を検討

した。mpl導入株細胞は突起に富んでおり、興味深い。またHLAに関係なく白血病細胞のアポトーシスを誘導する因子としてβ₂-ミクログロブリンを同定し、作用機序を検討した。さらに補体蛋白因子Bbも同定した。体外での応用が可能な分子のひとつである。細胞死の誘導に有用である。現在留学し、さらに転写因子PMLと、白血病のアポトーシスとの研究を行っている。

E. 結論

これまでの遺伝子導入またはサイトカインだけでは血小板または血小板構造物は出現できていない。最近神経細胞の突起を延長させるサイトカインが発見されたので、ヒトではK562, TF-1細胞のうちmpl遺伝子導入株細胞を標的として、抗原性の有無について検討した。かなり長い突起が出現したものの、血小板とはなっていない。細胞死の制御については多くの知見が得られた。体外での細胞処理についての知見が見い出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mori M, Terui Y, Tanaka M, Tomizuka H, Mishima Y, Ikeda M, Kasahara T, Uwai M, Ueda M, Inoue R, Itoh T, Yamada M, Hayasawa H, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ozawa K, Hatake K. Anti-tumor effect of b₂-microglobulin in leukemic cells-bearing mice via apoptosis-inducing activity: Activation of caspase-3 and NF-κB. *Cancer Res.* 2001, 印刷中。

Yuji Mishima Y, Yasuhiro Terui Y, Hiroshi Tomizuka H, Masaki Mori M, Masaya Uwai M, Masuzu Ueda M, Miyuki Tanaka M, Muneo Yamada M, Hirotohi Hayasawa H, Keiya Ozawa K, Noboru Horikoshi N, Hatake K. CD13/aminopeptidase-N is resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis. *ICCAS supplement*, 2001. 印刷中。

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. A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. *J Cell Physiol.* 2000 Nov;185(2):280-92. Hatake K, Terui Y, Tomizuka H, Uwai M, Mori M, Mishima Y. Apoptosis in leukemic cells: basic and clinical aspects. *Current Topics in Biochem Res.* 1: 179-191, 1999.

照井康仁、島清彦. TUNEL法. *血液腫瘍科.* 40: 609-615, 2000.

分担研究報告書

遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による血小板の生成の研究

分担研究者 森 政樹 自治医大・血液内科 大学院生

巨核球系白血病細胞株にトロンボポエチン受容体遺伝子を導入した株細胞を樹立したところ、形態的に突起に富んだ細胞に変化した。しかし血小板構造が形成されるには不十分であった。白血病細胞の分化後に細胞死をコントロールするための誘導については、内皮細胞由来インターロイキン8と β 2-ミクログロブリン、補体蛋白ファクターBbが応用可能となる系であることを見出した。

A. 研究目的

血小板は現在健康保険制度上、2万/mm³以下であるか、または出血傾向を呈している状態に輸血することが認められている。血小板産生を刺激するサイトカインの同定及び解析の結果、インターロイキン6、11、マクロファージコロニー刺激因子、トロンボポエチンがある。本研究では血小板の分化、機能を刺激する至適なサイトカインと巨核球への分化を誘導する遺伝子、転写因子GATAを用いて巨核球系白血病を分化させ、血小板の生成を計画する研究を行う。これにより緊急時や災害時に血小板製剤の要求に答えられる可能性を作る。さらに白血病細胞の体外での細胞死を調節する。

B. 研究方法

本研究では血小板の分化、機能を刺激する至適なサイトカインと巨核球への分化を誘導する遺伝子、転写因子GATAを用いて巨核球系白血病を分化させ、血小板の生成を計画する研究を行う。緊急に出血傾向を伴う患者さんの手術に対して出血の防止に作用できるものを開発する。凝固を補助できれば緊急時に血小板が入手できなくても出血傾向に対応できる可能性がある。HLA型は血小板輸血の際に抗体出現を促進し、反復して輸血する際の最も大きな弊害の一つである。そこでHLA分子の発現していない白血病細胞株K562細胞を標的細胞とし、トロンボポエチン受容体遺伝子c-mplを導入

