

リンパ系悪性腫瘍における恒常的 **NF- κ B**
シグナル伝達への阻害剤の応用

平成 **19** 年度

渡邊 真理子

目次

	ページ
第 1 章 序論 (研究の背景と目的)	1
第 2 章 多発生骨髄腫 (MM) に対する NF- κ B 阻害剤の応用	10
第 1 節 序論	10
第 2 節 実験材料と方法	12
第 3 節 結果	23
3-1 DHMEQ の MM 細胞株に対する 恒常的 NF- κ B 活性化の抑制効果	23
3-2 DHMEQ によるアポトーシスの誘導	23
3-3 Caspase の活性化によるアポトーシスの誘導	24
3-4 DHMEQ に反応する NF- κ B 関連遺伝子の負の制御	25
3-5 新鮮 MM 細胞に対する DHMEQ の効果	26
3-6 NOG マウスを用いた <i>in vivo</i> モデル系における DHMEQ の影響の解析	27
第 4 節 考察	28
第 3 章 成人 T 細胞性白血病 / リンパ腫 (ATL) に対する NF- κ B 阻害剤の応用	32
第 1 節 序論	32
第 2 節 実験材料と方法	35
第 3 節 結果	45
3-1 DHMEQ による ATL 由来細胞株に対する 恒常的 NF- κ B 活性化の抑制効果	45
3-2 DHMEQ の ATL 由来細胞株に対する アポトーシスの誘導効果	46

3-3	抗アポトーシスおよびセルサイクルを司る 遺伝子群の発現制御	4 7
3-4	新鮮 ATL 細胞に対する DHMEQ の効果	4 8
3-5	SCID マウスを用いた <i>in vivo</i> モデルでの検討	4 9
3-6	DHMEQ によるキャリア末梢血単核球 (PBMC) 中の HTLV-1 ウイルス量の削減	5 0
第4節	考察	5 2

第4章 慢性リンパ性白血病 (CLL) に対する

NF- κ B 阻害剤の応用

第1節	序論	5 6
第2節	実験材料と方法	5 8
第3節	結果	6 3
3-1	新鮮 CLL 細胞の恒常的 NF- κ B 活性化に 及ぼす DHMEQ の効果	6 3
3-2	CLL 細胞に対する DHMEQ の選択的なアポトーシスの誘導	6 3
3-3	DHMEQ による抗アポトーシス遺伝子の発現制御	6 5
3-4	DHMEQ による fuudarabine の抗腫瘍効果の増強作用	6 5
3-5	CD40 誘導性 NF- κ B の DHMEQ による阻害効果	6 6
第4節	考察	6 8

第5章 ホジキンリンパ腫 (HL) に対する

NF- κ B 阻害剤の応用

第1節	序論	7 1
第2節	実験材料と方法	7 5
第3節	結果	8 6
3-1	I κ B α 変異を持つ H-RS 細胞株に対する topoisomerase 阻害剤による一過性の NF- κ B 活性の誘導	8 6
3-2	topoisomerase 阻害剤による NF- κ B の 誘導における I κ B β の関与	8 7
3-3	DHMEQ による恒常的 NF- κ B の活性化阻害を伴う H-RS 細胞増殖の抑制とアポトーシス誘導	8 8

3-4	カスパーゼ 3、8 および 9 の活性化を伴うアポトーシス	89
3-5	<i>in vivo</i> モデルにおける H-RS 細胞株に対する DHMEQ の増殖抑制効果	90
3-6	topoisomerase 阻害剤の抗腫瘍効果の DHMEQ による増強作用	90
第4節	考察	92
第6章	総括	96
	参考文献	99
	謝辞	108
	図表	

第1章 序論（研究の背景と目的）

はじめに

ヒトゲノム配列の概略が明らかにされ、本格的なポストゲノムシーケンス時代を迎えたのち、ケミカルバイオロジーの創薬への応用が注目されている。医薬品の創薬研究においては、化学を出発点にゲノム研究とドッキングし、遺伝子産物に対する阻害剤や活性剤を探索するケミカルゲノミクスへと発展しつつある。またプロテオミクスに立脚した診断や治療のバイオマーカーの開発や、ドラッグデリバリー技術の開発も盛んに行われるようになった。トランスレーショナルリサーチの重要性が提唱された昨今、特に癌の領域においては様々な分子標的治療薬の創薬が試みられている。ハーセプチン（1998年）、グリベック（2001年）、イレッサ（2002年）、ベルケード（2003年）、アバスチン（2004年）などの分子標的治療薬が相次いで開発され、分子標的治療時代が到来した(1)。分子標的薬の開発は疾患の分子基盤を理解し、適応となる疾患群を基礎的研究の段階で明確にすること、さらにその過程において開発された分子標的治療薬の特異性、安全性を正しく評価し、既知の薬剤との併用も含めより良い使い方を考えることが重要であると考えられる。

分子標的治療薬の出現

分子標的療法は、癌細胞の分子生物学的特徴の解析に基づき創薬を行い、癌細胞への特異性をより高めた治療法である。従来の化学療法は、癌の予後の改善に大きく貢献してきたが、その薬剤の多くはDNA複製や細胞分裂そのものを標的とし、癌細胞が活発に分裂を繰り返して増殖するという特徴に狙いを定めている。DNA複製や細胞分裂は細胞の普遍的機序であるため、正常細胞、特に増殖の盛んな骨髄中の造血細胞や毛母細胞、粘膜上皮細胞などもその標的となり深刻なダメージを受ける。したがって従来の化学療法の癌細胞に対する特異性は相対的に低く、かつ副作用も大きいため疾患によっては十分な効果が得られないという問題がある。従来の化学療法が、癌細胞を正常細胞もろとも攻撃するのに対し、分子標的療法は誘導ミサイルによるピンポイント攻撃にたと

えることができる。癌細胞は癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が蓄積し成立しているが、実際の癌細胞の増殖にかかわるいわゆるメインエンジンに相当するものは比較的単純であると考えられる。すなわち、癌細胞を攻撃するのに総ての異常を標的にする必要はなく、癌細胞を支える基本的増殖機構に狙いを定めさえすればよいと考える。すなわち、これからの新しい癌治療法は癌細胞が有する数少ない決定的分子標的の阻害を目指すというものである。このことは最近、**Oncogene addiction** という概念で理解されるようになってきている (2)。

癌の増殖、腫瘍血管新生および転移には種々のシグナル伝達分子が関与し、癌に選択的なシグナルの阻害剤から有望な新薬が誕生している。血液系悪性腫瘍の慢性骨髄性白血病 (CML) の臨床試験において、一つの阻害薬が顕著な有効性を示した。CML は、第 9 番染色体と第 22 番染色体の相互転座によって生ずるフィラデルフィア (Ph) 遺伝子の特徴とし、Bcr とチロシンキナーゼである Abl との融合タンパク質 Bcr-Abl が産生されて、細胞増殖を亢進する疾患である。Novartis 社は、Bcr-Abl に特異的な阻害剤 STI571 (メシル酸イマチニブ、Glivec) を '90 年代に開発し、白血病治療に多大なる福音をもたらした (3, 4)。さらに急性骨髄球性白血病 (APL) に対するレチノイン酸療法 (ATRA) も一つの成功例である (5)。分子標的療法は従来の方法では根治不可能とされた癌も、あたかもそのエンジンを切るかのように静かに治ってしまうという可能性を持っている。分子標的療法を考える時、ある疾患に普遍的に存在し、かつ正常細胞と差別化できる脱制御分子の選択が重要となる。

疾患の分子基盤の解析と分子標的の同定

細胞には多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常に由来するシグナルの脱制御が蓄積している。しかし、癌細胞の増殖や生存は特定のシグナルに大きく依存した中毒状態、**oncogene addiction** の上に成り立っていることが理解されつつある。癌細胞のバイオロジーの解析では、癌の増殖や生存を支える分子基盤、すなわち **oncogene addiction** に関わる分子の理解が重要であると考えられる。

著者はこれまで、ホジキンリンパ腫細胞では過剰発現状態の CD30 が CD30 リガンド非依存的に自ら会合、多量化体し、TRAF (TNF receptor associated factor) を動員して NF- κ B (nuclear factor kappaB) 活性化に至る経路を活性化していること、すなわち CD30 の過剰発現と自己活性化による TRAF-IKK (I κ B kinase)-I κ B α (inhibitor of kappaB α) を介した NF- κ B の恒常的活性化

が、ホジキンリンパ腫細胞の分子基盤であることを明らかにしてきた。

一方、ホジキンリンパ腫細胞での NF- κ B の恒常的活性化を、アデノウイルスベクターに組み込んだ CD30 デコイ (CD30 の細胞質内機能ドメインを欠く変異体) やアミノ酸置換をした I κ B α (³²Ser,³⁶Ser \rightarrow Ala に置換) の導入により阻害することで、アポトーシスが誘導されてくることを見いだした。これにより、CD30 過剰発現によって誘導されている NF- κ B の恒常的活性化は、ホジキンリンパ腫細胞の生存にとって重要であり、ホジキンリンパ腫細胞は NF- κ B に依存した生存基盤を持っていることを明らかにしてきた。

さらに CD30 プロモーターの解析を通して、CD30 発現誘導にかかわるシスエレメントを同定、この部位を介して JunB を構成成分とする転写因子 AP-1 が CD30 過剰発現に関わることを示した。また CD30 は、古典的 MAP (mitogen-activated protein) キナーゼカスケードである ERK (extracellular signal-regulated kinase) を活性化し、転写因子である JunB の発現を誘導、CD30 プロモーターの活性化により CD30 の自己誘導に関わることを明らかにし、ホジキンリンパ腫細胞における CD30 過剰発現が JunB-CD30-JunB ループにより維持されていることを示した。このことは、ホジキンリンパ腫細胞の CD30-NF- κ B 経路が JunB-CD30-ERK MAPK-JunB ループを介した CD30 過剰発現の維持により支えられていることを示唆するものである。

さらに CD30 プロモーターのエピジェネティックな制御機構についても解析を試み、CD30 プロモーターのコア領域周辺に二つの CpG アイランドを同定、この領域のメチル化が JunB を介した CD30 発現誘導にかかわることを明らかにし、ホジキンリンパ腫発症機序に関する考察をおこなった。

CD30 過剰発現リンパ腫にはホジキンリンパ腫の他に未分化大細胞型リンパ腫が含まれ、後者は恒常的 NF- κ B 活性化を示さないことが特徴の一つとされているが、病理組織学的に両者の境界は明らかでなくその分類には議論がある疾患群である。著者は CD30 過剰発現リンパ腫でホジキンリンパ腫の分子基盤の解析で得た知見を発展させ、恒常的 CD30-NF- κ B 経路を未分化大細胞型リンパ腫の一部に見られる特徴的キメラ分子 NPM (nucleophosmin)-ALK (anaplastic lymphoma kinase) が阻害することを通して、CD30 過剰発現リンパ腫の従来組織学的疾患分類を増殖シグナルの視点から再構成し、NF- κ B を分子基盤とするグループと ALK を分子基盤とするグループに簡潔に分類できることを示した。これは癌細胞の特性を従来形態学ではなく、oncogene addiction

という視点から分類、理解するものである。一方、臨床応用という視点では、NF- κ B や ALK は重要な分子標的であることが理解される。

以上を背景とし、著者は NF- κ B の分子標的としての重要性に着目、より広くリンパ系腫瘍への NF- κ B を分子標的とした治療の開発のための基礎的検討への展開を行った。臨床応用という視点で考えた場合、特異性や低毒性に加えて投与のしやすさという要素の点で低分子化合物による阻害が有用であると考えられ、NF- κ B 阻害剤の探索を行い、新規低分子化合物として開発中であった NF- κ B 阻害剤 DHMEQ へと至った訳である。

NF- κ B の歴史

NF- κ B は免疫グロブリン κ 軽鎖の発現を抑制する転写因子として生化学的に同定され、 κ 軽鎖遺伝子制御領域 (エンハンサー) 中の B と呼ばれる DNA 断片に結合することから NF- κ B と命名された。一方、それとは別に脾臓に B 細胞性腫瘍を誘発するレトロウイルスから *rel* と呼ばれる癌遺伝子が同定された。両者の構造上の類似性が明らかとなり、Rel (*rel* 遺伝子産物)、NF- κ B および関連タンパク質をも含めて Rel/NF- κ B ファミリーが誕生した。NF- κ B は炎症性サイトカイン (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α) や接着分子 (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) やウイルスタンパク質のプロモーター領域に存在する κ B 配列 (GGGRNNYYCC) と呼ばれる DNA 配列に結合し、その制御下の遺伝子の発現を誘導する。NF- κ B は免疫、炎症反応、発生のほかリンパ球の機能や細胞の活性化や増殖、分化、死の制御さらにウイルス遺伝子発現にかかわっている (6)。さらに NF- κ B は抗アポトーシスタンパク質 (IAPs, FLIP, Bcl-xL) の転写を誘導し抗アポトーシス活性を有すること、さらに最近では腫瘍化との関係も報告されている (7)。

生化学的に精製された NF- κ B は、50 kDa (p50)、65 kDa (p65, RelA) のタンパク質からなるヘテロ 2 量体であったが、cDNA クローニングの技術により p50 は、105 kDa の前駆体として合成された後 C 末端側が分解され、p50 にプロセスされることが明らかになった。p50、p65 とともにその N 末端約 300 アミノ酸は Rel タンパク質の同じ領域と約 60% の相同性を有していた。このよく保存された相同性の高い領域は Rel homology domain (RHD) と名付けられた。この RHD には DNA 結合、2 量体形成、核移行シグナル (NLS) および抑制

因子 I κ B との結合部位が存在する (8)。現在では p50、p65、c-Rel 以外にも RHD を持つタンパク質として RelB や p52 (前駆体 p100 として合成) の転写因子がファミリーとして報告されている。NF- κ B はホモ 2 量体あるいはヘテロ 2 量体として抑制因子 I κ B と複合体を形成し細胞質に留まっており、細胞外からの刺激に応答して活性化し核内に移行し、標的遺伝子の発現調節に関わっていることが明らかになっている (Figure 1)。

I κ B による NF κ B の活性制御機構

I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3) はアンキリンリピートという共通の構造を持つファミリーを形成しており、どのタンパク質も 6-7 個のアンキリンリピートを有している (Figure 1)。アンキリンリピートは転写因子あるいは細胞周期、分化に関係する数種のタンパク質に存在することが報告されているが、種々の I κ B 変異体を用いた実験から I κ B はアンキリンリピートを介して NF- κ B ファミリーのうち RelA、c-Rel、RelB の RHD と結合し、核移行シグナルをマスクして NF- κ B の核移行を阻止していることが明らかとなった。p100、p105 は N 末端側に I κ B α ファミリーに特徴的なアンキリンリピート構造が存在し、核移行シグナルをマスクしている。NF- κ B の活性化経路は "古典的経路 (classical pathway)" と "非古典的経路 (alternative pathway)" の二つに大別される。古典的経路では、NF- κ B (RelA/p50) が阻害タンパク質 I κ B α と結合し細胞質に局在している。TNF- α 、IL-1、LPS、Lipopeptide や phorbol ester などのなんらかの細胞外刺激に応答して IKK 複合体によってリン酸化を受けた I κ B α にユビキチン化が起こり、プロテアソームにより分解され、遊離した NF- κ B (RelA/p50) は核移行シグナルが露出されることにより核内に移行、標的遺伝子のプロモーターに存在する κ B 配列 (GGGRNNYYCC) に結合して遺伝子発現を調節している (9)。I κ B α の分解は、I κ B kinase (IKK) [IKK α , IKK β , IKK γ /NEMO (NF- κ B essential modulator)] の 3 量体による I κ B α のリン酸化とそれに続くユビキチン化に依存している。このユビキチン化は、 β -TrCP によって実行される。I κ B α そのものが RelA/p50 により誘導されるため、I κ B α は標的遺伝子のプロモーターに結合した RelA/p50 と再度複合体を形成し、細胞質に移行し活性化前の状態に戻る (9)。一方、非古典的経路では、p100/RelB が IKK α ホモ複合体によってリン酸化され、 β -TrCP によりユビキチン化されたの

ち、p100 が p52 へとプロセッシングされ、核移行シグナルを覆っていたドメインが除去されることで、p52/RelB が転写因子として機能する。このプロセッシングの過程も p100 のリン酸化と β -TrCP によるユビキチン化に依存する。両経路がかかわる基本的機能として、古典的経路は自然免疫、炎症、細胞増殖が挙げられ、非古典的経路は獲得免疫、リンパ組織の形成、B 細胞分化が挙げられる (10) (Figure 2)。

血液系悪性腫瘍における分子標的としての NF- κ B

近年の研究によって NF- κ B が癌化や癌細胞の増殖、生存に重要な働きをしていることが明らかになっている。従って NF- κ B は重要な分子標的の一つとして考えられている (11)。

NF- κ B の恒常的活性化を伴う代表的な血液系悪性腫瘍に、多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM)、成人 T 細胞性白血病／リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma; ATL)、慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocyte leukemia; CLL) (12)、ホジキンリンパ腫 (Hodgkin lymphoma; HL)、マントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma; MCL) が挙げられる (13)。

MM は、主に高齢者にみられ予後不良の慢性に経過する形質細胞の悪性増殖性疾患で、中央生存期間は約 3~4 年である。腫瘍細胞から産生される M タンパクの増加が認められ、正常免疫グロブリンの産生が低下するのがこの疾患の特徴である (14)。

ATL はレトロウイルスの 1 つである human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) の感染によって引き起こされる予後不良のリンパ系腫瘍である。HTLV-I はヒトを宿主とし、主に CD 4 陽性細胞にのみ感染し、その感染様式は母乳を介した母子感染が主なルートである。HTLV-I キャリアは世界中で 1,000~2,000 万人いるとされ、南西日本、カリブ海沿岸、西アフリカの 3 つの地域に遍在している。日本全国の HTLV-I キャリアは約 120 万人で、感染細胞は長い年月にわたり体内に存在し続け、約 60 年の潜伏期間を経て発症に至る。日本の疫学調査によると、白血病型で中央生存期間は約 13 ヶ月、5 年生存率は 17.5 % にすぎないといわれている (15)。

CLL は、成熟した小型リンパ球 (B 細胞) によるリンパ系腫瘍で、50 歳を越える男性に多く、欧米では白血病の約 30 % を占めるが、日本では約 2 % と

極めて稀な白血病である。慢性に経過する疾患で、末梢血および骨髄でのリンパ球の増加が顕著にみられる (12)。

HL はリンパ細網系由来細胞の腫瘍性増殖疾患のうちで、病理組織学的に病変部に Reed-Sternberg 細胞を認める疾患群である。原因は不明であるが、Epstein-Barr ウイルスが腫瘍化に関係している可能性がある。欧米では悪性リンパ腫の約 40 % がホジキン病であるが、日本では約 15 % と少ない (16)。

MCL は、二次リンパ濾胞胚中心をとりまく層 (暗殻) に存在するリンパ球 (CD 5 陽性の B 細胞) の腫瘍化と考えられるリンパ腫である。かなりの症例で BCL-1 遺伝子座再構成がみられ、これは t(11; 14)(q13; q32) 染色体異常の結果であり、この遺伝子異常がサイクリン D1 mRNA の過剰発現をもたらし、腫瘍化につながると理解されている (17)。

血液系悪性腫瘍における NF- κ B の恒常的活性化は、NF- κ B の抗アポトーシス活性に加え、サイトカインの分泌や接着分子の発現を通して癌細胞特有の形質に関わると考えられる。NF- κ B の恒常的活性化を分子基盤として有する疾患群は他の種々の分子の脱制御を伴い、それらの分子には NF- κ B とは関係ないものも多く含まれている。しかし、渡辺らは、ATL における NF- κ B の恒常的活性化を、アデノウイルスベクターを用いた変異型 I κ B α の導入により阻害したところ、ATL 細胞にアポトーシスが誘導されることを報告した (18)。この結果より、ATL 細胞は腫瘍化に至る過程で種々の分子異常を蓄積するが、結果として NF- κ B の恒常的活性化にその生存を依存した形質を持っているものと考えられた。したがって、NF- κ B の恒常的活性化は潜在的な分子標的であると考えられる。一方、血液系悪性腫瘍で臨床応用されている topoisomerase 阻害剤などの DNA 障害を起こす薬剤は、IKK を活性化し一過性に NF- κ B を誘導するが、この誘導性の NF- κ B はしばしば薬剤の感受性を鈍らせることが報告されている (19, 20)。NF- κ B 阻害剤は誘導性の NF- κ B を阻害することで、薬剤の抗腫瘍活性を回復させることが明らかとなっている。誘導性の NF- κ B は大部分の血液系悪性腫瘍において潜在的な分子標的であると考えられる。

NF- κ B 阻害剤には NF- κ B 活性化経路の分子、例えば IKK や I κ B α に対する優勢抑制体や p50 の核移行シグナルをマスクするペプチド (SN50)、NF- κ B のプロモーターへの結合を阻害するデコイ DNA、さらに NF- κ B の発現を mRNA レベルで抑制するアンチセンスオリゴのほかに種々の低分子化合物が報告されている。これらの NF- κ B 阻害剤を臨床治療への応用という観点

で検討したとき、特異性や毒性に加えて投与のしやすさという要素が重要になってくる。多数の NF- κ B の阻害作用を有する薬剤が報告されているにもかかわらず、現在のところ広く臨床応用に至っているものが存在しないという現実には、特異性や毒性に加えて扱い易さ、さらに効果も含め臨床応用までのハードルをクリアしたものがいないことを示唆している (21)。臨床応用までのハードルを考えたとき、優勢抑制体やペプチド、デコイ DNA、アンチセンスオリゴよりは低分子化合物の方がより有利であると考えられる。低分子化合物は特異性の点から二つに分類され、比較的特異性の低い抗炎症剤、抗酸化剤、免疫抑制剤、プロテアソーム阻害剤を含む群と、比較的特異性の高い IKK 阻害剤、I κ B α のリン酸化阻害剤、NF- κ B の核移行阻害剤を含む群に大別される。

NF- κ B 阻害剤の血液系悪性腫瘍への効果については、IKK 阻害剤である Bay11-7082 や ACHP、プロテアソーム阻害剤である PS341 による基礎的検討をはじめとして複数の報告がなされている。PS341 はボルテゾミブ (ベルケード) の名前で、MM の治療薬として米国 FDA により承認された。また亜ヒ酸の NF- κ B 阻害を利用した単独あるいはインターフェロンとの併用療法の基礎的検討の報告もある (22, 23)。NF- κ B 経路特異的阻害剤としては IKK β 阻害剤が製薬企業を中心に開発が進められているが、いずれも基礎的研究の段階で、現在までに臨床応用に至ったものはない (24)。

DHMEQ による NF- κ B を標的とした血液系悪性腫瘍の治療の可能性

Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) は、放線菌 *Amycolatopsis* sp. MK299-95F4 から得られた epoxyquinomicin 類の一つ epoxyquinomicin C の dehydroxymethyl 誘導体として梅澤らにより合成された低分子化合物である (Figure 3)。当初 epoxyquinomicin C は抗 NF- κ B 作用を有する panepoxydone や cycloepoxydone と共通の 4-hydroxy-5,6-epoxycyclohexenone 構造を有することから、抗 NF- κ B 作用が期待された。しかし epoxyquinomicin C そのものは抗 NF- κ B 作用を示さず、その hydroxymethyl 誘導体として合成された DHM2EQ (後に DHMEQ と改名) とその isomer DHM3EQ が抗 NF- κ B 作用を持つことが松本らによって明らかにされた (25, 26)。

有賀らの報告によると、Jurkat 細胞を腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor α ; TNF α) で刺激したときの NF- κ B 誘導阻害作用は DHM2EQ の方が DHM3EQ

よりも強く、type 2 collagen で誘導した関節炎モデルマウスを使用した *in vivo* モデルにおいても抗炎症効果が確認されている。DHMEQ 光学異性体の中ではキラルカラムにより分離精製した (-)-DHMEQ の方が (+)-DHMEQ よりも 10 倍以上活性が強いことが明らかとなっている。さらに、Jurkat 細胞を TNF α で刺激したときの NF- κ B 活性化を DNA 結合能で検討したところ、(-)-DHMEQ (以下 DHMEQ と呼ぶ) は 10 μ g/ml の濃度でほぼ完全に抑制できることが示された。さらに、その抑制は I κ B α のリン酸化とそれに続く分解には影響なく、NF- κ B の核への移行のステップを阻害することが明らかになった。すなわち核移行にかかわるタンパク質複合体が DHMEQ の標的であると想定された。DHMEQ は Smad 2 や large T antigen の核移行は阻害せず、一般的な核移行機構にかかわる importin nuclear pore の阻害とは別の機構を標的としていると考えられている (27)。NF- κ B 経路に比較的特異性の高い低分子化合物として報告されているものの多くが I κ B α の分解抑制、I κ B α のリン酸化抑制といった I κ B α あるいはその上流のシグナル伝達点を阻害点としている。この点、DHMEQ は I κ B α の下流の NF- κ B の核移行のステップを阻害する初のユニークな低分子化合物である。

以上の背景を踏まえ血液系悪性腫瘍にみられる NF- κ B の恒常的活性化という分子基盤に着目し、新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ による分子標的療法をトランスレーショナルリサーチとして提案できる可能性があると考えた。本研究では 多発性骨髄腫 (第 2 章)、成人 T 細胞性白血病 (第 3 章)、慢性リンパ性白血病 (第 4 章) および Hodgkin リンパ腫 (第 5 章) に対する分子標的療法の基礎的検討を、新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ をモデルとして試みた。

第2章 多発性骨髄腫 (MM) に対する NF- κ B 阻害剤の応用

第1節 序論

多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) は、悪性の形質細胞のクローナルな増殖によって引き起こされる血液系悪性腫瘍の一つであり、患者の多くは60歳以上である。腫瘍細胞は主に骨髄で増殖し正常造血を阻害すると同時に周辺に骨融解性病変を形成、貧血を特徴とした汎血球減少に加え骨折、骨痛という本疾患に特徴的的症状を惹起する。MMには根治的治療法は存在せず、中央生存期間は約3-4年である。多剤化学療法による予後は20年前から改善せず、同種幹細胞移植も患者に高齢者が多いため適応症例は限られている。自己幹細胞移植も試みられているが大きな予後の改善には繋がっていない(14)。従って、MMの予後を改善するための新しい治療法の開発は急を要する問題である。

従来化学療法抵抗性を打破する試みとして最近、腫瘍細胞の生存や増殖にかかわる分子を標的にする分子標的療法が提唱されてきた(28, 29)。MMにおいても分子標的療法は多剤化学療法への抵抗性を克服するための新たな治療戦略となりうる可能性を秘めている。MMにおける分子標的療法を開発するためには、MM細胞の増殖や生存にかかわる共通の分子基盤を明らかにし、標的となる分子に対する特異的阻害薬を開発して行くことが重要である。近年 nuclear factor kappa B (NF- κ B) の活性化が、アポトーシスや細胞周期の調節、細胞増殖や浸潤など腫瘍形成の様々な過程において関係しているという報告がなされた。MMの臨床的所見には多様性があるにもかかわらず、強力なNF- κ Bの恒常的活性化はMM細胞のユニークかつ共通の特徴であり、細胞増殖や様々なサイトカインの発現を通しMM特有の形質にかかわっていると報告されている。さらに、強力なNF- κ Bの恒常的活性化は、MM細胞の抗アポトーシス活性も担っていることが報告されている(30)。多くの固形腫瘍では、新血管形成因子の一つとして知られる血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の産生増大が報告されている。これまでの研究でVEGFはヒトMM細胞の細胞増殖を誘導し、腫瘍の転移にも関係していることが明らかになっている(31, 32)。最近 VEGF 発現がNF- κ Bに依存する形で制御されている可能性が報告されている(33)。したがってMMの治療は、NF- κ B経路を標的としNF- κ B活性を阻害することが理論上良い方法であると考えられる。本研究において、MM細胞

胞に対する新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の *in vitro* での特異性、NF- κ B 阻害作用、MM 細胞へのアポトーシス誘導そして *in vivo* モデルを用い生体内での腫瘍細胞増殖抑制効果や毒性などの検討を行なった。

第2節 実験材料と方法

1. 試薬

DHMEQ は、慶應義塾大学工学部 梅澤一夫博士より提供していただいた。カスパーゼ 3 インヒビター; Z-Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-FMK、カスパーゼ 8 インヒビター; Z-Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-FMK およびカスパーゼ 9 インヒビター; Z-Leu-Glu (OMe)-His-Asp (OMe) (LEHD)-FMK は全て Calbiochem より購入した。DHMEQ およびカスパーゼインヒビターはジメチルスルフォキシド (DMSO) (WAKO) に溶解し、 -20°C で保存した。細胞生存率を測定する際に用いた 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium (MTT) (SIGMA) は、PBS (-) で 5 mg/ml の濃度に希釈し、 -20°C で保存した。アポトーシス検出の際に用いた Hoechst 33342 (Calbiochem) は PBS (-) に溶解し、 4°C で保存した。細胞周期 (cell-cycle) の解析で使用した RNase A は日本ジーンより、そしてプロピジウムイオダイド (PI) は SIGMA より購入した。

2. 抗体

supershift EMSA に用いた抗 NF- κ B p50 (C-19) ヤギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p65 (C-20) ウサギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p52 (C-5) マウスモノクローナル抗体、抗 c-Rel (B-6) マウスモノクローナル抗体そして抗 RelB (C-19)ウサギポリクローナル抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。

ウェスタンブロッティング法や免疫蛍光染色法に用いた一次抗体は以下のとおりである。活性化抗 NF- κ B p65 マウスモノクローナル抗体は、Chemicon International より購入した。抗 cyclin D2 (34B1-3) ラットモノクローナル抗体、抗 Bcl-xL (H-62) ウサギポリクローナル抗体、抗 FLICE inhibitory protein, long and short isoform (FLIPS/L) (H-202) ウサギポリクローナル抗体、抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) (A-20) ウサギポリクローナル抗体そして抗 α tubulin (TU-02) マウス immunoglobulin M (IgM) モノクローナル抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。

アポトーシスとその活性化経路を検出するための抗 caspase-3/ CPP32 マウスモノクローナル抗体は BD Biosciences より、抗 caspase-8 (1C12) マウスモノクローナル抗体と抗 cleaved caspase-9 (Asp330) ウサギポリクローナル抗体は Cell

Signaling Technology より購入した。

ウエスタンブロッティング法に用いた二次抗体は以下のとおりである。Alkaline Phosphatase Conjugate 抗マウス innumoglobulin G (IgG) (H+L) 抗体および Alkaline Phosphatase Conjugate 抗ウサギ IgG (Fc) 抗体はプロメガ (Promega) より、Alkaline Phosphatase Conjugate 抗マウス IgM 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

免疫蛍光染色法に用いた二次抗体は以下のとおりである。fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、FITC-labeled ヤギ抗ラット IgG 抗体そして FITC-labeled ヤギ抗マウス IgM 抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。

3. 細胞株と細胞培養

Jurkat (T cell) 細胞株と K562 (erythromyeloid) 細胞株は JCRB (Japanese Cancer Research Resources Bank) より、MM 由来の細胞株 KMM-1、RPMI 8226 そして U266 は林原生物科学研究所・藤崎細胞センター (Fujisaki Cell Biology Center) より供与していただいた。MM 患者および健常人ボランティアからの末梢血単核球 (PBMC) は、インフォームドコンセント後、ヘルシンキ条約に基づく同意書を得て提供していただいた。ヘパリン採血した末梢血を PBS (-) で 2 倍に希釈し、これを、等量のヒト単核球分離液 Lymphoprep (第一化学薬品株式会社) に重層して遠心分離 (2,000 rpm, 30 分、室温) し、中間層の単核球分画を回収し、PBS (-) で 2 回洗浄後使用した。全ての細胞株は 56 °C で 30 分間非働化した 20 % の子牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (SIGMA) に抗生物質としてペニシリン G (100 u/ml) (GIBCO) とストレプトマイシン (100 μg/ml) (GIBCO) を添加したものを培養液として用いた。MM 患者および健常人ボランティアからの末梢血単核球は、56 °C で 30 分間非働化した 20 % の子牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (SIGMA) に抗生物質としてペニシリン G (100 u/ml) (GIBCO) とストレプトマイシン (100 μg/ml) (GIBCO) を添加したものを培養液として用いた。患者新鮮 MM 細胞は東京女子医大病院血液内科 岡村隆光博士に提供していただいた。

細胞はプラスチック製の培養フラスコを使用し、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター中で培養した。細胞株の継代は 1 対 4 から 1 対 9 の割合で細胞浮遊液を新

しい培養液に加え培養した。細胞の凍結保存はセルバンカー（十慈フィールド株式会社）を用い、ディープフリーザーにて行った。

4. 細胞増殖アッセイ (MTT Assay 法)

細胞株、MM 患者、健常人ボランティアからの末梢血単核球を 5×10^5 cells/ml に調製し、96 ウェルプレート (Costar) に播種し ($100 \mu\text{l/well}$)、各種の濃度の DHMEQ を添加し、 37°C 、5 % CO_2 で一定時間インキュベートした。次に、MTT 溶液を各ウェルに $10 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で 4 時間インキュベートした。その後、イソプロピルアルコールで希釈した 0.04 N HCl を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、ピペッティングによりホルマザン沈澱を十分に溶解させた後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により波長 570 nm で吸光度を測定した。コントロールとしてジメチルスルフォキシド (DMSO) を添加した検体の生存率を 100 % とし、各種濃度の DHMEQ を添加した時の細胞生存率を求めた。

5. ウェスタンブロッティング法

回収した細胞を PBS (-) で 2 度洗浄した後、Cell Lysis バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 % sodium dodecylsulphate (SDS), 1mM sodinu orthovanadate (V), 0.1 mM sodium molybdate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] を加えピペッティングにより溶解後、 100°C で 5 分間煮沸した。次に激しく混和し、得られた細胞懸濁液を 15,000 rpm、10 分間の遠心分離操作を行い上清を回収することで不溶物を取り除いた後、タンパク質濃度を DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) で測定した。タンパク質溶液は -80°C で保存した。一定量のタンパク質に 5 X Sample バッファー [0.31 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % (w/v) sodium dodecylsulphate (SDS), 35 % (v/v) glycerol, 0.025 % (w/v) bromophenol blue, 25 % 2-mercaptoethanol] を 1 X になるように加え、 100°C で 5 分間煮沸し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のサンプルとした。

スラブ型電気泳動槽にポリアクリルアミドゲル (テフコ) と Running バッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS) をセットし、ゲルの各ウェルに用意したサンプルを注入し、15~25 mA の定電流で電気泳動を行った。色素がゲルの先端近くまで移動したところで泳動を終了し、ゲルを取り外し転写バ

ッファー (125 mM Tris, 960 mM glycine, 20 % メタノール) に浸した。メタノール次に転写バッファー に浸したポリビニリデンジフロリド (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) とゲルをセミドライブロットティング装置 (日本エイドー) にセットし、180 mA の定電流で 2–3 時間ゲル中のタンパク質をメンブレンに転写した。

転写後のメンブレンは超純水で 3 回洗浄の後、5 % (w/v) スキムミルク (雪印) を含む TBST バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) により室温で 2 時間振盪し、ブロッキングを行った。ブロッキングを行ったメンブレンは、ブロッキングバッファー で希釈した 1–2 μ g/ml の一次抗体と 4 °Cで一晩反応させた。続いて TBST バッファー で 10 分間振盪しながらの洗浄を 3 回繰り返した。次に、TBST バッファー で希釈した二次抗体とメンブレンを室温で 1 時間振盪反応させ、TBST バッファー で 10 分間振盪しながらの洗浄を 3 回繰り返した。最後に Tween 20 を含まない TBS バッファー で 2 回、超純水で 1 回リンスし、Western Blue (Promega) により発色反応を行った。

6. Immunohistochemistry

PBS (-) で 2 回洗浄した細胞は、PBS (-) に再懸濁させ、Auto smear (Sakura) を使ってサイトスピンし、スライドグラス (Matsunami) にはり付けた。十分に風乾させた後、室温で 10 分間メタノール固定を行った。次に、PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS (-) で 4 μ g/ml に希釈した一次抗体 60 μ l を加え、4 °Cで一晩反応させた。続いて、PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS (-) で 4 μ g/ml に希釈した二次抗体 60 μ l を加え、37 °C で 30 分間暗所で反応させた。再び PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、Perma Fluor Aquasous Mounting Medium (日本ターナー株式会社) を用いて封入した。観察までは蛍光の退色を防ぐため、冷暗所に保存した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 Radiance 2000 (Bio-Rad) を用いて行い、画像処理は Photoshop にて行った。

7. 核タンパク質の調製

細胞の核抽出液は、Andrews らの方法によって調製した。2-5 X 10⁶ 個の細胞を氷冷した Buffer A [10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulphonic acid (HEPES)-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] 200 μl に懸濁し氷上で 5 分放置した後、ボルテックスによる混和を 10 秒行い、遠心分離 (15,000 rpm, 10 秒, 4 °C) を行った。次に、上清を除いた後、沈殿物に氷冷した Buffer C (20 mM HEPES-KOH, pH7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25 % glycerol, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) を 20 μl 加え氷上で 20 分放置した後、遠心分離 (15,000 rpm, 2 分, 4 °C) を行ない上清を回収し核タンパク質とした。タンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて定量し実験に使用した。核タンパク質は、-80 °Cで保存した。