した。トロンボポエチンに反応する細胞株を樹立した（論文投稿中）。血小板は出現していないが、血小板様構造物の出現が認められた。bcl-XL,mpl遺伝子を用いて巨核球系に分化することを制御し、分化した白血病株細胞または正常細胞から血小板様物質が最も多く出現する条件を検討した。しかし血小板そのものは出現していない。特にmpl遺伝子を導入して、いくつかの株細胞の形態変化を検討した。mpl導入株細胞は細胞表面の突起に富んでおり、興味深い。またHLAに関係なく白血病細胞のアポトーシスを誘導する因子として β 2-ミクログロブリンを同定し、作用機序を検討した。試験管内での細胞死の誘導に有用である。最近さらに神経細胞の突起を延長させるサイトカインが発見されたので、ヒトではK562, TF-1細胞を標的として、血小板の構造物の産生、抗原性の有無について検討した。いくらか改善が認められて、突起物が出現したものの、血小板そのものは出現させられなかった。

C. 研究結果 ,D. 考察

血小板輸血は、できるだけ節約し、輸血による副作用の発現を最小限におさえ、成分輸血のドナーの見つからないまれな血液型やHLAタイプの患者さんにも投与できるものが必要である。血小板輸血は癌化学療法後の血小板減少や再生不良性貧血での血小板減少時には必須のものである事は言うまでもないが、HLA型に対する血小板抗体の出現や高価である事を考えると、節約をし、ヒト由来の血小板製剤の使用を最低限に抑制すべきである。そのためには基礎的研究としてまず現在入手可能なサイトカインや種々の薬剤により血小板機能が亢進する事や受容体の存在する事の意義と作用機序を理解した上で、止血機能を保持した血小

板、巨核球系白血病から遺伝子導入とサイトカインにより血小板又は血小板に近いものが分化、機能できれば緊急の出血状態に対処できるものとなる。血小板減少と言っても、血小板ではなくても機能を有するものが一時的に機能が保持されれば危険は脱することができる。そのために血小板に近いものを株細胞から遺伝子導入の操作により分化させて作成することを目的とする。

(期待される成果) 特に緊急災害時や出血をもたらす感染性疾患の流行時に対処する血小板製剤の代替物として期待できる。最近適応が拡大されたために対象患者の増加している末梢血幹細胞移植や臍帯血幹細胞移植では血小板数の回復に日数を要するため、この回復を促進するためにもこの研究は応用可能である。また一般薬として販売されているH₂ブロッカー(消化性潰瘍剤)の副作用や、抗腫瘍剤として用いられているプラチナ製剤の副作用としても血小板減少が重篤であり、これらの副作用による出血などの対策も可能となる。

白血病細胞は遺伝子導入により分化し、多核化した。血小板は出現しなかった。骨髄系への分化は促進するものの、巨核球系への分化や細胞の多核化したあとの変化は認められなかった。また白血病細胞を分化させたものをヒトに投与したり、遺伝子導入した細胞を移植、投与することを考えると、移植または投与後の白血病細胞や遺伝子導入した細胞の細胞死を制御することが重要であり、アポトーシスの制御する機構を研究した。ヒトHLA遺伝子の制御機構を検討するために、HLA抗原に対する抗体を用いて細胞増殖に対する研究を行い、β₂-ミクログロブリンが新しい細胞死を誘導する因子のひとつとして、同定し、報告した。mpl遺伝子を導入して、いくつかの株細胞の形態変化を検討した。mpl導入株細胞は突起に富んでおり、興味深い。またHLAに関係なく白血病細胞のアポトーシスを誘導する因子としてβ₂-ミクログロブリンを同定し、作用機序を検討した。体外での応用が可能分子のひとつである。細胞死の誘導に有用である。特にβ₂-ミクログロブリンの生体での抗腫瘍効果について大きな役割を果たしている事を見出した。

E. 結論

これまでの遺伝子導入またはサイトカインだけでは血小板または血小板構造物は出現できていない。最近神経細胞の突起を延長させるサイトカインが発見されたので、ヒトではK562, TF-1細胞のうちmpl遺伝子導入株細胞を標的として、抗原性の有無

について検討した。かなり長い突起が出現したものの、血小板とはなっていない。細胞死の制御については多くの知見が得られた。体外での細胞処理についての知見が、β₂-ミクログロブリンについて見い出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yuji Mishima Y, Yasuhito Terui Y, Hiroshi Tomizuka H, Masaki Mori M, Masaya Uwai M, Masuzu Ueda M, Miyuki Tanaka M, Muneo Yamada M, Hirotohi Hayasawa H, Keiya Ozawa K, Noboru Horikoshi N, Hatake K. CD13/aminopeptidase-N is resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis. ICCAS supplement, 2001. 印刷中.