8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA で用いた二本鎖オリゴヌクレオチドは Promega より購入した。以下にその配列を示す。

NF-κB: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

AP-1 : 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'

二本鎖オリゴヌクレオチド 1 pmol、(γ-³²P) adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Amersham Biosciences) 0.4 MBq、T4 polynucleotide kinase (Takara) 1 μl を 20 μl の系で調製し、37 °Cで 30 分反応させた。未標識のアイソトープを除くため、Push column (Stratagene) を用い精製し、得られたプローブの比活性をシンチレーションカウンターで測定した。

核タンパク質 (2 μg)、2 X binding buffer (40 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 100 mM KOH, 1mM EDTA, 10 % glycerol, 0.2 % Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM DTT, 2 mg/ml BSA Fractin V) 10 μl、1 mg/ml Poly (dI-dC) · (dI-dC) double strand (Amersham Biosciences) 2 μl そして 10 mM PMSF 1 μl を混ぜ 19 μl とし、室温で 5 分間放置後、³²P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチド (15,000-20,000 cpm) 1 μl を加え室温で 30 分結合反応を行った。スラブ型電気泳動槽に 30 分のプレランを終えた 6 % ポリアクリルアミドゲルと Running バッファー [25 mM Tris,

24.3 mM borate, 1 mM EDTA (0.5 X TBE)] をセットし、ゲルの各ウェルに一定量のサンプルを注入し、100 V の定電圧で 1 時間電気泳動を行った。泳動終了後、80 °C で 1 時間以上ゲルを乾燥させ、-80 °C でオートラジオグラフィーを行った。X 線フィルムは XAR-5 (Kodak) を使用した。

スーパーシフトアッセイを行う場合は、³²P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチドを加える前に、NF- κ B サブユニットに対する各抗体 (2 μ g) を加え、室温で 30 分反応させた。

9. Reporter gene assay

アッセイで使用した κ B サイトを繋いだ luciferase vector p [κ B] 6-Luc およびコントロール reporter pRL-TK は東京大学大学院 渡辺俊樹博士より供与していただいた。AP-1 サイトを繋いだ luciferase vector p [AP-1] 7-Luc は Stratagene より購入した。いずれのプラスミドも、コンピテント細胞 *E.coli* HB101 (Takara) に 42 °C、45 秒の熱ショックを与えて導入し、100 μ g/ml のアンピシリンを含む 100 ml の LB [1 % (w/v) トリプトン、0.5 % (w/v) 酵母エキス、1 % (w/v) NaCl] 培地にて、37 °C、一晩の振盪培養を行った。翌日、大腸菌の培養液を遠心分離して上清を除き、菌体をペレットとして回収した。その後、Plasmid Purification Kit (Promega) により精製し、1/10 濃度の TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解、260 nm での吸光度を測定しプラスミド DNA サンプルとした。

細胞を 4 X 10⁵ cells/ml に調製し、24 ウェルプレート (Costar) に播種し (500 μ l/well)、目的のプラスミド DNA は、Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) を用い製品の取扱い説明書に従って細胞内に導入した。37 °C、5 % CO₂ で一定時間インキュベートした後、細胞を回収し、1,200 rpm、5 分間の遠心分離操作で上清を除去した。PBS (-) で 1 度洗浄した後、細胞塊に 1 X Lysis バッファー (Promega) 100 μ l 加え混和し、室温で 15 分間可容化し細胞抽出液とした。その後、Dual Luciferase assay kit (Promega) を使ってルシフェラーゼレポータージーンアッセイを次の通り行った。10 μ l の細胞抽出液に 50 μ l の Luciferase Assay Reagent II を 50 μ l 加え、ホタルルシフェラーゼの発光量をルミノメーター (Lumat LB9501) で測定した。続いて、Stop & Glo Reagent 50 μ l を加え、ウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。コントロール reporter

pRL-TK の測定値を基にトランスフェクション効率を補正し、ルシフェラーゼ活性を求めた。

10. アポトーシスと caspase の活性化機構の解析

細胞の初期アポトーシスの検出は、Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences) を用いて行った。細胞を PBS (-) で洗浄、さらに Annexin V-FITC apoptosis detection kit 付属の 1 X Binding Buffer で洗浄後、細胞を 1 X Binding Buffer 200 μ l に懸濁した。続いて、Annexin V-FITC 5 μ l を加え混和し、室温暗所で 15 分間放置した。その後、フローサイトメーター (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) により解析を行った。

Hoechst 33342 は染色体 DNA と結合し、蛍光顕微鏡 (UV フィルター) 下で観察すると青色の蛍光を発し、細胞核の形態を観察することができる。アポトーシスによってみられるクロマチンの凝集や核の断片化は、細胞を 10 μ M の Hoechst 33342 で染めた後 (37 $^{\circ}$ C、15 分間、暗所)、PBS (-) で洗浄後 UV フィルターを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus BX50F) で観察した。

アポトーシスによってみられる caspase の活性化経路の解析は、caspase の特異抗体によるウェスタンブロッティング法と、caspase のインヒビターを用いた MTT Assay 法により検討した。5 X 10⁵ cells/ml に調製した細胞浮遊液に、終濃度が 20 μ M となるように caspase インヒビター を加え、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ で 1 時間インキュベートした。その後、終濃度が 10 μ g/ml となるように DHMEQ を加え、96 ウェルプレートに播種し (100 μ l/well)、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ で 24 時間インキュベートした。翌日 MTT Assay を行い、各種 caspase インヒビターを添加したサンプルと添加しなかったサンプルの細胞生存率を比較した。

11. 細胞周期 (cell-cycle) の解析

細胞 (1~7 X 10⁶ cells/ml) を PBS (-) で 2 回洗浄し、細胞塊に -20 $^{\circ}$ C で冷やした 70 %エタノール 10 ml を攪拌しながらゆっくりと徐々に加えた。4 $^{\circ}$ C で 2 時間放置した後、PBS (-) で細胞を 2 回洗浄し、0.25 mg/ml RNase A 溶液を 1 X 10⁶ 細胞に対して 1 ml 加え、37 $^{\circ}$ C で 15~60 分間インキュベーションを行なった。次に、プロピジウムイオダイド (PI) 溶液を 50 μ g/ml になるように

添加し、4 °Cで 30 分間（暗所）に放置し、その後フローサイトメーターを用いて解析した。

12. ポリアデニル酸 [Poly(A)⁺] RNA の調製

培養細胞株からの Total RNA 抽出は、ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて行なった。細胞のペレットに ISOGEN を加え激しく混和し、室温に 5 分間放置した後、1/5 vol. のクロロホルムを加え再び激しく混和した。遠心分離により上清（RNA 層）を回収した後、等量の 2-propanol を加え転倒混和し、室温に 10 分間放置し、遠心分離により Total RNA の沈澱を得た。得られた Total RNA は、80 % エタノールでリンスし風乾後、diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解した。さらに、Oligotex-dT30 super (Roche) を用いて [Poly(A)⁺] RNA の調製を行なった。Total RNA 100 μ l に等量の 2 X Elution buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.2 % sodium dodecylsulfate (SDS)] を加え混合した後、Oligotex-dT30 super を 200 μ l 加えた。65 °Cで 5 分間熱変性し、氷上で 3 分間急冷後、40 μ l の 5M NaCl を加え（終濃度 500 mM）攪拌し、37 °C で 10 分間インキュベート後、遠心分離 (15,000 rpm、室温、10 分)し上清を除去した。ペレットを 500 μ l の Washing buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 0.1 M NaCl) に懸濁し、37 °Cで 10 分間放置、続いて遠心分離 (15,000 rpm、室温、10 分)し上清を除去した。ペレットを 200 μ l の TE 緩衝液に懸濁し、65 °Cで 5 分間加熱し、Oligotex-dT30 から [Poly(A)⁺] RNA を溶出した。

遠心分離 (15,000 rpm、室温、10 分) し上清を回収後、エタノール沈澱によって [Poly(A)⁺] RNA を得た。得られた [Poly(A)⁺] RNA は、80 % エタノールでリンスし風乾後、DEPC 処理水に溶解し、分光光度計による定量を行い目的の実験に使用した。

13. プローブ DNA の作製

[Poly(A)⁺] RNA 0.5 μ g に DEPC 処理水を加え 12.7 μ l とし、70 °Cで 10 分間処理した後氷上で急冷を行なった。これに逆転写酵素付属の 5 X First strand buffer 4 μ l、0.1 M DTT 1 μ l、25 mM 4dNTPs 0.8 μ l、(dT)₁₆ primer 50 pmol そして

RNase Inhibitor (TOYOBO) 0.5 μ l を加え総量 20 μ l とした。42 $^{\circ}$ C で 2 分間反応させた後、逆転写酵素 SuperScript II (Invitrogen) 1 μ l (200U) 加え 42 $^{\circ}$ C で 50 分間インキュベートした。その後、70 $^{\circ}$ C で 15 分間の反応で逆転写酵素を失活させ cDNA を合成した。

次に、cDNA 2 μ l、2.5 mM 4dNTPs 4 μ l、10 X Ex Taq buffer 5 μ l、センスプライマー 25 pmol、アンチセンスプライマー 25 pmol、Ex Taq (Takara) 0.25 μ l に滅菌水を加え 50 μ l とし、94 $^{\circ}$ C, 1 min \rightarrow (95 $^{\circ}$ C, 30 sec \rightarrow 61 $^{\circ}$ C, 30 sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min) X 35 cycles \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 5 min の条件下で polymerase chain reaction (PCR) による増幅を行なった。各プライマーは以下のように設計した。

Bcl-xL センス: 5'-ATGTCTCAGAGCAACCGGGAG-3'

Bcl-xL アンチセンス: 5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGAGC-3'

c-FLIP センス: 5'-GCTTCCCTAGTCTAAGAGTAG-3'

c-FLIP アンチセンス: 5'-AGGATCCTTGAGACTCTTTTGG-3'

cyclin D1 (CCND1) センス: 5'-CCCAGCTGCCAGGAAGAG-3'

cyclin D1 (CCND1) アンチセンス: 5'-GGCGCCCTCAGATGTCCACG-3'

cyclin D2 (CCND2) センス: 5'-ATGGAGCTGCTGTGCCACGAG-3'

cyclin D2 (CCND2) アンチセンス: 5'-CCTCCGCTCACAGGTCGATAT-3'

アガロースゲル電気泳動により目的のサイズのバンドをゲルから切り出し、suprec-01 (Takara) を用いて DNA フラグメントを溶出した。これをエタノール沈澱で濃縮した。TA クローニングベクター (pGEM-T easy; Promega) 0.03 pmol に DNA フラグメント \sim 0.08 pmol、10 X T4DNA ligase buffer 0.5 μ l、T4 DNA ligase (Takara) 0.4 μ l と滅菌水を加え 5 μ l とし、16 $^{\circ}$ C で一晩ライゲーション反応を行なった。

次にライゲーション終了後の反応溶液はコンピテントセル *E.coli JM109* (Takara) を用いて大腸菌に導入し、個々の大腸菌クローンからプラスミド DNA を抽出し、挿入断片の有無さらにシーケンスにより塩基配列を確認し、目的のプラスミドを得た。

その後、大量調製した目的のプラスミドを制限酵素 EcoRI (Takara) で消化し、アガロースゲル電気泳動を行い目的のサイズのバンドをゲルから切り出し精製し、プローブ DNA として使用した。VEGF は東京医科歯科大学大学院 渋谷正史博士に提供していただいた。

14. ノーザンブロット法

サブマリン型電気泳動槽に 1 % ホルマリンアガロースゲルと Running バッファー (40 mM MOPS, 10 mM 酢酸ナトリウム pH 7.0, 1 mM EDTA) をセットし、ゲルの各ウェルに用意したサンプルを注入し、100 V の定電圧で約 3 時間電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、20 X SSC (3M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム) を用いたキャピラリー法によるブロッティングを一晩行なった。メンブレンは Hybond-C extra-nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience Corp.) を使用した。ブロッティング後のメンブレンは、4 X SSC でリンスした後、80 °C で 2 時間ベーキングを行ないメンブレンに RNA を固定した。ハイブリダイゼーションバックにメンブレンを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液 (6 X SSC, 1 X Denhardt's, 0.1 M NaPO₄, pH 7.0, 0.1 mg/ml 熱変性サケ精子 DNA) を加えてシールし、65 °C で 2~3 時間プレハイブリダイゼーションを行なった。プレハイブリダイゼーション終了後、メンブレンにハイブリダイゼーション溶液 (4 X SSC, 1 X Denhardt's, 0.5 % SDS, 0.1 M NaPO₄, pH 7.0, 10 % Dextran Na, 0.1 mg/mL 熱変性サケ精子 DNA) とアイソトープによって標識したプローブ ($\sim 1.0 \times 10^6$ cpm/mL) を加えてシールし、65 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。プローブ DNA 20 ng は、Random Primed DNA Labeling Kit (Roche) を用いて [α -³²P] dCTP 標識し、Sephadex 50 カラムで精製し熱変性後使用した。ハイブリダイゼーション後、Washing buffer (0.2~0.5 X SSC, 0.1 % SDS) で 2 回洗浄 (65 °C、15 分間) し、オートラジオグラフィーを -80 °C にて行なった。X 線フィルムはコダック社製の XAR-5 films を用いた。

15. *in vivo* モデルにおける DHMEQ の治療効果

実験で使用した NOD/SCID/ γ cnull (NOG) マウスは、財団法人実験動物中央研究所 (Central Institute for Experimental Animals) (川崎) より購入した。1 X 10⁷ 個の KMM-1 細胞を NOG マウスの耳周囲の皮下に接種した。DHMEQ を、12 mg/kg の条件で細胞を接種した当日あるいは腫瘍が触知できはじめた 5 日後から週に 3 回の割合で 1 ヶ月間腹腔内に投与した。コントロールマウスには、DHMEQ 処置群と全く同じ手順で、RPMI 1640 培養液 200 μ l を投与した。KMM-1 細胞接種から 1 ヶ月間経過観察し、それから腫瘍の大きさの計測や免

疫組織化学的研究を行なうために処置を施した。摘出した腫瘍は Streck Tissue Fixative (S. T. F) で固定し、パラフィン包埋ブロックとし薄切した後、ヘマトキシリンエオジン染色および VEGF 抗体を用いた免疫組織化学染色を行なった。免疫組織化学染色はペルオキシダーゼ標識のストレプトアビジンとビオチンの二次抗体の系 (DAKO) を用い、HISTOFINE Kit (ニチレイ)を使用してペルオキシダーゼの発色を検出した。

マウスを使った *in vivo* モデルの実験は、東京医科歯科大学 Md. Zahidunnabi Dewan 博士に協力していただいた。免疫組織化学的研究は、東邦大学医学部 伊藤金次博士に協力していただいた。

第3節 結果

3-1. DHMEQ の MM 細胞株に対する恒常的 NF- κ B 活性化の抑制効果

はじめに DHMEQ の MM 由来細胞株における恒常的 NF- κ B 活性化に対する効果を検討した。三種類の MM 由来細胞株 (KMM-1, U266, RPMI 8226) と、コントロールとして erythromyeloid 由来細胞株 K562 と TNF- α で刺激した Jurkat を使用した。各細胞株を 5×10^5 cell/ml に調製し、DHMEQ を $10 \mu\text{g/ml}$ となるように加え 16 時間培養した後、核タンパク質を調製して EMSA を行なった。MM 由来細胞株は、 $10 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で処理することにより恒常的 NF- κ B の結合活性が完全に阻害された (Figure 4A)。さらに luciferase vector p [κ B] 6-Luc および p [AP-1] 7-Luc による reporter gene assay の結果から、DHMEQ は NF- κ B の転写を特異的に抑制することが明らかとなった (Figure 4B)。 $10 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ 添加後、1-16 時間まで 6 ポイントにおける時間経過を検討したところ、DHMEQ 添加後 1 時間で NF- κ B の結合活性はほぼ完全に阻害されていた (Figure 4C)。コントロールの AP-1 の結合活性には影響はほとんど認められなかった。

恒常的に活性化している NF- κ B 複合体の構成タンパク質を解析するために、3 種類の MM 由来細胞株の核タンパク質を用いて EMSA による スーパーシフトアッセイ を行った。いずれの細胞株においても活性化 NF- κ B の構成タンパク質は、p65、p50 そして RelB を含んでいた (Figure 4D)。さらに KMM-1 細胞を $10 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 16 時間処理し、活性化 NF- κ B p65 抗体染色による蛍光顕微鏡での観察結果では p65 は主に細胞質に集積した。したがって、DHMEQ は活性化 NF- κ B の核移行を阻害することが明らかとなった (Figure 4E)。

以上より、DHMEQ は MM 細胞において NF- κ B の恒常的活性化を DNA 結合、転写レベルで阻害し、これは NF- κ B の核移行阻害作用を伴っていることが示された。

3-2. DHMEQ によるアポトーシスの誘導

MM 由来細胞株の増殖に NF- κ B の恒常的活性化が重要であることを示すた

めに、細胞生存率に及ぼす DHMEQ の効果を調べた。MTT アッセイの結果から、DHMEQ 処理により三種類の MM 由来細胞の細胞生存率は明らかに低下し、その生存率の低下は DHMEQ の濃度や処理時間に依存していることが明らかとなった。一方、NF- κ B の恒常的活性化のみられない K562 細胞株では、高濃度の処理によっても細胞生存率はほとんど影響を受けなかった (Figure 5A & 5B)。

次に DHMEQ が MM 由来細胞株に対してアポトーシスを誘導できるかどうかを調べた。一般に正常細胞では、細胞膜内外のリン脂質は不均等に分布し、ホスファチジルセリン (PS) は内側に存在する。アポトーシスの過程で PS が細胞膜表層に露出するようになる。Annexin V は PS とカルシウム存在下で強固に結合するタンパク質であり、FITC で標識した Annexin V を使用することによりフローサイトメーターで容易に検出可能となる。アポトーシス検出の手段として、Annexin V 陽性細胞をフローサイトメーター法により測定した。DHMEQ 処理 0、24、48 時間後測定したところ、時間の経過とともに Annexin V 陽性細胞が増加していることが示された (Figure 5C)。また、NF- κ B の恒常的活性化のある MM 由来細胞株では DHMEQ 処理後の核の断片化やクロマチンの凝集が確認された (Figure 5D)。さらに、フローサイトメーター法により DNA 含量を測定した結果、DHMEQ 処理により MM 細胞の細胞周期は G0/G1 phase で停まっていることが明らかとなった (Figure 5E)。以上の結果から、MM 由来細胞株でみられる NF- κ B の恒常的活性化を阻害することで細胞増殖を抑制し、細胞周期 G0/G1 phase の蓄積そしてアポトーシス誘導されることが示された。

3-3. Caspase の活性化によるアポトーシスの誘導

DHMEQ 処理による MM 由来細胞株に対するアポトーシスの誘導には、カスパーゼの活性化を伴っていることを確認するために、まずはじめにカスパーゼ 3 の活性化をウエスタンブロット法により解析した。KMM-1 細胞を 10 μ g/ml の DHMEQ で 0、4、8、12 時間処理し細胞抽出液を得た。ウエスタンブロット法による解析結果から、DHMEQ 処理後時間の経過とともにカスパーゼ 3 の活性化に伴う 32 kDa のプロカスパーゼの減少と、21 kDa の切断されたカスパーゼ 3 の増加が確認された (Figure 6A)。このことから、DHMEQ に

よって誘導されるアポトーシスは、カスパーゼカスケードの活性化が関係していることが示唆された。

脊椎動物においてはデスリガンド-デスレセプターを介したアポトーシス誘導経路 (カスパーゼ 8) と、ミトコンドリアで Bcl-2 ファミリーにより制御を受ける経路 (カスパーゼ 9) の少なくとも 2 つの経路の存在が報告されている。次に、DHMEQ 処理によるカスパーゼ 3 の上流のカスパーゼ 8 とカスパーゼ 9 の活性化についてウエスタンブロット法により解析を行なった。DHMEQ 処理した KMM-1 細胞では、時間の経過とともにカスパーゼの活性化に伴うプロセッシングによるカスパーゼフラグメントの増加が、カスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 とともに確認された (Figure 6B)。

これらの結果を踏まえ、DHMEQ 処理によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼ 阻害剤によって抑制することができるかどうかを検討した。各々のカスパーゼ阻害剤を $20 \mu\text{M}$ となるように添加し 1 時間反応させた後、 $5 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 18 時間処理し MTT アッセイにより細胞の生存率を求めた。細胞の生存率が完全に回復することはないにしても、3 種類のカスパーゼ 阻害剤によって明らかなアポトーシスの抑制がみられた (Figure 6C)。以上の結果より、DHMEQ によって誘導されるアポトーシスには、デスリガンド-デスレセプターを介した膜系のアポトーシス誘導経路およびミトコンドリアで Bcl-2 ファミリーにより制御を受けるミトコンドリア系の二つの経路がかかわっていることが示唆された。

3-4. DHMEQ に反応する NF- κ B 関連遺伝子の負の制御

転写因子 NF- κ B は、細胞周期やアポトーシスにかかわる遺伝子の発現をコントロールしている。次に、Bcl-xL や c-FLIP など抗アポトーシス作用を有する分子と cyclin D1 や cyclin D2 など細胞周期を調節する分子など、NF- κ B によって調節される遺伝子の発現変化を調べた。それと同時に、MM 細胞で高発現しておりかつ NF- κ B が標的遺伝子と考えられている VEGF の発現もノーザンブロット法により検討した。 $10 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 16 時間処理した RPMI 8226 細胞の [Poly(A)⁺] RNA $2 \mu\text{g}$ をノーザンブロットに用いた。Bcl-xL、c-FLIP、cyclin D1、cyclin D2 そして VEGF の mRNA レベルの発現は、DHMEQ により負の制御を受けていることが明らかとなった (Figure 7A)。さらにコント

ロールとして用いた glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と前述の各 mRNA のシグナルをデンシトメーターで測定し定量的に解析したところ、DHMEQ により Bcl-xL、c-FLIP、cyclin D1、cyclin D2 そして VEGF の発現レベルは、四分の一程度にまで低下していることが明らかとなった (Figure 7B)。これらの結果を踏まえ、タンパクレベルでの発現を免疫蛍光染色法によって検討した。mRNA の発現レベルと同様に、Bcl-xL、c-FLIP、cyclin D2 そして VEGF の発現は、DHMEQ により負の制御を受けていることが明らかとなった (Figure 7C)。以上の結果から、MM 細胞で DHMEQ により誘導されるアポトーシスは、NF- κ B の抗アポトーシスにかかわる分子群の発現低下や、G0/G1 期から S 期へ向かう細胞周期の停止そして血管新生の抑制が伴っていることが示唆された。しかしここで得られた結果は、NF- κ B に依存する遺伝子のダウンレギュレーションは、DHMEQ により NF- κ B 活性を阻害することで間接的に起こっているという可能性を否定できない。

3-5. 新鮮 MM 細胞に対する DHMEQ の効果

恒常的な NF- κ B の活性化は、新鮮 MM 細胞においても証明されている。次に、実際 DHMEQ は患者新鮮 MM 細胞に対して NF- κ B の恒常的活性化や細胞増殖を阻害できるかどうかを検討した。調べた全ての患者新鮮 MM 細胞で、NF- κ B の強い DNA 結合活性化が認められた。しかし 10 μ g/ml の DHMEQ で 16 時間処理することで、NF- κ B の DNA 結合活性化能は完全に失われた (Figure 8A, left panel)。細胞株同様に恒常的に活性化している NF- κ B 複合体の構成タンパク質を解析することを目的に、新鮮 MM 細胞の核タンパク質を用いてスーパーシフト EMSA を行った。活性化 NF- κ B の構成タンパク質は、p65 および p50 を含んでいることが明らかとなった (Figure 8A, right panel)。正常末梢血単核球 (PBMC) でも NF- κ B の恒常的活性化が示されたが、MM 細胞とは異なり 10 μ g/ml の DHMEQ で 16 時間処理したにもかかわらず、NF- κ B の DNA 結合活性化はほとんど失われることがなかった。そして正常 PBMC の活性化 NF- κ B の構成タンパク質は、p50 が主でこの点も MM 細胞とは異なっていた。正常 PBMC に対する DHMEQ の効果を評価するためにオートラジオグラフィーを長時間行なってみたが、p65 の存在は否定された (Figure 8B)。3 検体の新鮮 MM 細胞の生存率に対する DHMEQ の影響を検討

したところ、 $10\ \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 48 時間処理することにより細胞生存率が 50 %以下にまで低下した。一方、コントロールとして用いた正常 PBMC の細胞生存率には、ほとんど影響がないことが明らかとなった (Figure 8C)。さらに、ヘキスト 33342 染色により核の形態を観察したところ、正常 PBMC においては何の変化も認められなかったにもかかわらず、新鮮 MM 細胞ではアポトーシスの特徴でみられる核の断片化やクロマチンの凝集が認められた (Figure 8D)。以上の結果から、DHMEQ による完全な NF- κ B の阻害は MM 細胞に選択的であり、その結果アポトーシスを誘導することを示唆している。

3-6. NOG マウスを用いた *in vivo* モデル系における DHMEQ の影響

これまでの *in vitro* の実験結果から、DHMEQ は MM 患者の治療に対して有効である可能性が示唆された。そこで、NOG マウスを用いた *in vivo* モデル系において、DHMEQ 処置により移植された MM 細胞の増殖を抑制できるかどうかを検討した。 1×10^7 個の KMM-1 細胞を接種した後、 $12\ \text{mg/kg}$ の DHMEQ を 1 週間に 3 回投与を継続した。DHMEQ を投与したマウス群では、腫瘍は明らかに縮小していた (Figure 9A)。DHMEQ を投与したマウス群での腫瘍の大きさや腫瘍の重量は有意に減少しており、コントロールマウス群と比較すると約三分の一程度になっていることが示された (Figure 9B)。さらに、 1×10^7 個の KMM-1 細胞を接種してから 5 日経った後、つまり腫瘍が触知できるようになってから $12\ \text{mg/kg}$ の DHMEQ を 1 週間に 3 回投与を行った結果においても、コントロールマウス群と比較すると腫瘍の容積は約三分の一程度になっていることが示された (Figure 9C)。DHMEQ で処置したマウスの状態は、毛の逆立ち、体重減少や悪液質などの副作用は認められず十分耐容性があることが示唆された。これらの結果から、DHMEQ はマウスの生体内においても増殖する MM 細胞の増殖を抑制できることが示された。DHMEQ 投与マウスから回収した腫瘍のヘマトキシリンエオジン染色像を解析したところ、組織が繊維化しアポトーシスを起こした細胞がみられ、血管新生も起こっていないことが確認された (Figure 9D upper panel)。ヒト VEGF 抗体による免疫組織化学染色を行なったところ、DHMEQ で処置したマウスの腫瘍では、コントロールマウスと比較して明らかに VEGF の産生が押さえられていることが明らかとなった (Figure 9D lower panel)。

第4節 考察

現在臨床では従来の多剤化学療法、免疫療法（ミニ移植）やサリドマイドによる治療が行なわれている。サリドマイドの有効性については、1999年アメリカのアーカンソーがん研究所から最初の報告があった。サリドマイドの単剤投与により30～60%の症例にMタンパクの減少が認められ、従来の化学治療とは異なった側面から、癌細胞を死滅させる効果を発揮していることが示唆された。また開発されて間もない薬として、プロテアソーム阻害剤（ボルテゾミブ：商品名VELCADE）、サリドマイド類似体（CC-5013：商品名Revimid）、砒素三酸化物（商品名Trisenox）などが挙げられるが、その効果がサリドマイドを超えるものになるかどうかはまだわかっていない(34)。また、NF- κ B p50の核移行シグナルをマスクするペプチドSN-50により、MM細胞にアポトーシスを誘導するという報告もある(35)。本研究では、新規NF- κ B阻害剤DHMEQによるMM細胞に対するNF- κ Bの恒常的活性化の抑制やアポトーシス誘導、さらに*in vivo*モデルにおけるDHMEQの効果を調べることにより、DHMEQが多発性骨髄腫の分子標的治療薬として有効かどうか検討した。

本研究ではDHMEQがMM細胞に対しNF- κ Bの強い恒常的活性化を阻害し、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを示した(Figure 5)。これに対しコントロールとした正常抹消血(PBMC)には明らかな影響はなく、かつNF- κ B活性の阻害も明らかではなかった(Figure 8)。また、KMM-1細胞を接種したNOGマウスにDHMEQを投与することで、KMM-1細胞の増殖を阻害することも可能であった(Figure 9)。他のNF- κ B阻害剤と比較してみると、DHMEQはp65を含むNF- κ Bの核移行を阻害し、腫瘍のNF- κ B活性を選択的に標的とするユニークな低分子化合物であることが示唆された。

これまでdexamethasone、プロテアソーム阻害剤や砒素三酸化物がMMに対して有用であるとの報告があるが、NF- κ B活性の阻害効果はこれらの薬剤の部分活性であり、NF- κ B阻害単独でMM細胞にアポトーシスを誘導できるかについては必ずしも明らかではなかった(34)。NF- κ B p50の核移行シグナルをマスクするペプチドSN-50を用いた最近の研究で、NF- κ Bの阻害のみでMM細胞にアポトーシスを誘導できるという結果が報告された(35)。本研究の結果とあわせ、NF- κ B単独の阻害のみでMM細胞にアポトーシスを誘導できることが示された。

さらに本研究の結果から、アポトーシス、細胞周期そして血管新生をコントロールするような NF- κ B に依存している遺伝子群の発現も、DHMEQ により負の制御を受けることが示唆された (Figure 7)。デスレセプターがアポトーシスの刺激を受けるとアダプター分子を介してカスパーゼ 8 が活性化、ひき続きカスパーゼ 3 が活性化しアポトーシスが実行される。DISC (デスレセプター、アダプターとカスパーゼの複合体) においてプロカスパーゼのリクルートと活性化を阻止する分子として FLIP (FADD-like ICE inhibitory protein) が知られている。また、ミトコンドリアがアポトーシスの刺激を受けるとその膜透過性が亢進し、細胞質にシトクロム c が漏出され、漏出したシトクロム c は ATP と Apaf-1 と共同でイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ 9 を活性化、ひき続きカスパーゼ 3 が活性化しアポトーシスが実行される。Bcl-2 や Bcl-xL のなどアポトーシスを抑制する因子はミトコンドリアの膜透過性を制御し、シトクロム c の漏出を調節することでアポトーシスシグナルの on/off を決定していることが知られている。DHMEQ による c-FLIP や Bcl-xL のダウンレギュレーションの結果、カスパーゼ 8 やカスパーゼ 9 の経路が活性化しアポトーシスを誘導していることが考えられる (36)。従って、MM 細胞においてはアポトーシスから回避するために c-FLIP や Bcl-xL などの抗アポトーシス分子の誘導が盛んに行なわれていることが推測される。また、DHMEQ 処理した MM 細胞は、細胞周期 G0/G1 期の蓄積がみられた。この原因は細胞周期の G0/G1 期 から S 期に進めるのを直接調節している分子である cyclin D1 と cyclin D2 のダウンレギュレーションによるものである。この cyclin D1 と cyclin D2 の発現も NF- κ B に作用されている (37-39)。

さらに本研究において、MM 細胞での 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) も NF- κ B により調節されている可能性が示された (Figure 7)。VEGF は血管新生にかかわる重要な因子の一つとして知られており、Neufeld や Gupta らの報告によると、骨髄中の新たな血管新生により MM 細胞の増殖が助けられていると考えられている (32, 40)。Podar らにより VEGF はヒト MM 細胞の増殖を誘導して転移を誘導することが示され、MM 細胞の維持と増殖にかかわる VEGF のオートクラインループがあることが示唆されている (31)。本研究において、DHMEQ は MM 細胞株に対して VEGF の発現を抑制することが示された。したがって MM 細胞での VEGF は NF- κ B に依存して制御されていることが示唆される。最近の Kiriakidis らによ

る VEGF の発現が NF- κ B に依存しているという報告は本研究の結果を支持するものである (33)。DHMEQ による MM 細胞における VEGF 発現の抑制は、骨髄中での血管新生の阻害を介した VEGF のオートクラインループの阻害をもたらすと考えられる。これらの結果は MM 細胞において NF- κ B が重要な役割を果たしていることを示し、治療における分子標的としての NF- κ B の重要性を示唆している。

Bureau らは、PBMC の恒常的 NF- κ B の活性化は低レベルで保たれていることを報告している (41)。しかし、DHMEQ の PBMC に対する効果を検討した結果、PBMC の NF- κ B 活性や細胞生存率は DHMEQ によりほとんど影響を受けないことが示された (Figure 8)。これらの結果から、正常 PBMC と MM 細胞で NF- κ B の構成タンパク質の違いにより、DHMEQ に対する感受性の違いが生じていることが推察された。事実 MM 細胞の恒常的に活性化している NF- κ B の構成タンパク質は p65 を含んでいたが、正常 PBMC では p65 を含んでいなかった。このように DHMEQ に対する感受性の違いは NF- κ B の構成タンパク質の違いによるのではないかと考えられた。正常細胞において NF- κ B p65 は細胞外からの刺激に反応して活性化し、p65/p50 のヘテロダイマーが核内において細胞の活性化、増殖、分化などにかかわる標的遺伝子の発現誘導という重要な役割を演じている。NF- κ B p65/p50 のヘテロダイマーによって担われている生体内での応答を DHMEQ が止めることで、正常細胞にまで悪影響を及ぼすかもしれない可能性が考えられた (42)。しかし、恒常的 NF- κ B 活性化を示すが DHMEQ 処理に対してアポトーシス抵抗性を示す細胞株における観察で、NF- κ B 活性は DHMEQ 処理後 24-48 時間で通常ベースのレベルにまで回復し、NF- κ B に対する DHMEQ の阻害効果は、培養細胞の効果としては一過性であった (データ未提示)。DHMEQ の一過性で可逆的な作用機序はユニークな特性であり、NF- κ B の通常の生物学的特性に対しての阻害作用は最小限にとどめられる可能性が高く、DHMEQ の毒性は低いと考えられる。この可能性はマウスを用いた *in vivo* モデル実験でも示唆されている (Figure 9)。DHMEQ で処置したマウスは体重減少のような重大な副作用の徴候は一つも示さなかった。今回の実験における 12 mg/kg を 1 週間に 3 回の投与量は、中間致死量 (LD₅₀) の 180 mg/kg にほど遠い量であった (データ未提示)。現時点で薬物動態はまだ十分解析できてはいないが、*in vivo* モデル実験の結果から DHMEQ の有効量での毒性が明らかでなく、MM 細胞の恒常的 NF- κ B の活性化を標的とす

る臨床応用可能な将来有望な薬であることが示唆された。

本研究においてこれまで明らかにしてきたように、正常 PBMC に対して毒性がほとんどみられないという点で、DHMEQ は MM 細胞における NF- κ B の恒常的活性化を標的とする、将来有望な新規 NF- κ B 阻害剤の候補のひとつであることが認識された。特異性、低毒性そして臨床応用に適した特性をバランスよく持つ DHMEQ により、多発性骨髄腫の予後の大きな改善が期待できると考える。DHMEQ の作用機序や薬物動態の解析をさらに進めることによって、MM 患者に対し将来的に臨床試験の道を提供できる可能性があることを期待する。

第3章 成人 T 細胞性白血病／リンパ腫 (ATL) に対する NF- κ B 阻害剤の応用

I. 序論

成人 T 細胞性白血病／リンパ腫 (adult T cell leukemia/ lymphoma; ATL) は、ヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型 (human T cell leukemia virus type 1; HTLV-I) が原因となって発症する化学療法抵抗性の極めて予後不良なリンパ系腫瘍である。HTLV-1 は主に母乳中のリンパ球を介しての垂直感染により伝播する。患者の多くは 60 歳以上である。CD4 陽性 T 細胞への感染後、HTLV-1 は逆転写酵素によりウイルス RNA から二重鎖 DNA を合成、宿主細胞 DNA にプロウイルスとして組み込まれる。大多数の ATL 細胞は通常細胞当たり 1 コピーのプロウイルスを持っている。HTLV-I は 5' と 3' の二つの LTR 領域とその間に存在する gag, pol, env 領域から成り、gag, pol, env 領域はそれぞれ構造タンパク質、逆転写酵素とウイルス外被をコードする。LTR 領域はウイルス遺伝子発現のためのプロモーターとして機能する (15, 43)。

HTLV-1 は感染細胞のクローナルな増殖を誘導するが、HTLV-1 による感染 T リンパ球の腫瘍化機構についてはまだ明らかになっていない。発症までには約 60 年の長い臨床的潜伏期間が存在する。発症年齢分布の疫学的解析に基づく検討では、発症には少なくとも 5 つのトランスフォーメーションにかかわるイベントの蓄積が必要とされている。env と 3' LTR 領域によりコードされている tax, rex, p12, p30, p21 は HTLV-1 感染細胞の増殖にかかわる。なかでも tax は HTLV-1 感染細胞の増殖とトランスフォーメーションに主要な役割を果たしている。tax は LTR 領域の活性化によるウイルス遺伝子の発現のみならず細胞性因子にも作用し、宿主細胞にも影響を与える。これらの相互作用は、アポトーシス、細胞周期異常さらには DNA 修復の系を阻害し染色体の数および質的不安定性を誘導するという報告もある (15, 43)。

tax は HTLV-1 感染細胞の増殖とトランスフォーメーションに中心的な役割を果たすが、tax を含む HTLV-1 の発現は ATL 細胞においては強く抑制されている。この事実は長い潜伏期間の間の脱制御の蓄積により HTLV-1 感染細胞が tax に依存しない増殖様式を獲得したことを示唆している。HTLV-1 感染後、感染細胞は tax に依存し、クローナルに増殖を始めるが、tax 発現細胞はやが