Miyazato A, Ueno S, Nakamura Y, Yoshida K, Kaneko T, Tanaka T, Ohya K-I, Omine K, Mori M, Kirito K, Tushima M, Yamanaka T, Ikeda U, Shimada K, Nakamura Y, Hatake K, Furusawa S, Ozawa K, Mano H. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by Background-matched population(BAMP) screening. Blood, 2001. 印刷中.

Mori M, Terui Y, Tanaka M, Tomizuka H, Mishima Y, Ikeda M, Kasahara T, Uwai M, Ueda M, Inoue R, Itoh T, Yamada M, Hayasawa H, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ozawa K, Hatake K. Anti-tumor effect of b₂-microglobulin in leukemic cells-bearing mice via apoptosis-inducing activity: Activation of caspase-3 and NF-κB. Cancer Res. 2001, 印刷中.

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. A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. J Cell Physiol. 2000 Nov;185(2):280-92. 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。イダルピ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。臨床血液。42:15-22,2001.

分担研究報告書

遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の分化による血小板の生成の研究

分担研究者 三嶋雄二 財団法人癌研究会 癌化学療法センター臨床部 研究生

巨核球系白血病細胞株にトロンボポエチン受容体遺伝子を導入した株細胞を樹立したところ、形態的に突起に富んだ細胞に変化した。しかし血小板構造が形成されるには不十分であった。白血病細胞の分化後に細胞死をコントロールするための誘導については、内皮細胞由来インターロイキン8と $\beta 2$ -ミクログロブリン、補体蛋白ファクターBbが応用可能となる系であることを見出した。

A. 研究目的

血小板は現在健康保険制度上、2万/mm³以下であるか、または出血傾向を呈している状態に輸血することが認められている。血小板産生を刺激するサイトカインの同定及び解析の結果、インターロイキン6、11、マクロファージコロニー刺激因子、トロンボポエチンがある。本研究では血小板の分化、機能を刺激する至適なサイトカインと巨核球への分化を誘導する遺伝子、転写因子GATAを用いて巨核球系白血病を分化させ、血小板の生成を計画する研究を行う。これにより緊急時や災害時に血小板製剤の要求に答えられる可能性を作る。

B. 研究方法

本研究では血小板の分化、機能を刺激する至適なサイトカインと巨核球への分化を誘導する遺伝子、転写因子GATAを用いて巨核球系白血病を分化させ、血小板の生成を計画する研究を行う。緊急に出血傾向を伴う患者さんの手術に対して出血の防止に作用できるものを開発する。凝固を補助できれば緊急時に血小板が入手できなくても出血傾向に対応できる可能性がある。HLA型は血小板輸血の際に抗体出現を促進し、反復して輸血する際の最も大きな弊害の一つである。そこでHLA分子の発現していない白血病細胞株K562細胞を標的細胞とし、トロンボポエチン受容体遺伝子c-mplを導入した。トロンボポエチンに反応する細胞株を樹立

した（論文投稿中）。血小板は出現していないが、血小板様構造物の出現が認められた。転写因子GATAとbcl-XL,mpl遺伝子を用いて巨核球系に分化することを制御し、分化した白血病株細胞または正常細胞から血小板様物質が最も多く出現する条件を検討した。しかし血小板そのものは出現していない。特にmpl遺伝子を導入して、いくつかの株細胞の形態変化を検討した。mpl導入株細胞は細胞表面の突起に富んでおり、興味深い。またHLAに関係なく白血病細胞のアポトーシスを誘導する因子として $\beta 2$ -ミクログロブリンを同定し、作用機序を検討した。試験管内での細胞死の誘導に有用である。最近さらに神経細胞の突起を延長させるサイトカインが発見されたので、ヒトではK562, TF-1細胞を標的として、血小板の構造物の産生、抗原性の有無について検討した。いくらか改善が認められて、突起物が出現したものの、血小板そのものは出現させられなかった。