て細胞障害性 T 細胞の標的となり、増殖が抑制される。脱制御は tax 依存性のクローナルな増殖と、細胞障害性 T 細胞による抑制の間に蓄積し、この過程の中で感染細胞はしだいに tax に依存しない増殖様式を獲得していくことになる (15) (Figure 10)。

組み込まれたプロウイルスの構造については、古くから欠損型が存在することが知られ、ATL 細胞で HTLV-1 の発現抑制の原因と考えられている。欠損型のプロウイルスを持つ症例の割合が 30~40% であること、欠損型のプロウイルスは共通して 5' の gag-pol 領域を欠失しているが、5' LTR が保存されているものといないものの二種類が存在することが明らかにされた。また、欠損型のプロウイルスは急性型やリンパ腫型に多くみられる傾向や、予後不良の患者に多いことなどが報告されている (44, 45)。さらに、ATL 細胞に組み込まれたプロウイルス LTR のメチル化解析により、HTLV-1 プロウイルスの遺伝子発現は 5' LTR のメチル化というエピジェネティックな修飾でも抑制されていることが明らかになった (46)。

HTLV-1 tax が NF- κ B の恒常的活性化に関与していることはこれまでに詳細な検討がなされている。さらに、ヒト T 細胞に tax を導入した解析で、NF- κ B の活性化が細胞の不死化に重要であるとの報告がされている。HTLV-1 tax は主に I κ B kinase γ (IKK γ) との結合を介して NF- κ B を活性化すると考えられる (47, 48)。発症した ATL での新鮮 ATL 細胞やそれに由来する ATL 細胞株ではウイルス遺伝子とともに tax の発現は抑制されている (49, 50)。したがって tax は ATL 発症のある段階で腫瘍化に重要な働きをしていると考えられる。

近年、HTLV-1 感染細胞のみならず新鮮 ATL 細胞を用いて、ATL 細胞におけるシグナル伝達異常の解析を行った報告がみられる。核内の転写因子では、調べられた全ての症例 ATL 細胞で、NF- κ B の恒常的活性化が認められた (51)。このことは ATL 細胞や ATL 由来 T 細胞株において tax 非存在下での NF- κ B 経路の恒常的活性化が存在することを示唆する。NF- κ B は細胞増殖や浸潤、抗アポトーシスに関わる分子群を誘導し、ATL の分子基盤を形成していると考えられる (11)。NF- κ B の活性をアデノウイルスに組み込んだ I κ B α 変異体で阻害すると、ATL 細胞がアポトーシスに陥ることから、NF- κ B の活性が ATL 細胞の生存と増殖に必須であると考えられた。ATL 発症前の HTLV-1 細胞における恒常的 NF- κ B 活性化について検討した報告はないが、もし

NF- κ B 活性化が HTLV-1 感染細胞においてすでに認められるのであれば、発症予防の分子標的となる可能性がある。

ATL は疾患の概念が確立してから 20 年以上経た現在においても、最も予後の悪い疾患のひとつである。多剤化学療法は 1987 年から実施され、予後は徐々に改善されてきているが、十分な治療成績は期待できていない (52)。血液系悪性腫瘍の治療選択肢に同種造血幹細胞移植があげられるが、発症年齢の高さから ATL ではその適応は限られている。ミニ移植についても ATL の化学療法抵抗性と臓器障害により解決すべき課題は多いと考えられる。NF- κ B 阻害剤の ATL への効果については、IKK の阻害剤である Bay11-7082 や ACHP、プロテアソーム阻害剤である PS341 による基礎的検討をはじめとして複数の報告があるが、臨床応用へのハードルはクリアできていない (53-55)。このような背景にあつて ATL に対する有効な治療法、さらにはその発症予防法の開発は、血液系悪性腫瘍領域の残された大きな課題のひとつなのである。

以上の背景を踏まえ、本研究では新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の ATL 細胞や ATL 由来 T 細胞株における NF- κ B に対する特異性、NF- κ B 阻害作用、ATL 細胞へのアポトーシス誘導さらには正常細胞に対する毒性などを調べ、ATL における治療と化学予防の基礎的検討を行った。

第2節 実験材料と方法

1. 試薬

DHMEQ は、慶應義塾大学理工学部 梅澤一夫博士より提供していただいた。カスパーゼ3インヒビター; Z-Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-FMK、カスパーゼ8インヒビター; Z-Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-FMK およびカスパーゼ9インヒビター; Z-Leu-Glu (OMe)-His-Asp (OMe) (LEHD)-FMK は全て Calbiochem より購入した。DHMEQ およびカスパーゼインヒビターはジメチルスルフォキシド (DMSO) (和光) に溶解し、-20 °Cで保存した。細胞生存率を測定する際に用いた 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium (MTT) (SIGNA) は、PBS (-) で 5 mg/ml の濃度に希釈し、-20 °Cで保存した。アポトーシス検出の際に用いた Hoechst 33342 (Calbiochem) は PBS (-) に溶解し、4 °Cで保存した。細胞の核染色に用いた TO-PRO-3 Iodide はフナコシより購入し、-20 °Cで保存した。細胞周期 (cell-cycle) の解析で使用した RNase A は日本ジーンより、そしてプロピジウムイオダイド (PI) は SIGMA より購入した。

2. 抗体

ウェスタンブロッティング法や免疫蛍光染色法に用いた一次抗体は以下のとおりである。抗 NF- κ B p50 (C-19) ヤギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p65 (C-20) ウサギポリクローナル抗体、抗 cyclin D1 (HD11) ウサギポリクローナル抗体、抗 Bcl-xL (H-62) ウサギポリクローナル抗体、抗 c-myc (9E10) マウスモノクローナル抗体、抗 FLICE inhibitory protein, long and short isoform (FLIPS/L) (H-202) ウサギポリクローナル抗体、抗 interleukin-2-receptor- α (IL-2R α) (M19) ウサギポリクローナル抗体そして抗 α tubulin (TU-02) マウス immunoglobulin M (IgM) モノクローナル抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。

supershift EMSA に用いた抗 NF- κ B p50 (C-19) ヤギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p65 (C-20) ウサギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p52 (C-5) マウスモノクローナル抗体、抗 c-Rel (B-6) マウスモノクローナル抗体そして抗 RelB (C-19)ウサギポリクローナル抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。

細胞周期のチェックポイントを検出する抗 phospho-Rb (Ser795) ウサギポリ

クローナル抗体、抗 phospho-Rb (Ser807/811) ウサギポリクローナル抗体、抗 phospho-p53 (Ser15) マウスモノクローナル抗体は全て Cell Signaling Technology より購入した。

アポトーシスとその経路を検出するための抗 caspase-3/ CPP32 マウスモノクローナル抗体は BD Biosciences より、抗 cleaved caspase-8 (Asp384) ウサギポリクローナル抗体と抗 cleaved caspase-9 (Asp330) ウサギポリクローナル抗体は Cell Signaling Technology より購入した。

HTLV-1 p19 antigen の発現を確認するための抗 HTLV-1 p19 マウスモノクローナル抗体は、Chemicon International より購入した。

活性化 NF- κ B p65 を検出できる抗 NF- κ B p65 マウスモノクローナル抗体は、Chemicon International より購入した。

ウエスタンブロットティング法に用いた二次抗体は以下のとおりである。Alkaline Phosphatase Conjugate 抗マウス innumoglobulin G (IgG) (H+L) 抗体および Alkaline Phosphatase Conjugate 抗ウサギ IgG (Fc) 抗体はプロメガ (Promega) より、Alkaline Phosphatase Conjugate 抗マウス IgM 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

免疫蛍光染色法に用いた二次抗体は以下のとおりである。fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、FITC-labeled ロバ抗ヤギ IgG 抗体および FITC-labeled ヤギ抗マウス IgG 抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。HTLV-1 p19 マウスモノクローナル抗体に対する二次抗体は、Cappel より購入した FITC-conjugated 抗マウス IgG 抗体を使用した。

3. 細胞株と細胞培養

Jurkat (T cell) 細胞株と K562 (erythromyeloid-cell) 細胞株は JCRB (Japanese Cancer Research Resources Bank)より、MT-1 細胞株と MT-2 細胞株は高知大学 第三内科 三好勇夫博士より、TL-Om1 細胞株は東北大学 菅村和夫博士より、そして ST-1 細胞株と KK-1 細胞株は長崎大学 山田恭暉博士より供与していただいた。MT-1 細胞と TL-Om1 細胞は ATL 患者の白血病細胞より分離され、HTLV-1 は産生していない細胞株である。一方、MT-2 細胞は ATL 患者の末梢血単核球と臍帯血リンパ球と一緒に培養して分離され、HTLV-1 を産生してい

る細胞株である。ATL 患者、ATL キャリアおよび健常人ボランティアからの末梢血単核球 (PBMC) は、ヘルシンキ条約に基づく同意書を得て提供していただいた。ATL 患者および ATL キャリアの検体は全て東京大学大学院 渡辺俊樹博士より供与していただいた。ヘパリン採血した末梢血を PBS (-) で 2 倍に希釈し、これを、等量のヒト単核球分離液 Lymphoprep (第一化学薬品株式会社) に重層して遠心分離 (2,000 rpm, 30 分、室温) し、中間層の単核球分画を回収し、PBS (-) で 2 回洗浄後使用した。全ての細胞株、ATL 患者、ATL キャリアおよび健常人ボランティアからの末梢血単核球は、56 °C で 30 分間非働化した 10 % の子牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (SIGMA) に抗生物質としてペニシリン G (100 u/ml) (GIBCO) とストレプトマイシン (100 μ g/ml) (GIBCO) を添加したものを培養液として用いた。細胞はプラスチック製の培養フラスコを使用し、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター中で培養した。細胞株の継代は 1 対 4 から 1 対 9 の割合で細胞浮遊液を新しい培養液に加え培養した。細胞の凍結保存はセルバンカー (十慈フィールド株式会社) を用い、ディープフリーザーにて行った。

4. 動物

オスの C.B17-scid/scid (SCID) マウスは、チャールズリバーより購入した。

5. 細胞増殖アッセイ (MTT Assay 法)

細胞株、ATL 患者、健常人ボランティアからの末梢血単核球を 5×10^5 cells/ml に調製し、96 ウェルプレート (Costar) に播種し (100 μ l/well)、一定濃度の DHMEQ を添加し、37 °C、5 % CO₂ で一定時間インキュベートした。次に、MTT 溶液を各ウェルに 10 μ l ずつ加え、37 °C で 4 時間インキュベートした。その後、イソプロピルアルコールで希釈した 0.04 N HCl を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、ピペッティングによりホルマザン沈澱を十分に溶解させた後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により波長 570 nm で吸光度を測定した。コントロールとしてジメチルスルフォキシド (DMSO) を添加した検体の生存率を 100 % とし、各種濃度の DHMEQ を添加した時の細胞生存率を求めた。

6. ウェスタンブロッティング

回収した細胞を PBS (-) で 2 度洗浄した後、Cell Lysis バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 % sodium dodecylsulphate (SDS), 1mM sodinu orthovanadate (V), 0.1 mM sodium molybdate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] を加えピペッティングにより溶解後、100 °C で 5 分間煮沸した。次にボルテックスで激しく混和し、得られた細胞懸濁液を 15,000 rpm、10 分間の遠心分離操作を行い上清を回収することで不溶物を取り除いた後、タンパク質濃度を DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) で測定した。タンパク質溶液は -80 °C で保存した。一定量のタンパク質に 5 X Sample バッファー [0.31 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % (w/v) sodium dodecylsulphate (SDS), 35 % (v/v) glycerol, 0.025 % (w/v) bromophenol blue, 25 % 2-mercaptoethanol] を 1 X になるように加え、100 °C で 5 分間煮沸し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のサンプルとした。

スラブ型電気泳動槽にポリアクリルアミドゲル (テフコ) と Running バッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS) をセットし、ゲルの各ウェルに用意したサンプルを注入し、15~25 mA の定電流で電気泳動を行った。色素がゲルの先端近くまで移動したところで泳動を終了し、ゲルを取り外し転写バッファー (125 mM Tris, 960 mM glycine, 20 % メタノール) に浸した。メタノール次に転写バッファー に浸したポリビニリデンジフロリド (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) とゲルをセミドライブロッティング装置 (日本エイドー) にセットし、180 mA の定電流で 2~3 時間ゲル中のタンパク質をメンブレンに転写した。

転写後のメンブレンは超純水で 3 回洗った後、5 % (w/v) スキムミルク (雪印) を含む TBST バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) により室温で 2 時間振盪し、ブロッッキングを行った。ブロッッキングを行ったメンブレンは、ブロッッキングバッファー で希釈した 1~2 $\mu\text{g/ml}$ の一次抗体と 4 °C で一晩反応させた。続いて TBST バッファー で 10 分間振盪しながらの洗浄を 3 回繰り返した。次に、TBST バッファー で希釈した二次抗体とメンブレンを室温で 1 時間振盪反応させ、TBST バッファー で 10 分間振盪しながらの洗浄を 3 回繰り返した。最後に Tween 20 を含まない TBS バッファー で 2 回、超純水で 1 回リンスし、Western Blue (Promega) により発色反

応を行った。

7. Immunohistochemistry

PBS (-) で 2 回洗浄した細胞は、PBS (-) に再懸濁させ、Auto smear (Sakura) を使ってサイトスピンし、スライドグラス (Matsunami) にはり付けた。十分に風乾させた後、室温で 10 分間メタノール固定を行った。次に、PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS (-) で $4\ \mu\text{g/ml}$ に希釈した一次抗体 $60\ \mu\text{l}$ を加え、 $4\ ^\circ\text{C}$ で一晩反応させた。続いて、PBS(-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS(-) で $4\ \mu\text{g/ml}$ に希釈した二次抗体 $60\ \mu\text{l}$ を加え、 $37\ ^\circ\text{C}$ で 30 分間暗所で反応させた。再び PBS(-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、Perma Fluor Aquaqueous Mounting Medium (日本ターナー株式会社) を用いて封入した。観察までは蛍光の退色を防ぐため、冷暗所に保存した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 Radiance 2000 (Bio-Rad) を用いて行い、画像処理は Photoshop にて行った。

8. 核タンパク質の調製

細胞の核抽出液は、Andrews らの方法によって調製した。 $2\sim 5 \times 10^5$ 個の細胞を氷冷した Buffer A [$10\ \text{mM}$ N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulphonic acid (HEPES)-KOH, $\text{pH}7.9$, $10\ \text{mM}$ KCl, $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0.5\ \text{mM}$ dithiothreitol (DTT), $0.2\ \text{mM}$ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] $200\ \mu\text{l}$ に懸濁し氷上で 5 分放置した後、ミキシングを 10 秒行い、遠心分離 ($15,000\ \text{rpm}$, 10 秒, $4\ ^\circ\text{C}$) を行った。次に、上清を除いた後、沈殿物に氷冷した Buffer C ($20\ \text{mM}$ HEPES-KOH, $\text{pH}7.9$, $420\ \text{mM}$ NaCl, $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , 25 % glycerol, $0.5\ \text{mM}$ DTT, $0.2\ \text{mM}$ PMSF) を $20\ \mu\text{l}$ 加え氷上で 20 分放置した後、遠心分離 ($15,000\ \text{rpm}$, 2 分, $4\ ^\circ\text{C}$) を行ない上清を回収し核タンパク質とした。タンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて定量し実験に使用した。核タンパク質は、 $-80\ ^\circ\text{C}$ で保存した。

9. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA で用いた二本鎖オリゴヌクレオチドは Promega より購入した。以下にその配列を示す。

NF- κ B: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

Oct-1 : 5'-TGTCGAATGCAAATCACTAGAA-3'

AP-1 : 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'

二本鎖オリゴヌクレオチド 1 pmol、 (γ - 32 P) adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Amersham Biosciences) 0.4 MBq、 T4 polynucleotide kinase (Takara) 1 μ l を 20 μ l の系で調製し、37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。未標識のアイソトープを除くため、Push column (Stratagene) を用い精製し、得られたプローブの比活性を測定した。核タンパク質 (2 μ g)、2 X binding buffer [40 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 100 mM KOH, 1mM EDTA, 10 % glycerol, 0.2 % Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM DTT, 2 mg/ml BSA Fractin V] 10 μ l、1 mg/ml Poly (dI-dC) \cdot (dI-dC) double strand (Amersham Biosciences) 2 μ l そして 10 mM PMSF 1 μ l を混ぜ 19 μ l とし、室温で 5 分間放置後、 32 P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチド (15,000~20,000 cpm) 1 μ l を加え室温で 30 分結合反応を行った。スラブ型電気泳動槽に 30 分間プレ泳動を行なった 6 % ポリアクリルアミドゲルと Running バッファー [25 mM Tris, 24.3 mM borate, 1 mM EDTA (0.5 X TBE)] をセットし、ゲルの各ウェルに一定量のサンプルを注入し、100 V の定電圧で 1 時間電気泳動を行った。泳動終了後、80 $^{\circ}$ C で 1 時間以上ゲルを乾燥させ、-80 $^{\circ}$ C でオートラジオグラフィーを行った。X 線フィルムは XAR-5 (Kodak) を使用した。

スーパーシフトアッセイを行う場合は、 32 P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチド を加える前に、NF- κ B サブユニットに対する各抗体 (2 μ g) を加え、室温で 30 分反応させた。

10. Reporter gene assay

アッセイで使用した κ B サイトを繋いだ luciferase vector p [κ B] 6-Luc およびコントロール reporter pRL-TK は東京大学大学院 渡辺俊樹博士より供与していただいた。AP-1 サイトを繋いだ luciferase vector AP-1-Luc は Stratagene より購入した。いずれのプラスミドも、コンピテント細胞 *E.coli* HB101 (Takara) に

42 °C、45 秒の熱ショックを与えて導入し、100 μ g/ml のアンピシリンを含む 100 ml の LB [1 % (w/v) トリプトン、0.5 % (w/v) 酵母エキス、0.5 % (w/v) NaCl] 培地にて、37 °C、一晩の振盪培養を行った。翌日、大腸菌の培養液を遠心分離して上清を除き、菌体をペレットとして回収した。その後、Plasmid Purification Kit (Promega) により精製し、1/10 濃度の TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解、260 nm での吸光度を測定しプラスミド DNA サンプルとした。

4 X 10⁵ cells/ml に調製し、24 ウェルプレート (Costar) に播種し (500 μ l/well) 、目的のプラスミド DNA は Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) を用い、製品の取扱い説明書に従って細胞内に導入した。37 °C、5 % CO₂ で一定時間インキュベートした後、細胞を回収し、1,200 rpm、5 分間の遠心分離操作で上清を除去した。PBS (-) で 1 度洗浄した後、細胞塊に 1 X Lysis バッファー (Promega) 100 μ l 加え混和し、室温で 15 分間可容化し細胞抽出液とした。その後、Dual Luciferase assay kit (Promega) を使ってルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを次の通り行った。10 μ l の細胞抽出液に 50 μ l の Luciferase Assay Reagent II を 50 μ l 加え、ホタルルシフェラーゼの発光量をルミノメーター (Lumat LB9501) で測定した。続いて、Stop & Glo Reagent 50 μ l を加え、ウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。コントロール reporter pRL-TK の測定値を基にトランスフェクション効率を補正し、ルシフェラーゼ活性を求めた。

11. アポトーシスと caspase の活性化機構の解析

細胞の初期アポトーシスの検出は、Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences) を用いて行った。細胞を PBS (-) で洗浄、さらに 1 X Binding Buffer で洗浄後、細胞を 1 X Binding Buffer 200 μ l に懸濁した。続いて、Annexin V-FITC 5 μ l を加え混和し、室温暗所で 15 分間放置した。その後、フローサイトメーター (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)により解析を行った。

Hoechst 33342 は染色体 DNA と結合し、蛍光顕微鏡 (UV フィルター) 下で観察すると青色の蛍光を発し、細胞核の形態を観察することができる。アポトーシスによってみられるクロマチンの凝集や核の断片化は、細胞を 10 μ M の Hoechst 33342 で染めた後 (37 °C、15 分間、暗所) 、PBS (-) で洗浄後、UV フィルターを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus BX50F) で観察した。

アポトーシスによってみられる caspase の活性化経路の解析は、caspase の特異抗体によるウェスタンブロッティング法と、caspase のインヒビターを用いた MTT Assay 法により検討した。5 X 10⁵ cells/ml に調製した細胞浮遊液に、終濃度が 20 μM となるように caspase インヒビター を加え、37 °C、5 % CO₂ で 1 時間インキュベートした。その後、終濃度が 10 μg/ml となるように DHMEQ を加え、96 ウェルプレートに播種し (100 μl/well) 、37 °C、5 % CO₂ で 24 時間インキュベートした。翌日 MTT Assay を行い、各種 caspase インヒビターを添加したサンプルと添加しなかったサンプルの細胞生存率を比較した。

12. 合成 DNA マイクロアレイ法

10 μg/ml DHMEQ で 16 時間処理した後、1,200 rpm、5 分の遠心により細胞を回収した。その後、ISOGEN (NIPPON GENE) を用い、製品の取扱い説明書に従って Total RNA 調製を、さらに Poly (A) Rure kit (Ambion) cDNA を用いてポリアデニル酸 [Poly (A)⁺] RNA 抽出を行った。標識 cDNA 合成は、[Poly (A)⁺] RNA 2 μg を出発材料に、ラベリング&ハイブリダイゼーションキット (マイクロダイアグノスティック) 、逆転写酵素 SuperScript II (インビトロジェン) 、DHMEQ 処理群には Cyanine 5-deoxyuridinetriphosphate (dUTP) (New England Bio Lab)、DHMEQ 未処理群には Cyanine 3-dUTP (New England Bio Lab)を用いて行った。

Cyanine 5 標識 cDNA と Cyanine 3 標識 cDNA を、同一試験管内で混合し、ラベリング&ハイブリダイゼーションキット付属のスピncラムによって精製し、ラベリング&ハイブリダイゼーションキット付属の 1 X ハイブリダイゼーションバッファー 21 μl に溶解した。この溶液をマイクロアレイスライドガラスの DNA がスポットされている領域に滴下し、カバーガラスで被いハイブリダイゼーションカセット (マイクロダイアグノスティック) に格納した。その後、気相恒温器に入れ、68 °Cで 15 時間ハイブリダイゼーションを行った。

翌日、2 X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0), 0.1 % SDS 溶液をスポイトを使ってカバーガラス上から滴下し、マイクロアレイスライドガラスをこの溶液に浸した。次に、カバーガラスを取り除き、マイクロアレイスライドガラスをスライドガラスホルダーに入れ、200 ml の 2 X SSC 溶液で 1 分間 (室温) 、0.2 X SSC 溶液で 1 分間 (室温) 、最後に純水で 1 分間 (室

温)、それぞれ振盪させながら洗浄を行った。そして、低速遠心機 (Beckman Coulter) を用いて 1,500 rpm で 5 分間遠心し、水分を取り除いた。

続いて、GenePix4000A スキャナ (Axon Instrument) を用いて波長 635 nm および波長 532 nm の蛍光シグナルを同時測定し、各スポットを同一画面上に画像化した。さらに、バックグラウンドを差し引いた値を算出し、各スポットの 2 色の蛍光強度比を計算した。得られたデータセットを遺伝子発現ソフトウェア (マイクロダイアグノスティック) にて解析した。

13. 細胞周期 (cell-cycle) の解析

細胞 ($1-7 \times 10^6$ cells/ml) を PBS (-) で 2 回洗浄し、細胞塊に -20 °C で冷やした 70 %エタノール 10 ml を攪拌しながらゆっくりと徐々に加えた。4 °C で 2 時間放置した後、PBS (-) で細胞を 2 回洗浄し、0.25 mg/ml RNaseA 溶液を 1×10^6 個の細胞に対して 1 ml 加え、37 °C で 15-60 分間インキュベーションを行なった。次に、プロピジウムイオダイド (PI) 溶液を $50 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、4 °C で 30 分間 (暗所) に放置し、その後フローサイトメーターを用いて解析した。

14. ATL *in vivo* モデル系における DHMEQ の影響の解析

5 週令の SCID マウスに ATL 細胞を接種する前処置として、接種 3-5 日前に抗 IL-2R β モノクローナル抗体 TM- β 11 mg を PBS で溶解し腹腔内に投与した。その後、 5×10^7 個の MT-2 細胞を腹腔内に接種し、DHMEQ 処置群には、0.5 % carboxymethyl cellulose (CMC) で溶解した DHMEQ を、4 mg/kg または 12 mg/kg の条件で細胞を接種した当日から週に 3 回の割合で 1 ヶ月間腹腔内に投与した。コントロール群は、DHMEQ 処置群と全く同じ手順で、0.5 % CMC 溶液を投与した。生存率は Kaplan と Meier の方法によって計算した。*in vivo* モデルの実験は、熊本大学生命資源研究支援センター 大杉剛生博士に協力していただいた。

15. HTLV-1 プロウイルスの Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ATL キャリアの末梢血から分離した単核球を DHMEQ または DMSO (コントロール) で 72 時間処理した。コントロール実験として、同じ細胞数の K562 と TL-Om1 細胞株を混ぜ合わせ DHNEQ で 72 時間処理した。その後、DEAD Cell Removal Kit (MACS) を用いて死細胞を除去し、生細胞のみを回収した。次に、genomic DNA purification kit (PUREGENE) を用いて DNA の調製を行った後、吸光度を測定し一定量を RT-PCR に使用しプロウイルスのコピー数を求めた。田中らの報告に従い、HTLV-1 プロウイルス遺伝子を増幅した (56)。HTLV-1 プロウイルス pX 領域のプライマーセットおよび 5' 末端を蛍光物質 (FAM) で、3' 末端をクエンチャー物質で修飾した TaqMan プローブは以下の通り Applied Biosystems に合成を依頼した。

forward primer pX2-S 5'-CGGATACCCAGTCTACGTGTT-3'

reverse primer pX2-AS 5'-CAGTAGGGCGTGACGATGTA-3'

carboxyfluorescein (FAM)-labeled pX2 probe

5'-CTGTGTACAAGGCGACTGGTGCC-3'

TaqMan プローブ法による RT-PCR は、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) を用いて行った。TaqMan プローブは、PCR 反応のアニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズするが、プローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制される。伸長反応のステップの時に、Taq DNA ポリメラーゼのもつ 5'→3' エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズした TaqMan プローブが分解されることにより蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光が発せられ、その蛍光量を測定するという原理を利用している。HTLV-1 プロウイルスの定量は、東京大学大学院 相沢繁美博士に協力していただいた。

第3節 結果

3-1. DHMEQ による ATL 由来細胞株に対する恒常的 NF- κ B 活性の抑制効果

ATL 由来の二種類の細胞株 (MT-1, TL-Om1) および *in vitro* で HTLV-1 を感染させトランスフォームさせた細胞株 (MT-2) を用いて、DHMEQ による恒常的 NF- κ B 活性化の影響を Electrophoretic mobility shift analysis (EMSA) による DNA 結合能で検討した。ATL 由来の 3 種類の細胞株を 10 μ g/ml の DHMEQ で 16 時間処理することで、恒常的 NF- κ B 活性化はほぼ完全に抑制されることが明らかになった (Figure 12A, left upper 3 panels)。また、TNF- α で刺激し NF- κ B を活性化した Jurkat 細胞を 10 μ g/ml の DHMEQ で 16 時間処理した場合も、NF- κ B 活性化をほぼ完全に抑制することが明らかになった。さらに、DHMEQ の特異性を検討するために、転写因子 Oct-1 や AP-1 の影響を調べたところ、DHMEQ は Oct-1 や AP-1 の結合能にはほとんど影響を及ぼさず、NF- κ B 活性を選択的に抑制することが明らかになった。恒常的 NF- κ B 活性化のない K562 細胞においても、Oct-1 活性にはほとんど影響を及ぼさなかった (Figure 11A, upper and lower panels)。

次に、TL-Om1 細胞株を用いて、DHMEQ 処理による NF- κ B 阻害の経時的変化を検討した。AP-1 結合能に変化はみられないにもかかわらず、NF- κ B 結合能は DHMEQ 処理後 2 時間で明らかに抑制されるという結果が得られた (Figure 11A, upper and lower rightmost panels)。

DHMEQ による NF- κ B の転写活性化能の抑制について Luciferase construct を用いたレポーター遺伝子アッセイで検討した。コントロールとして AP-1 の結合配列を繋いだ Luciferase construct を用いた。MT-1 および TL-Om1 細胞株にレポーター遺伝子を導入し、3 時間培養後 DHMEQ 処理を開始し、さらに 16 時間培養後細胞抽出液を調製し、レポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、DHMEQ は AP-1 の転写活性化能に影響を及ぼさなかった。しかしながら DHMEQ 処理により、NF- κ B の転写活性化能は約三分の一にまで減少することが明らかとなった (Figure 11B)。

恒常的に活性化している NF- κ B 複合体の構成タンパク質を解析することを目的に、3 種類の ATL 由来細胞株の核タンパク質を用いてスーパーシフトア

ッセイを行った。いずれの細胞株においても活性化 NF- κ B の構成タンパク質は、p65、 p50 そして RelB を含んでいることが明らかとなった (Figure 11C)。Figure 11A および 11C の結果より、DHMEQ は活性化 NF- κ B の構成タンパク質と DNA の結合を阻害することが示唆された。

次に、DHMEQ による活性化 NF- κ B の構成タンパク質の細胞内分布に及ぼす影響を調べるために、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光法による検討を行った。ATL 由来細胞株 (MT-1, TL-Om1) を 10 μ g/ml の DHMEQ で 16 時間処理することにより、NF- κ B p65/p50 の核への移行が妨げられ、細胞質に蓄積するという結果が得られた (Figure 11D)。しかし、NF- κ B の DNA 結合能がない K562 細胞では、p65 および p50 タンパク質の細胞内分布に変化を認めなかった (データ未提示)。

これらの結果より、ATL 細胞株において、DHMEQ は NF- κ B の核移行を阻害、NF- κ B の活性化を抑制することが示唆された。

3-2. DHMEQ の ATL 由来細胞株に対するアポトーシス誘導効果

DHMEQ が ATL 由来細胞株に対して増殖抑制作用を示すかを調べるため、*in vitro* の系の MTT Assay 法により解析した。DHMEQ 処理により、4 種類の ATL 由来細胞株 (MT-1, TL-Om1, KK-1, ST-1) 全てにおいて、DHMEQ 濃度依存的に生存率の低下が認められた。10 μ g/ml の DHMEQ で生存率が 30 %以下まで低下した。さらに、生存率の経時的変化をみると、12 時間、24 時間、48 時間と時間が経過するに従って明らかな生存率の低下が認められた。しかし恒常的 NF- κ B の活性化のない K562 細胞株では、10 μ g/ml の高濃度においても生存率にほとんど影響を及ぼさなかった (Figure 12A)。

ATL 由来細胞株に対する DHMEQ 処理でアポトーシス誘導が可能かどうかを調べるために、Annexin V 陽性細胞をフローサイトメトリー法により解析した。MT-1 および TL-Om1 細胞株では、DHMEQ 処理 24 時間、48 時間と時間が経過するに従って明らかに Annexin V 陽性細胞が増加した (Figure 12B)。さらに、Hoechst 33342 染色によってアポトーシスで見られる核の形態変化を調べたところ、ATL 由来細胞株では細胞がアポトーシスにより死滅したときにみられるクロマチンの凝集や核の断片化が検出された。恒常的 NF- κ B の活性化のない K562 細胞株においては、核の形態変化はみられなかった (Figure 12C)。

これらの結果より、DHMEQ は恒常的 NF- κ B の活性化がみられる ATL 由来細胞株に特異的に作用し、これらの細胞をアポトーシスに導くことが示された。

3-3. 抗アポトーシスおよびセルサイクルを司る遺伝子群の発現制御

次に DHMEQ 処理により、どのような遺伝子の発現に変化がみられるのかを調べることを目的に、CodeLink Expression Bioarray System を用いた解析を行なった。DHMEQ 処理により抗アポトーシス作用にかかわる Bcl-xL、Bcl-2 や cell-cycle progression に重要な cyclin D1、Rb や p53 遺伝子の発現が抑制されていた。一方、caspase-3、-8、-9 などのようなアポトーシス誘導分子や実行分子においては、発現の増加がみられた (データ未提示)。

実際、タンパクレベルにおいても同じ現象がみられるかどうかを調べるために、Immunoblot 法により解析を行った。代表的なタンパク質をいくつか選択し、cell-cycle にかかわるものとして、cyclin D1、Rb そして p53、アポトーシス抑制に働くものとして、Bcl-xL、c-FLIP そして c-myc について解析を行った。さらに、各々の検出バンドをデンストメーターで測定し、コントロールとして用いた tubulin と比較し数値化したところ、10 μ g/ml DHMEQ 16 時間の処理でこれらのタンパク質の発現に顕著な抑制がみられた (Figure 13A top and lower panels)。ATL 由来細胞株の DHMEQ によって誘導されるアポトーシスは、抗アポトーシスやセルサイクルに作用する遺伝子の発現抑制と、アポトーシス実行遺伝子の発現誘導を伴っていることが示唆された。

次に、DHMEQ によって誘導されるアポトーシスにおける caspase の活性化機構の検討を行った。細胞内での caspase の活性化機構には、ミトコンドリアから流出したシトクロム c が caspase-9 の活性化因子である Apaf-1 に結合し活性化される系と、Fas や TNF レセプター (デスレセプター) の複合体に caspase-8 もしくは -10 が直接結合し活性化される系の二つがある。caspase の活性化が起こると、その活性中心にあるシステイン残基が切断され、いくつかのドメインにプロセッシングされる。ATL 由来細胞株を 10 μ g/ml DHMEQ で 4 時間、8 時間、16 時間処理し、Immunoblot 法により解析を行った。DHMEQ 処理後 4 ~8 時間で、これらの caspase の切断断片が検出された (Figure 13B)。DHMEQ による caspase の活性化機構は、ミトコンドリアとデスレセプターの

両方の系がかかわっていることが示唆された。

さらに、caspase-3、-8、-9 の各々に特異的な阻害剤を用いて、DHMEQ 処理における抗アポトーシス効果を検討した。DHMEQ と caspase の阻害剤を併用することにより、DHMEQ 単剤処理より細胞の生存率も 20～30 %回復し (Figure 13C)、Immunoblot 法により検出される caspase の切断も抑制されることが明らかとなった (データ未提示)。

DHMEQ 処理を施した細胞の細胞周期解析を行なうことにより、DHMEQ の細胞分裂抑制効果を調べた。DHMEQ 処理時間の経過とともに、G0/G1 phase の細胞集団が増え、細胞増殖を停止していることがわかった (Figure 13D)。

3-4. 新鮮 ATL 細胞に対する DHMEQ の効果

DHMEQ は新鮮 ATL 細胞においても、ATL 由来細胞株と同じ効果が期待できるかを検討した。3 例の新鮮 ATL 細胞を、10 μ g/ml の DHMEQ で 16 時間処理し、EMSA を行なった。3 例とも NF- κ B の DNA への結合活性の著しい低下が認められたにもかかわらず、AP-1 の結合活性に変化は認められなかった。また、NF- κ B 複合体の構成タンパク質をスーパーシフト EMSA を行ない解析したところ、いずれも p50 と p65 で、RelB や c-Rel を含んでいないことが明らかとなった (Figure 14A)。

コントロールとして用いた T cell-enriched 正常末梢血単核球 (PBMC) は新鮮 ATL 細胞とは対照的に、DHMEQ の影響はほとんど受けず、NF- κ B の DNA への結合活性に著しい変化は認められなかった。さらに、NF- κ B 複合体の構成タンパク質は p50 が主で、p65 や RelB は含んでいないことが明らかとなった (Figure 14B)。この点が、ATL 細胞と正常細胞との間で生じる DHMEQ に対する感受性の違いを説明できる可能性が考えられた。

7 例の新鮮 ATL 細胞の MTT アッセイの結果から、DHMEQ 処理により著しい細胞の生存率の低下、さらには annexin-V 陽性細胞の増加と核の形態の変化というアポトーシスに特有な現象が確認された。コントロールの正常 PBMC では、DHMEQ の影響はほとんどみられなかった (Figure 14C～E)。

3-5. SCID マウスを用いた *in vivo* モデルでの検討

これまで ATL 由来細胞株および新鮮 ATL 細胞を用い、DHMEQ の効果を *in vitro* の実験系で検討してきた。次に、SCID マウスを用い、DHMEQ の効果を *in vivo* の実験系で検討した。5 X 10⁷ 個の MT-2 細胞をマウスの腹腔内に注射した後、4 mg/kg または 12 mg/kg の割合で DHMEQ をマウスの腹腔内に 1 週間に 3 回、1 ヶ月間注射した。DHMEQ に対するコントロールとして、0.5 % CMC 溶液を単独で注射した。DHMEQ 4 mg/kg の群では、6 ヶ月後、6 匹中 4 匹が生存したが、0.5 % CMC 溶液を注射したコントロール群は、1 匹も生存することができなかった。DHMEQ 12 mg/kg の群では、MT-2 細胞を注射してから 35 日後、6 匹中 わずか 1 匹が死亡した。一方、0.5 % CMC 溶液を注射したコントロール群は、6 匹中 5 匹が死亡した。