C. 結果、D. 考察

基礎的研究としてまず現在入手可能なサイトカインや種々の薬剤により血小板機能が亢進する事や受容体の存在する事の意義と作用機序を理解した上で、止血機能を保持した血小板、巨核球系白血病から遺伝子導入とサイトカインにより血小板又は血小板に近いものが分化、機能できれば緊急の出血状態に対処できるものとなる。血小板減少と言っても、血小板ではなくても機能を有するものが一時的に機能が保持されれば危険は脱することができる。そのために血小板に近いものを株細胞から遺伝子導入の操作により分化させて作成することを目的とする。

（期待される成果）特に緊急災害時や出血をもた

らす感染性疾患の流行時に対処する血小板製剤の代替物として期待できる。最近適応が拡大されたために対象患者の増加している末梢血幹細胞移植や臍帯血幹細胞移植では血小板数の回復に日数を要するため、この回復を促進するためにもこの研究は応用可能である。また一般薬として販売されているH₂ブロッカー（消化性潰瘍剤）の副作用や、抗腫瘍剤として用いられているプラチナ製剤の副作用としても血小板減少が重篤であり、これらの副作用による出血などの対策も可能となる。平成12年度は、細胞の分化と多核化する遺伝子のひとつとして、ヒト Human Immunodeficiency Virus 由来蛋白の遺伝子 Vpr による制御を研究した。白血病細胞は遺伝子導入により分化し、多核化した。血小板は出現しなかった。骨髄系への分化は促進するものの、巨核球系への分化や細胞の多核化したあとの変化は認められなかった。また白血病細胞を分化させたものをヒトに投与したり、遺伝子導入した細胞を移植、投与することを考えると、移植または投与後の白血病細胞や遺伝子導入した細胞の細胞死を制御することが重要であり、アポトーシスの制御する機構を研究した。内皮細胞由来インターロイキン8の構造のうち、N末端アミノ酸配列の5ペプチドにより白血病細胞の細胞死を誘導できることがわかり、応用性が高いと考えられる。ヒトHLA遺伝子の制御機構を検討するために、HLA抗原に対する抗体を用いて細胞増殖に対する研究を行い、 β -2-ミクログロブリンが新しい細胞死を誘導する因子のひとつとして、同定し、報告した。また体外で白血病細胞を細胞死誘導する生理的蛋白として、補体ファクターBbが精製され、報告した（印刷中）。また投稿中であるが、トロンボポエチンに反応し、巨核球系マーカーも有する株細胞を樹立したので、活性化された時の電顕像を試みた。G-CSFにより活性化される遺伝子についても報告した（投稿中）。calmodulin-dependent kinase IVが分化によってdown-regulationされることがわかった。mpl遺伝子を導入して、いくつかの株細胞の形態変化を検討した。mpl導入株細胞は突起に富んでおり、興味深い。またHLAに関係なく白血病細胞のアポトーシスを誘導する因子として β 2-ミクログロブリンを同定し、作用機序を検討した。さらに補体蛋白ファクターBbも同定した。体外での応用が可能な分子のひとつである。

E. 結論

これまでの遺伝子導入またはサイトカインだけでは血小板または血小板構造物は出現できていない。かなり長い突起が出現したものの、血小板とはなっていない。細胞死の制御については多くの知見が得られた。体外での細胞処理についての知見が見い出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mishima Y, Terui Y, Tomizuka H, Mori M, Uwai M, Ueda M, Tanaka M, Yamada M, Hayasawa H, Ozawa K, Horikoshi N, and Hatake K. CD13/aminopeptidase-N is resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis ICCSA supplement, 2001. 印刷中。

Mori M, Terui Y, Tanaka M, Tomizuka H, Mishima Y, Ikeda M, Kasahara T, Uwai M, Ueda M, Inoue R, Itoh T, Yamada M, Hayasawa H, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ozawa K, Hatake K. Anti-tumor effect of β 2-microglobulin in leukemic cells-bearing mice via apoptosis-inducing activity: Activation of caspase-3 and NF-kB. *Cancer Res* 2001 Jun 1;61(11):4414-7.

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. A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. *J Cell Physiol*. 2000 Nov;185(2):280-92.

Terui Y, Tomizuka H, Mishima Y, Ikeda M, Kasahara T, Uwai M, Mori M, Itoh T, Tanaka M, Yamada M, Shimamura S, Ishizaka Y, Ozawa K, Hatake K. NH2-terminal pentapeptide of endothelial interleukin 8 is responsible for the induction of apoptosis in leukemic cells and has an antitumor effect in vivo. *Cancer Res*. 1999 Nov 15;59(22):5651-5.