以上の結果において、DHMEQ 処理による生存率の延長効果が確認された (Figure 15)。

マウスに注射した MT-2 細胞は、生体内で増殖し大きい腫瘍の塊となった。その腫瘍が、外部からの接種によって派生したものなのかを確かめるため、HTLV-1 Tax および human β -globin 遺伝子を PCR 法により増幅した。マウスにできた全ての腫瘍は、両遺伝子とも陽性であり、腫瘍は MT-2 細胞由来のものであることが確認できた。さらに、腫瘍組織の抗 HTLV-1 p19 抗体による蛍光免疫組織染色を行なったところ、DHMEQ (4 mg/kg) 処理後の残った腫瘍組織では、HTLV-1 p19 陽性細胞は検出されなかった。さらにヘマトキシリンエオジン (H & E) 染色で確認したところ、線維性の組織やリンパ系細胞でうめつくされていた (データ未提示)。また、コントロールマウスと比較すると、DHMEQ で処理したマウスに体重減少などの副作用は全くみられず、DHMEQ の投薬処方に問題はないことが明らかとなった。

以上の結果から、HTLV-1 でトランスフォームした T 細胞を接種した SCID マウスは DHMEQ の投与により、恒常的 NF- κ B 活性化の破綻によって引き起こるアポトーシスの誘導をとおして、HTLV-1 感染から免れることができたものと示唆される。

3-6. DHMEQ によるキャリア末梢血単核球 (PBMC) 中の HTLV-1 ウイルス量の削減

PBMC 中の HTLV-1 ウイルスのウイルス量は、ATL を含め HTLV-1 が関係する疾病のリスクファクターのひとつであると考えられてきた (57)。HTLV-1 は 1 細胞当たり 1 コピー存在するので、ウイルス量 (すなわち HTLV-1 感染細胞の数) の増加は、HTLV-1 感染細胞のオリゴクローナルな増殖から起こったものであると考えられる (58)。

はじめに ATL キャリア PBMC 中の HTLV-1 感染細胞において NF- κ B の活性化がみられるかどうかを調べた。一般的に HTLV-1 感染細胞は、ウイルス遺伝子の発現にかかわらず、その細胞表面に IL-2R α が発現していることが知られている。そこで、IL-2R α と活性化 NF- κ B p65 抗体を用い免疫蛍光染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することにより同定を試みた。はじめに、ATL の細胞株である MT-1 とコントロールとして T 細胞株である Jurkat を用いて検討した。MT-1 細胞では全ての細胞が IL-2R α と活性化 NF- κ B p65 とともに陽性であった。一方、コントロールの Jurkat は IL-2R α 陰性であり染め分けが可能であることが示された。次に、HTLV-1 キャリア 5 検体、正常コントロール 3 検体について調べてみた。代表的な結果を、Figure 16A に示した。HTLV-1 キャリアからの PBMC サンプルでは、IL-2R α と活性化 NF- κ B p65 とともに陽性のリンパ球を見分けることができた。一方、コントロールの正常 PBMC では、IL-2R α と活性化 NF- κ B p65 とともに陽性の細胞はひとつも検出することができなかった。キャリア PBMC 中の IL-2R α と活性化 NF- κ B p65 とともに陽性の細胞の割合は、おそらく数%–10% 程度であると予想された。これらの結果より、HTLV-1 キャリア PBMC 中のいまだトランスフォームしていない HTLV-1 感染細胞においても、NF- κ B が活性化していることが示唆された。

次に、DHMEQ で NF- κ B を抑制することで、HTLV-1 キャリア末梢血単核球 (PBMC) 中の HTLV-1 感染細胞の数 (proviral load) を減少させることができるかどうかを検討した。HTLV-1 キャリア PBMC は、患者自身の血清を 10% と 10 μ g/ml の DHMEQ を含む RPMI 1640 培地で 72 時間培養した。DHMEQ のコントロールとして DMSO を 0.1% となるように加えた。72 時間後、死細胞は DEAD Cell Removal Kit を用いて除き、回収された生細胞よりゲノム DNA を調製し、PCR による定量的解析により HTLV-1 ウイルスのコピー数を測定し

た (Figure 16B)。二つの細胞株、K562 と TL-Om1 を等量混合し DHMEQ で処理したものをこの実験系のコントロールとしたところ、ウイルスのコピー数はおよそ 40 % まで減少した。HTLV-1 キャリア PBMC を DHMEQ で処理し、DMSO で処理したコントロールと比較すると、ウイルスのコピー数は明らかに減少しており、減少率の幅はおよそ 10 %～80 % (mean ± SD, 65.6 % ± 25.8 %) であった (Figure 16C)。

これらの結果より、HTLV-1 感染細胞でも少なくとも一定の割合の細胞が NF- κ B の恒常的活性化を示し、NF- κ B に依存した分子基盤を有していることが考えられた。抹消血中の HTLV-1 感染細胞は、DHMEQ 処理により感染細胞がアポトーシスを起こし除去されウイルス量が減少した。一方、ATL では ATL 細胞のみならず、腫瘍化していない HTLV-1 感染細胞も除去されることが期待される (Figure 17)。

第4節 考察

本研究において、新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ による ATL 細胞や ATL 由来の細胞株における NF- κ B の恒常的活性化の抑制やアポトーシス誘導、さらに *in vivo* モデルにおける DHMEQ の効果、HTLV-1 感染細胞への効果を調べることにより、DHMEQ の分子標的試薬として ATL の治療および予防に対する有効性を検討した。

DHMEQ は ATL 細胞や ATL 由来の細胞株の NF- κ B を阻害しアポトーシスを誘導したが、コントロール正常 PBMC には明らかに影響はなかった (Figure 14)。また MT-2 細胞を接種した SCID マウスに DHMEQ を投与することで、マウスは生存率を有意に延長した (Figure 15A)。さらに、HTLV-1 キャリア PBMC を DHMEQ 処理することで、HTLV-1 ウイルスのコピー数を減じることができ、HTLV-1 感染細胞に特異的に作用することが示唆された (Figure 16C)。以上の結果より新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は、ATL の治療および ATL 発症予防に貢献できる可能性を有している有望な分子標的薬であることが示唆された。

NF- κ B 経路を標的にした NF- κ B 阻害剤は、いくつかのグループに分類することができる。代表的なものとして、(1) I κ B α のリン酸化阻害剤、(2) プロテアソームやプロテアーゼ阻害剤、(3) NF- κ B の核移行阻害剤、(4) NF- κ B の DNA への結合阻害剤、あるいは (5) 基本転写因子との相互作用を阻害する薬剤が挙げられる (7)。DHMEQ は、第 3 のグループに属し、NF- κ B の核移行を阻害するユニークな低分子化合物として知られている。しかし、現在までに多数の NF- κ B の阻害作用を有する薬剤が報告されているが、特異性の低さや副作用の問題、さらには投与方法の問題などクリアできず、広く臨床応用に至っているものが存在しない (21)。

著書らは、ATL や Hodgkin リンパ腫細胞株における NF- κ B の恒常的活性化を、アデノウイルスベクターに組み込んだ変異型 I κ B α を導入し阻害することで、腫瘍細胞にアポトーシスが誘導されることを報告した (59)。本研究において、低分子化合物 DHMEQ による NF- κ B の阻害でも同様な効果がえられることが確認された。

近年、ATL において NF- κ B の恒常的活性化に作用するいくつかの NF- κ B 阻害剤の効果について報告がなされている。すなわち Bay-11-7082、2-amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-piperidin-4-ylnicotinonitrile

(AHP) や caffeic acid phenethyl ester (CAPE) のような $I\kappa B$ のリン酸化阻害剤である (53-55)。Bay-11-7082 の報告と本研究で使用した DHMEQ の結果を比較してみると、正常 PBMC の生存率に影響を及ぼさない濃度において、NF- κ B の活性化を完全に抑制して ATL 細胞を効果的にアポトーシスに導くという点で、DHMEQ の特異性は Bay-11-7082 より高いことが示唆された。特異性の違いは作用メカニズムの違いに起因しているものと思われる。Bay-11-7082 は $I\kappa B\alpha$ のリン酸化を阻害する働きに加え、高浸透圧や紫外線など様々な物理的ストレスで活性化するキナーゼタンパク質である p38 や Jun N-terminal kinase-1 (JNK-1) を刺激したり、起原は不明であるが、130~140 kDa タンパク質のチロシン残基をリン酸化する活性を持っている。これらのデータは、Bay-11-7082 は、IKK を阻害する活性とは関係ない非特異的な活性も持ち合わせているを示唆している (60)。

プロテアソーム阻害剤 PS-341 と ATL についても最近いくつかの報告がなされているが、PS-341 による NF- κ B の抑制は、サリチル酸ナトリウムと同等のレベルでほとんど阻害効果がみられないなど、首尾一貫した報告はなかった。また、ATL 細胞に対する抗増殖効果においても、有効であるという報告はない (54, 61, 62)。一方、DHMEQ は、Bay-11-7082 の標的である IKK のさらに下流の p65 の核移行を標的にしている。さらには、DHMEQ による NF- κ B の DNA への結合阻害は迅速でかつほぼ完全で (Figure 12 & 15) ある。さらに DHMEQ の NF- κ B 抑制効果は、抵抗性を示す細胞株での検討では一過性である (データ未提示)。この DHMEQ の特性は正常組織に対する副作用を最小限に押さえることができるという有利な特性を持ち合わせていると考えられる。臨床応用にあたってはとくに NF- κ B が免疫系で重要な働きをしていることから、不可逆的な NF- κ B の阻害は免疫系への抑制が問題となる点をクリアできる可能性が期待される。

ATL 細胞で NF- κ B 活性が完全に押さえられる濃度で、コントロールの T 細胞 enriched PBMC サンプルを DHMEQ で処理したところ、NF- κ B の DNA への結合活性で ATL 細胞とは明らかに異なる効果がみられた (Figure 14B)。これらの結果は、正常末梢血単核球と ATL 細胞間の NF- κ B 複合体の構成分子の違いによるものであることが推測された (41, 51)。ATL 細胞での恒常的 NF- κ B の活性化成分は、p50/p65 のヘテロダイマーに依るものであったが (Figure 14A)、コントロールの T 細胞 enriched PBMC にみられる恒常的 NF- κ B の活

性化成分は、p50 のホモダイマーが主であった (Figure 14B)。DHMEQ で処理した ATL 細胞で、DNA へ結合できず残った NF- κ B の構成成分はわずかではあるがはっきりとしており、p50 のホモダイマーに相当するか、あるいは p50 のホモダイマーを含むものであることが予想された (Figure 14A)。primary の ATL 細胞は微量の p50 のホモダイマーを含んでいるか、あるいは本研究に使用した ATL 検体に、わずかな正常 T 細胞が含まれていたことが考えられる。このように、DHMEQ は p50 に作用しにくいのではないかという仮説を検証するという課題は残っているが、DHMEQ は p50 のホモダイマーを除き NF- κ B 複合体の阻害剤として機能することが推察された。

DHMEQ 処理後の NF- κ B の DNA への結合抑制効果は、処理後 1〜24 時間後まではっきり認められた。一方、アポトーシスは DHMEQ で処理した後、相対的に少し遅れて誘導されてきた (Figure 12B & 14D)。DHMEQ 処理による ATL 細胞でのアポトーシスは、間接的な現象であり何らかの遺伝子の発現レベルを変えることで誘導されていることが考えられた。この概念は、DHMEQ が ATL 由来細胞株において Bcl-xL や c-FLIP などの抗アポトーシスにかかわる分子や細胞増殖にかかわる分子の発現を負に制御するという結果に支えられている (Figure 13A)。Rb タンパク質 (pRB) は細胞周期の G1 期においては、主に転写因子 E2F と結合してその活性を抑えることによって細胞が増殖サイクルに入るのを抑制している。しかし、G1 期から S 期への移行期にはサイクリン D とサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体による細胞周期特異的リン酸化を pRB が受けることで E2F が解離し活性型転写因子となり、DNA の複製を開始させ、細胞を増殖サイクルに進行させていることがわかっている。DHMEQ 処理による Rb タンパク質 (pRB) のリン酸化レベルの減少は、cyclin D1 の負の制御に依るものであることが推察され、その結果細胞周期エンジンの G0/G1 期から S 期に進行する過程でブレーキがかかり G1 期停止の現象が起こっていることが考えられる (Figure 13A & 13D)。これらの結果からも、ATL 細胞における NF- κ B の恒常的活性化は、NF- κ B の抗アポトーシス活性や細胞周期を調節しているタンパク分子の発現誘導を通して、ATL 細胞特有の生存基盤を支えていることが示唆された。

HTLV-1 でトランスフォームした MT-2 細胞を接種したマウスに DHMEQ を投与したところ、コントロール群と比較し生存率の延長が確認された (Figure 15)。本実験では投与する DHMEQ 濃度を 4 mg/kg または 12 mg/kg の2種類

に設定し、1週間に3回の割合で投与した。DHMEQの中間致死量(LD₅₀)は180 mg/kgであることから、今回設定したDHMEQ濃度はLD₅₀にほど遠い量である。それにもかかわらず、DHMEQ投与によるマウスの生存率の顕著な延長効果がみられた(Figure 15)。これらの結果より、DHMEQの吸収、分布、代謝、排泄など生体内における薬物動態ははっきりと明らかになっていないが、DHMEQは毒性の少ない新規の抗ATL薬として、臨床応用につながる事が期待できる。

キャリア中のHTLV-1感染細胞は、ウイルス遺伝子が誘導されTaxを発現すると細胞障害性T細胞の標的となるため、生体内におけるHTLV-1感染細胞を同定することは非常に難しい問題である(46, 63)。IL-2R α はHTLV-1感染細胞に恒常的に誘導される分子として知られる。今回蛍光免疫染色法により、HTLV-1キャリアPBMCサンプルからIL-2R α と活性化p65ともに陽性な細胞を同定することができた。一方、コントロールの正常PBMCではIL-2R α 、活性化p65ともに陰性であった(Figure 16A)。ATL細胞ではIL-2R α が発現しており、ウイルス遺伝子の発現がなくてもNF- κ Bの活性化がみられた。さらにIL-2R α と活性化p65陽性細胞数は、ウイルス量と相関関係があることが考えられた。DHMEQはキャリアPBMC中のHTLV-1感染細胞のみを選択的に除去することが可能であったことから、HTLV-1関連疾患の治療にも役立つことが期待される。

本研究においてこれまで明らかにしてきたように、正常PBMCはDHMEQに対して抵抗性であり、マウスモデルでも明らかな毒性はなく、DHMEQはHTLV-1感染T細胞やATL細胞におけるNF- κ Bの恒常的活性化を標的とする、優れた新規NF- κ B阻害剤の候補のひとつであると考えられた。本研究はDHMEQによりATLの予後の大きな改善さらには発症予防も可能となることを示唆する。さらに、DHMEQの薬物動態を解析することにより、ATL患者、HTLV-1キャリアに対して将来的に臨床試験の道を提供できる可能性があることも期待される。

第4章 慢性リンパ性白血病 (CLL) に対する NF- κ B 阻害剤の応用

第1節 序論

慢性リンパ性白血病 (CLL) は、成熟した小型リンパ球 (B 細胞) によるリンパ系腫瘍で、50 歳を越える男性に多く、欧米では白血病の約 30 % を占めるが、日本では約 2 % と極めて稀な白血病である。慢性に経過する疾患で、末梢血および骨髄でのリンパ球の増加が顕著にみられる。病気の過程は変わりやすく、fludarabine や 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine) のようなヌクレオチドアナログが開発されたにもかかわらず、有効な治療法はなくいまだ予後不良の病である。CLL 細胞の分子生物学的特徴に基づく分子基盤を理解し、新しい治療を開発して行くことが CLL の予後を改善する上で必要となってきた。現在使われている化学療法剤の大部分は、DNA 複製や細胞分裂を標的とした薬剤であるため、増殖の盛んな癌細胞により効果的に作用する。増殖がみられないがそのかわりアポトーシスから逃れた細胞が蓄積された状態である CLL の治療薬として、これらの薬剤が十分相応しいものであるとは言えない (12, 64)。

近年、腫瘍細胞の維持や増殖を支える分子を標的とする分子標的療法が遂行されてきている。分子標的療法は腫瘍細胞に対する特異性を高め、正常細胞に対する副作用を最小限にとどめ、多剤化学療法との併用により治療効果を高める機会を提供している (3, 5)。

CLL の新しい治療法を開発するために CLL に共通にみられる分子基盤を明らかにして、標的とする分子に特異的な薬を開発して行くことがとても重要である。CLL の臨床所見は多様性があるにもかかわらず、CLL 細胞の共通の特徴として強力かつ恒常的な NF- κ B 活性を持つということが報告されている (65)。NF- κ B はリンパ球の機能や細胞の増殖、分化、ウイルス発現調節にかかわる転写因子であり、NF- κ B 活性は抗アポトーシス活性を有し、アポトーシス制御に密接に関係していることがわかっている (7, 66)。すなわち CLL 細胞における NF- κ B の恒常的活性化はアポトーシス誘導活性を中和し腫瘍細胞の生き残りに強く貢献していることが示唆される。最近では CLL 細胞の CD 40 シグナル伝達系を阻害する CD 40 リガンド (CD 40 L) に対する抗体を使った研究や、プロテアソームインヒビターを用いた研究により NF- κ B が抗アポトー

シス活性を有する可能性が報告されている (65, 67, 68)。もしそうならば、NF- κ B 経路を標的とし NF- κ B 活性を阻害することで CLL 治療の新たな戦略となることが考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ (25, 27) の CLL 細胞における NF- κ B 阻害作用、CLL 細胞へのアポトーシス誘導およびその機序、既存の化学療法剤との併用、および *in vivo* で治療抵抗性と関連していると報告されている CD40-NF- κ B シグナルの阻害能について調べ、CLL に対する DHNEQ を用いた分子標的療法の基礎的検討を行った。