Mori M, Terui Y, Ikeda M, Tomizuka H, Uwai M, Kasahara T, Kubota N, Itoh T, Mishima Y, Douzono-Tanaka M, Yamada M, Shimamura S, Kikuchi J, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ikeda K, Mano H, Ozawa K, Hatake K. Beta(2)-microglobulin identified as an apoptosis-inducing factor and its characterization. *Blood*. 1999 Oct 15;94(8):2744-53.

Suzu S, Hatake K, Ota J, Mishima Y, Yamada M, Shimamura S, Kimura F, Motoyoshi K. Identification of alternatively spliced transcripts encoding murine macrophage colony-stimulating factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 7;245(1):120-6.

G.研究成果による特許権等の知的財産権の出願登録状況

特にありません。

厚生科学研究費補助金総合研究報告書

厚生省収医薬 第 1158 号

平成 13 年 4 月 10 日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

所在地 〒170-8455 東京都豊島区上池袋 1-37-1

フリガナ ザイダンホウジン ガンケンキョウカイフソクビョウイン

法人名 財団法人 癌研究会付属病院

フリガナ オガタ エツロウ

代表者名 (職名) 尾形 悦郎 (院長)



平成 12 年度から実施した厚生省科学研究費補助金 (高度先端医療 研究事業) に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

遺伝子導入とサイトカインによる巨核球系白血病の

研究課題名 (課題番号) : 分化による血小板の生成の研究 (H10-血液-002)

国庫補助金精算所要額 : 金 14,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総合研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総合研究報告書 (別添2のとおり)
3. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by Background-matched population (BAMP) screening. Blood, 2001. 印刷中。	2001 年印刷中		Miyazato A,
Anti-tumor effect of b2-microglobulin in leukemic cells-bearing mice via apoptosis-inducing activity: Activation of caspase-3 and NF-kB. Cancer Res. 2001, 印刷中。	2001 年印刷中		Mori M,
CD13/aminopeptidase-N is resistance mechanism for endothelial Interleukin-8 inducing apoptosis ICCAS supplement, 2001. 印刷中。	2001 年印刷中		Yuji Mishima Y,
CAM.-cytarabine, aclarubicin plus macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukaemia with trilineage dysplasia: Usefulness of in vitro apoptosis in leukaemic cells. Leukemia and Lymphoma. 2001, 印刷中。	2001 年印刷中		Mori M,
An unusual association of monoclonal gammopathy, paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and myelodysplastic syndrome transformed into acute myeloid leukaemia: coexistence of triple clonal disorders Leukemia and Lymphoma. 2001, 印刷中。	2001 年印刷中		Watanabe J-I,
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 4 1 例の解析: 特にt(8;21)を有するM2の長期予後について。臨床血液。42:15-22,2001。	2001 年 1 月		松本裕子
Successful treatment of multiple myeloma-associated amyloidosis by interferon-a, dimethyl sulfoxide, and VAD(Vincristine, adriamycin, and dexamethasone) Int J hematol. 72:491-493, 2000.	2000 年		Ichida M,

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
<p>Phenotypic conversion of T-lineage lymphoblasts in the lymph node to myeloblasts in the bone marrow during relapse after allogeneic bone marrow transplantation. <i>Int J Hematol.</i> 2000 Aug; 72(2):253-4.</p> <p>Sialyl-Tn- and neuron-specific enolase-positive minimally differentiated erythroleukemia. <i>Intern Med.</i> 2000 Oct;39(10):843-6.</p> <p>A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. <i>J Cell Physiol.</i> 2000 Nov;185(2):280-92.</p> <p>Essential thrombocythemia transformed to acute myelogenous leukemia with t(3;17)(p24; q12), del(5)(q13q34) after treatment with carboquone and hydroxyurea. <i>Jpn J Clin Oncol.</i> 2000 Jul;30(7):310-2.</p> <p>[Effect of etoposide added to individualized induction therapy of adult acute myeloid leukemia--the JALSG-AML-92 Study. Japan Adult Leukemia Study Group]. <i>Gan To Kagaku Ryoho.</i> 2000 Jul;27(8):1160-7.</p> <p>A de novo philadelphia chromosome-positive acute mixed-lineage leukemia with both major and minor BCR/ABL mRNA transcripts. <i>Am J Hematol.</i> 2000 Sep;65(1):72-4.</p> <p>Oxidative stress as a necessary factor in room temperature-induced apoptosis of HL-60 cells. <i>J Leukoc Biol.</i> 2000 Jul;68(1):87-96.</p> <p>Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells. <i>J Cell Physiol.</i> 2000 Sep;184(3):351-5.</p> <p>A case of bilateral heel ulcers associated with hydroxyurea therapy for chronic myelogenous leukemia. <i>Jpn J Clin Oncol</i> 2000 Mar;30(3):159-62.</p> <p>Improved gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. <i>Hum Gene Ther.</i> 2000 ;11:995-1004.</p> <p>Apoptosis in leukemic cells: basic and clinical aspects. <i>Current Topics in Biochem Res.</i> 1:179-191,1999.</p> <p>Engraftment syndrome after autologous peripheral blood stem cell transplantation with high numbers of peripheral blood stem cells followed by granulocyte colony-stimulating factor administration. <i>Bone Marrow Transplant.</i> 2000 ;25:228-9.</p> <p>IL-4, but not vitamin D(3), induces monoblastic cell line UG3 to differentiate into multinucleated giant cells on osteoclast lineage. <i>J Cell Physiol.</i> 2000 ;182:214-21.</p>	2000年8月	Research Trends	Matsumoto Y,
	2000年3月		Muroi K,
	2000年3月		Uwai M,
	2000年7月		Tabata M,
	2000年7月		Miyawaki S,
	2000年9月		Tarumoto T,
	2000年7月		Shimura M,
	2000年9月		Yamada M,
	2000年3月		Tarumoto T,
	2000年5月		Yano L,
	1999年		Hatake K,
	2000年1月		Kawano C
	2000年2月		Kaji Y,

20000492

以降 P.13-159 は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、下記「資料」をご参照ください。

「資料」

アポトーシスを応用した白血病、悪性リンパ腫の治療の開発.

畠清彦.

がん治療のあゆみ 第 18 巻別刷, pp.59-63,1999

血液疾患(ITP,HS) 内科の立場から

畠清彦

診断と治療. 87 巻 7 号別刷, pp.1233-1236, 1999.7

抗胸腺細胞グロブリン療法中に小腸クローン病を発症した中等症再生不良性貧血.

森政樹, 田中孝幸, 秋藤洋一, 植木寿一, 中本周, 上井雅哉, 照井康仁, 冨塚浩, 畠清彦, 小澤敬也, 三浦恭定

臨床血液. 40 巻 10 号別刷, pp.1105-1109, 1999.10

造血器腫瘍患者における血清アミロイド蛋白 A(SAA)の役割.

森政樹, 畠清彦, 上田真寿, 上井雅哉, 照井康仁, 冨塚浩, 大月哲也, 川野千鶴, 室井一男, 小澤敬也

血液・腫瘍科. 40 巻 6 号別刷, pp.584-590, 2000.6

(特集 骨髄異形成症候(MDS)ー最近の進歩ー)

MDS の病態 MDS の臨床病態とアポトーシス. 畠清彦, 冨塚浩, 照井康仁

血液フロンティア. 10 巻 2 号, pp.151-158, 1999.1

Apoptosis in leukemic cells: basic and clinical aspects.

Kiyohiko Hatake, Yasuhito Terui, Hiroshi Tomizuka, Masaya Uwai, Masaki Mori, Yuji Mishima.

Current Topics in Biochemical Research. Vol.1, pp.179–191,1999

In vivo stimulatory effect of macrophage colony-stimulating factor on the number of stroma-initiating cells.

Tanaka-Douzono M, Suzu S, Yamada M, Misawa E, Wakimoto N, Shimamura S, Hatake K, Motoyoshi K.

Journal of Cellular Physiology. 1999 Feb;178(2):267–73.

Inhibition of Vpr-induced cell cycle abnormality by quercetin: a novel strategy for searching compounds targeting Vpr.

Shimura M, Zhou Y, Asada Y, Yoshikawa T, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999 Aug 2;261(2):308–16.

Beta(2)-microglobulin identified as an apoptosis-inducing factor and its characterization.

Mori M, Terui Y, Ikeda M, Tomizuka H, Uwai M, Kasahara T, Kubota N, Itoh T, Mishima Y, Douzono-Tanaka M, Yamada M, Shimamura S, Kikuchi J, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ikeda K, Mano H, Ozawa K, Hatake K.

Blood. 1999 Oct 15;94(8):2744–53.

NH₂-terminal pentapeptide of endothelial interleukin 8 is responsible for the induction of apoptosis in leukemic cells and has an antitumor effect in vivo.

Terui Y, Tomizuka H, Mishima Y, Ikeda M, Kasahara T, Uwai M, Mori M, Itoh T, Tanaka M, Yamada M, Shimamura S, Ishizaka Y, Ozawa K, Hatake K.

Cancer Research. 1999 Nov 15;59(22):5651–5.

Portal vein thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.

Tomizuka H, Hatake K, Kitagawa S, Yamashita K, Arai H, Miura Y.
Acta Haematologica. 1999;101(3):149–52.

High serum levels of M-CSF and G-CSF in Kawasaki disease.

Igarashi H, Hatake K, Tomizuka H, Yamada M, Gunji Y, Momoi MY.
British Journal of Haematology. 1999 Jun;105(3):613–5.

Autologous peripheral blood stem cell transplantation for adults with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a pilot study.

Muroi K, Suzuki T, Amemiya Y, Yoshida M, Kawano C, Kuribara R, Otsuki T, Izumi T, Tomizuka H, Komatsu N, Imagawa S, Hatake K, Miura Y, Ozawa K.
Leukemia and Lymphoma. 2000 Jun;38(1–2):103–11.

Improved gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase.

Yano L, Shimura M, Taniguchi M, Hayashi Y, Suzuki T, Hatake K, Takaku F, Ishizaka Y.
Human Gene Therapy. 2000 May 1;11(7):995–1004.

Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells.

Yamada M, Suzu S, Tanaka-Douzono M, Wakimoto N, Hatake K, Hayasawa H, Motoyoshi K.
Journal of Cellular Physiology. 2000 Sep;184(3):351–5.

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.
Japanese Journal of Clinical Oncology. 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

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.

第3回 造血器腫瘍シンポジウム

【研究報告】

Ubenimex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

晶 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

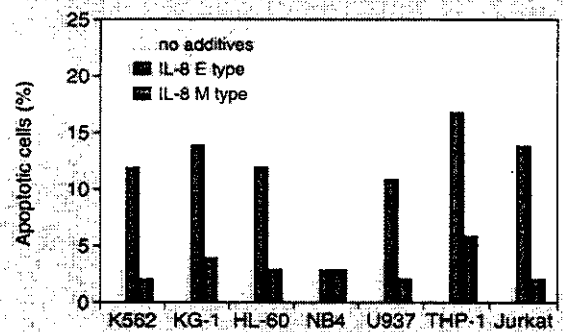
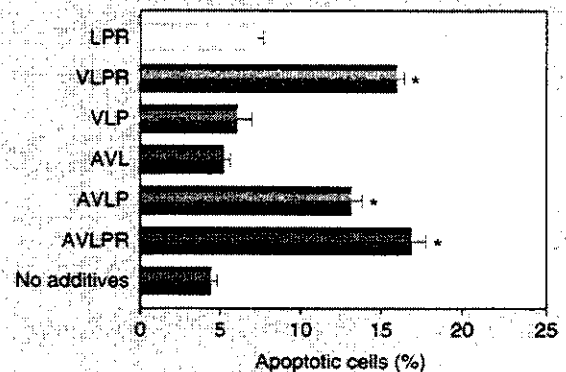


図2 内皮細胞IL-8N末端領域ペプチドのアポトーシス誘導効果



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へまして、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す、右端の1つ、もしくは左端の1つを削っても4つ揃ってい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

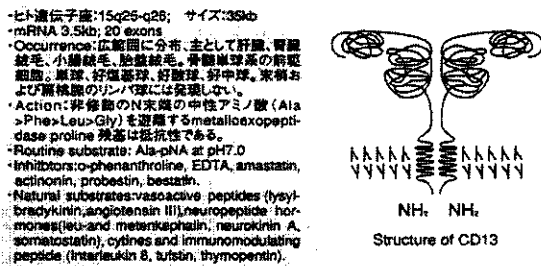


図4 各種ヒト白血病細胞株におけるCD13の発現

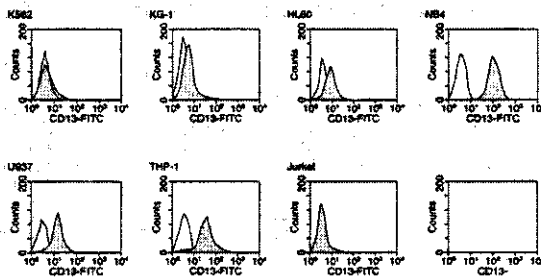


図5 各種aminopeptidase inhibitorのNB4に対するアミノペプチダーゼ活性抑制効果

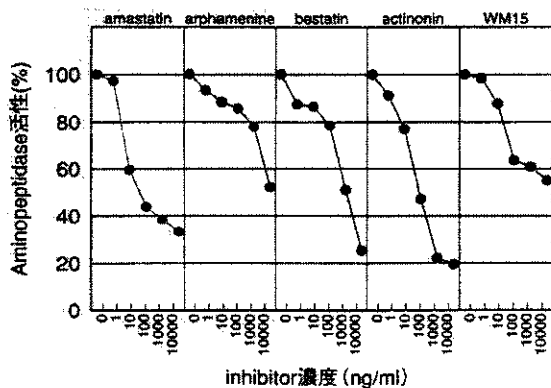


表1 内皮細胞IL-8によるアポトーシス誘導効果の検討

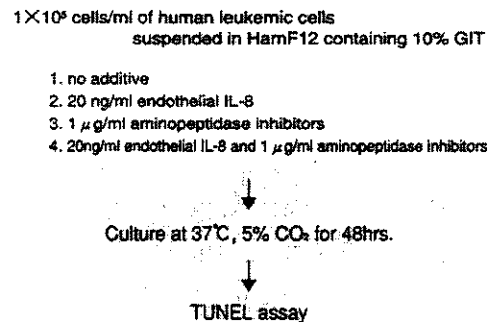


図6 各種aminopeptidase inhibitorのNB4における内皮細胞IL-8によるアポトーシス誘導に与える効果

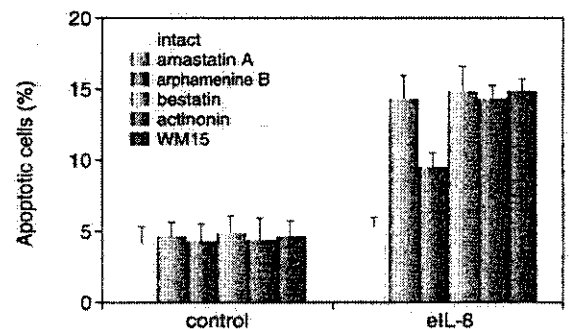
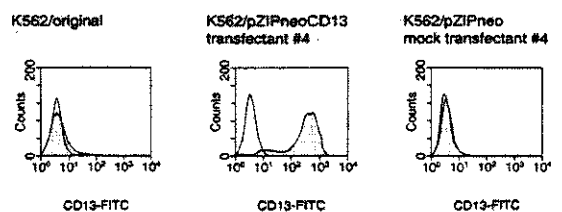


図7 CD13表面抗原の発現



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せん。(図3)

APNの活性の測定ですが、96穴のplateに細胞を入れましてペプチドに基質のついたものを入れまして、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、非常に高くなっており、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、 1×10^5 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してアポトーシスが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して左のカラムが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して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す。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

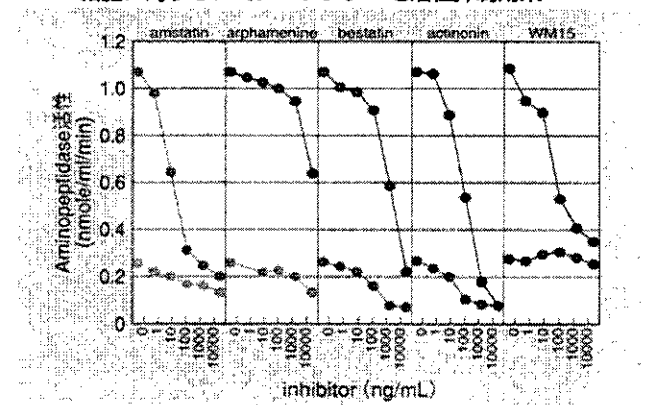


図9 各種aminopeptidase inhibitorのCD13高発現K562細胞における内皮細胞IL-8によるアポトーシス誘導に与える効果