第2節 実験材料と方法

1. 試薬

DHMEQ は、慶應義塾大学理工学部 梅澤一夫博士より提供していただいた。Fludarabine の活性型代謝産物である 2-fluoroadenine-9- β -D-arabinofuranoside (F-ara-A9) は Sigma より購入した。カスパーゼ 3 インヒビター; Z-Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-FMK は Calbiochem より購入した。DHMEQ、F-ara-A およびカスパーゼインヒビターはジメチルスルフォキシド(DMSO) (WAKO) に溶解し、-20 °Cで保存した。細胞生存率を測定する際に用いた 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium (MTT) (SIGMA) は、PBS (-) で 5 mg/ml の濃度に希釈し、-20 °Cで保存した。アポトーシス検出の際に用いた Hoechst 33342 (Calbiochem) は PBS (-) に溶解し 4 °Cで保存した。

2. 抗体

supershift EMSA に用いた抗 NF- κ B p50 (C-19) ヤギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p65 (C-20) ウサギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p52 (C-5) マウスモノクローナル抗体、抗 c-Rel (B-6) マウスモノクローナル抗体そして抗 RelB (C-19)ウサギポリクローナル抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。

免疫蛍光染色法に用いた一次抗体は以下のとおりである。抗 cleaved Caspase-3 (Asp175) ウサギポリクローナル抗体は、Cell Signaling より、抗 glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) (FL-335) ウサギポリクローナル抗体は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。

免疫蛍光染色法に用いた二次抗体は以下のとおりである。fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled ヤギ抗ウサギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

Fas による刺激導入に使用した抗 Fas (CH-11) マウスモノクローナル抗体は、Medical and Biological Laboratories より購入した。

CD 40 による刺激導入に使用した 抗 CD 40 mAb89 マウスモノクローナル抗体は、Immunotech A Coulter Company より購入した。またコントロールとして使用したマウス IgG1 は Dako より購入した。

3. CLL 細胞と細胞培養

臨床検体は東京女子医大病院血液内科 岡村隆光博士、今村病院 宇都宮與博士に提供していただいた。

治療を受けていない CLL 患者 7 人、なんらかの細胞減少療法を受けた CLL 患者 8 人を選び実験に使用させていただいた。CLL 患者 (n=15) および健常人ボランティアからの末梢血単核球 (PBMC) は、インフォームドコンセント後、ヘルシンキ条約に基づく同意書を得て提供していただいた。ヘパリン採血した CLL 患者の末梢血を PBS (-) で 2 倍に希釈し、これを等量のヒト単核球分離液 Lymphoprep (第一化学薬品株式会社) に重層して遠心分離 (2,000 rpm, 30 分、室温) し、中間層の単核球分画を回収し、PBS(-) で 2 回洗浄した。さらに Dynal B-cell negative isolation kit (Dynal Biotech) を用い B 細胞を濃縮した。つぎにフローサイトメーター (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) で CD19 および CD5 陽性細胞を測定し B 細胞の純度が 95 % 以上であることを確認した。ヘパリン採血したの健常人ボランティアの末梢血も同様に操作し、B 細胞の純度が 90 % 以上であることを確認した。フローサイトメーターによる解析で使用した anti-CD19/FITC 抗体および anti-CD5/PE 抗体は Dako より購入した。CLL 患者および健常人ボランティアから得られた B 細胞は、56 °C で 30 分間非働化した 20 % の子牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (SIGMA) に抗生物質としてペニシリン G (100 u/ml) (GIBCO) とストレプトマイシン (100 μg/ml) (GIBCO) を添加したものを培養液として用いた。細胞はプラスチック製の培養フラスコを使用し、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター中で培養した。細胞の凍結保存はセルバンカー (十慈フィールド株式会社) を用い、ディープフリーザーにて行った。

4. 核タンパク質の調製

細胞の核抽出液は、Andrews らの方法によって調製した。2~5 X 10⁵ 個の細胞を氷冷した Buffer A [10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulphonic acid (HEPES)-KOH, pH7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] 200 μl に懸濁し氷上で 5 分放置した後、ボルテックスによる混和を 10 秒行い、遠心分離 (15,000 rpm,

10 秒, 4 °C) を行った。次に、上清を除いた後、沈殿物に氷冷した Buffer C (20 mM HEPES-KOH, pH7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25 % glycerol, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) を 20 μl 加え氷上で 20 分放置した後、遠心分離 (15,000 rpm, 2 分, 4 °C) を行ない上清を回収し核タンパク質とした。タンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて定量し実験に使用した。核タンパク質は -80 °C で保存した。

5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA で用いた二本鎖オリゴヌクレオチドは Promega より購入した。以下にその配列を示す。

NF-κB; 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

二本鎖オリゴヌクレオチド 1 pmol、(γ-³²P) adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Amersham Biosciences) 0.4 MBq、T4 polynucleotide kinase (Takara) 1 μl を 20 μl の系で調製し、37 °C で 30 分反応させた。未標識のアイソトープを除くため、Push column (Stratagene) を用い精製し、得られたプローブの比活性を測定した。核タンパク質 (2 μg)、2 X binding buffer [40 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 100 mM KOH, 1mM EDTA, 10 % glycerol, 0.2 % Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM DTT, 2 mg/ml BSA Fractin V] 10 μl、1 mg/ml Poly (dI-dC) · (dI-dC) double strand (Amersham Biosciences) 2 μl そして 10 mM PMSF 1 μl を混ぜ 19 μl とし、室温で 5 分間放置後、³²P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチド (15,000~20,000 cpm) 1 μl を加え室温で 30 分結合反応を行った。スラブ型電気泳動槽に 6 % ポリアクリルアミドゲルと Running バッファー [25 mM Tris, 24.3 mM borate, 1 mM EDTA (0.5 X TBE)] をセットし、ゲルの各ウェルに一定量のサンプルを注入し、100 V の定電圧で 1 時間電気泳動を行った。泳動終了後、80 °C で 1 時間以上ゲルを乾燥させ、-80 °C でオートラジオグラフィを行った。X 線フィルムは XAR-5 (Kodak) を使用した。

スーパーシフトアッセイを行う場合は、³²P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチドを加える前に、NF-κB サブユニットに対する各抗体 (2 μg) を加え、室温で 30 分反応させた。

6. 細胞増殖アッセイ (MTT Assay 法)

細胞株、CLL 患者、健常人ボランティアからの末梢血単核球を 1×10^6 cells/ml に調製し、96 ウェルプレート (Costar) に播種し ($100 \mu\text{l/well}$)、一定濃度の DHMEQ を添加し、 37°C 、5 % CO_2 で一定時間インキュベートした。次に、MTT 溶液を各ウェルに $10 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で 4 時間インキュベートした。その後、イソプロピルアルコールで希釈した 0.04 N HCl を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、ピペッティングによりホルマザン沈澱を十分に溶解させた後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により波長 570 nm で吸光度を測定した。コントロールとしてジメチルスルフォキシド (DMSO) を添加した検体の生存率を 100 % とし、各種濃度の DHMEQ を添加した時の細胞生存率を求めた。

7. Immunohistochemistry

PBS (-) で 2 回洗浄した細胞は、PBS (-) に再懸濁させ、Auto smear (Sakura) を使ってサイトスピンし、スライドグラス (Matsunami) にはり付けた。十分に風乾させた後、室温で 10 分間メタノール固定を行った。次に、PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS (-) で $4 \mu\text{g/ml}$ に希釈した一次抗体 $60 \mu\text{l}$ を加え、 4°C で一晩反応させた。続いて、PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS (-) で $4 \mu\text{g/ml}$ に希釈した二次抗体 $60 \mu\text{l}$ を加え、 37°C で 30 分間暗所で反応させた。再び PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、Perma Fluor Aquaqueous Mounting Medium (日本ターナー株式会社) を用いて封入した。観察までは蛍光の退色を防ぐため、冷暗所に保存した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 Radiance 2000 (Bio-Rad) を用いて行い、画像処理は Photoshop にて行った。

8. アポトーシスの解析

細胞の初期アポトーシスの検出は、Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences) を用いて行った。細胞を PBS (-) で洗浄、さらに 1 X Binding Buffer で洗浄後、細胞を 1 X Binding Buffer $200 \mu\text{l}$ に懸濁した。続いて、Annexin V-FITC $5 \mu\text{l}$ を加え混和し、室温暗所で 15 分間放置した。その後、フローサイトメー

ター (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) により解析を行った。

Hoechst 33342 は染色体 DNA と結合し、蛍光顕微鏡 (UV フィルター) 下で観察すると青色の蛍光を発し、細胞核の形態を観察することができる。アポトーシスによってみられるクロマチンの凝集や核の断片化は、細胞を $10 \mu\text{M}$ の Hoechst 33342 で染めた後 (37°C 、15 分間、暗所)、PBS (-) で洗浄後 UV フィルターを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus BX50F) で観察した。

9. Real-time Polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子発現の解析

培養細胞株からの Total RNA 抽出は、ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて行なった。細胞のペレットに ISOGEN を加え激しく混和し、室温に 5 分間放置した後、1/5 vol. のクロロホルムを加え再び激しく混和した。遠心分離により上清 (RNA 層) を回収した後、等量の 2-propanol を加え転倒混和し、室温に 10 分間放置し、遠心分離により Total RNA の沈澱を得た。得られた Total RNA は、80% エタノールでリンスし風乾後、diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解した。一本鎖 cDNA の合成は、Total RNA $1 \mu\text{g}$ を出発材料に TaqMan Gold RT-PCR Kit を用いて行なった。kit に付属の 10 X TaqMan RT Buffer $5 \mu\text{l}$ 、25 mM MgCl_2 $11 \mu\text{l}$ 、deoxy NTPs Mixture $10 \mu\text{l}$ 、Random Hexamers $2.5 \mu\text{l}$ 、RNase Inhibitor $1 \mu\text{l}$ に DEPC H_2O を加え $48.75 \mu\text{l}$ とし混和した。つぎに Multi Script Reverse Transcriptase ($50 \text{U}/\mu\text{l}$) $1.25 \mu\text{l}$ を加え混和した後、サーマルサイクラーを用いて 25°C , 10 min \rightarrow 48°C , 30 min \rightarrow 95°C , 5 min の反応を行なった。

プライマーセットは全て Applied Biosystems より購入し、その番号は以下の通りである。

Bcl-xL; Hs00236329__m1 (BCL2L1)、c-IAP; Hs00154109__m1 (BIRC3)、Bfl-1; Hs00187845__m1 (BCL2A1)、c-FLIP; Hs00153439__m1 (CFLAR)

さらに Real-time PCR の条件は以下の通りである。

cDNA $1 \mu\text{l}$ 、TaqMan Gene Expression Assays $25 \mu\text{l}$ に滅菌蒸留水を加え $50 \mu\text{l}$ とし、サーマルサイクラーを用いて 50°C , 2 min \rightarrow 95°C , 10 min \rightarrow (95°C , 15 sec \rightarrow 60°C , 1 min) X 40 cycles の反応を行なった。解析は ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて行なった。Real-time PCR による遺伝子発現の解析は、東京大学大学院 正田桃子氏に協力していただいた。

第3節 結果

3-1. 新鮮 CLL 細胞の恒常的 NF- κ B の活性化に及ぼす DHMEQ の効果

初めに CLL 細胞の恒常的 NF- κ B の活性化に対して DHMEQ がどのような影響を与えるかを調べるために、ゲルシフト法 (EMSA) により恒常的に活性化している NF- κ B の動きを調べた。実験には $2\mu\text{g}$ の核タンパク質を使用した。EMSA により CLL 細胞の核タンパク質で強力な NF- κ B の DNA 結合活性があることが確認できた。しかし $10\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 2, 4, 6 時間処理し各時間の NF- κ B の DNA 結合活性を調べたところ、2 時間以内に NF- κ B の DNA 結合活性がほぼ完全に消失することが示された。対照的に DHMEQ 未処理のコントロールでは、6 時間経過してもその活性はほぼ完全な状態で保たれていた (Figure 18A)。また CLL 細胞で恒常的に活性化している NF- κ B の構成タンパク質を調べるために supershift EMSA を行なった。未治療検体として #2 をそして治療済検体として #15 (cyclophosphamide で治療) を使用した。その結果、両者の NF- κ B の構成タンパク質は p50 のホモダイマーと p65/p50 のヘテロダイマーで構成されていることが明らかとなった (Figure 18B)。次に NF- κ B の DNA 結合活性に対する DHMEQ の影響を調べるために 15 検体全てについて EMSA を行なった。 2×10^6 個の CLL 細胞を $10\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 3 時間処理した後核タンパク質を調製し、 $2\mu\text{g}$ の核タンパク質を使用し EMSA を行なった。治療の有無にかかわらず調べた全ての検体で DHMEQ により NF- κ B の DNA 結合活性が完全に阻害され、しかもその阻害は 3 時間以内という短い時間で完了することが明らかとなった (Figure 18C)。

3-2. CLL 細胞に対する DHMEQ の選択的なアポトーシスの誘導

CLL 細胞の生存を考える上で NF- κ B の恒常的活性化がどのように絡んでいるのかを検討する目的で、CLL 細胞 (n=15) を DHMEQ で処理し細胞増殖アッセイ (MTT Assay) を行ない細胞の生存率を調べた。 1×10^5 個の細胞を 96 ウェルプレートに播き、DHMEQ を終濃度が 2, 5, $10\mu\text{g/ml}$ となるように添加し 24 時間培養した。DHMEQ 濃度 $0\mu\text{g/ml}$ のウェルにはコントロールとして DMSO を加えた。MTT Assay の結果から細胞の生存率を求めたところ、

DHMEQ 濃度が $2 \mu\text{g/ml}$ では $86.2 \pm 5.9\%$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ では $48.2 \pm 16.8\%$ そして $10 \mu\text{g/ml}$ では $44.3 \pm 16.3\%$ と濃度依存的に細胞の生存率が低下する結果となった (Figure 19A)。さらに DHMEQ 濃度を $10 \mu\text{g/ml}$ とし 24 時間後、48 時間後の細胞生存率を同様にして求めた。24 時間後の生存率は $44.3 \pm 16.3\%$ 、48 時間後の生存率は $33.5 \pm 17.4\%$ で、時間の経過とともに細胞の生存率が低下する結果となった (Figure 19B)。次に、DHMEQ は正常細胞に対しても生存率を低下させるような働きがあるのかを検討するために CLL 細胞と同様な手順で MTT Assay を行なった。正常末梢血単核球 (PBMC) (n=5) および精製した正常末梢血 B 細胞 [PBMC(B)] (n=3) で比較した。 $10 \mu\text{g/ml}$ 48 時間の処理においても生存率は 80% 以上保たれ、PBMC や PBMC(B) に対する DHMEQ の影響はほとんどないことが明らかとなった (Figure 19A & 19B)。

NF- κ B の恒常的活性化は、腫瘍細胞の生存、増殖と密接なかわりを持ち抗アポトーシス活性を有していると考えられている。DHMEQ により CLL 細胞の NF- κ B の恒常的活性化を阻害することでアポトーシスを誘導できるかどうか検討した。CLL 細胞を $10 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 24 時間処理し、初期アポトーシスの指標である Annexin V 陽性細胞の数をフローサイトメーターにより測定した。DHMEQ 未処理と同様に 24 時間培養した細胞をコントロールとした。解析には #3, #6, #10 (未治療) と #7 (Fuludarabine 治療), #11 (cyclophosphamide, vincristine, prednisolone 治療) の 5 検体を用いた。Annexin V 陽性細胞の割合を比較すると、DHMEQ 処理では $45.6 \pm 7.7\%$ と約半数の細胞がアポトーシスを誘導していた。一方、DHMEQ 未処理のコントロールでは $5.5 \pm 1.2\%$ であり、Annexin V 陽性細胞の著しい増加は認められなかった (Figure 20A)。また、PBMC や PBMC(B) についても CLL 細胞と同様に検討したところ、DHMEQ 処理、未処理にかかわらず Annexin V 陽性細胞の著しい増加は認められなかった (Figure 20A)。Hoechst 33342 染色により、DHMEQ 処理後の細胞の核の形態変化を観察した。CLL 細胞ではアポトーシスで見られる核の断片化やクロマチンの凝集が検出されたにもかかわらず、PBMC や PBMC(B) の核の形態には変化が認められなかった (Figure 20B)。次に実際カスパーゼのカスケードが働いていることを証明するために、カスパーゼ 3 が活性化したとき検出可能となる cleaved caspase 3 抗体を用いてアポトーシスの検出を試みた。さらにコントロールとしてカスパーゼ 3 のインヒビターでアポトーシスの程度が軽減できるかどうか合わせて検討した。アポトーシスのポジテ

イブコントロールは、Jurkat 細胞を 200 ng/ml の抗 Fas 抗体で 3 時間処理したものをを用いた。5 μ g/ml の DHMEQ で 24 時間処理した CLL 細胞はコントロールと比較して cleaved caspase 3 抗体で陽性となる細胞が明らかに増加していた。一方、カスパーゼ 3 インヒビターで 1 時間処理した後 DHMEQ 処理を行なった検体では cleaved caspase 3 抗体で検出できる細胞がコントロールレベルにまで減少していた (Figure 20C)。

以上の結果から DHMEQ は慢性リンパ性白血病細胞に作用し、細胞生存率を低下させアポトーシスを誘導することが強く示唆された。

3-3. DHMEQ による抗アポトーシス遺伝子の発現抑制

DHMEQ で NF- κ B の恒常的活性化を阻害したとき、分子レベルでどのような変化が起こりアポトーシスが誘導されるのかを理解するために、DHMEQ 処理後の CLL 細胞の抗アポトーシス分子の発現レベルの変化を調べた。# 2, #3, #6, # 7, #9, #11, #13, #15 (n=8) 検体を用い、抗アポトーシス分子の候補として NF- κ B の下流で制御されていることが報告されている Bcl-xL、c-IAP、c-FLIP そして Bfl-1 を選択し、real-time PCR 法により解析を行なった。遺伝子発現の減少率は Bcl-xL; 53.4 \pm 35.3 % (P<0.01)、c-IAP; 93.3 \pm 7.4 % (P<0.01)、c-FLIP; 28.8 \pm 33.4 % (P=0.04) そして Bfl-1; 93.3 \pm % (P<0.01) であった (Figure 21)。DHMEQ により NF- κ B の恒常的活性化を阻害することで、その下流で制御されている抗アポトーシス分子の発現が抑制されることが明らかとなった。

3-4. DHMEQ による fludarabine の *in vitro* 抗腫瘍効果の増強

DHMEQ が fludarabine の効果を高めることができるかどうか検討した。fludarabine は臨床の現場において CLL の代表的な化学療法薬の鍵となっている薬である (64)。まず初めに 5 μ g/ml DHMEQ 単独、2 μ g/ml F-ara-A 単独そして両者のコンビネーションの 3 通りの方法での比較を行なった。# 4, # 6, # 10, # 11, # 14 (n=5) 検体を用い、MTT assay により 24 時間後の細胞生存率を求めた。コントロールに対して 50 % 生存率となる濃度 (IC₅₀) を計算した。F-ara-A 単独処理と DHMEQ と F-ara-A によるコンビネーション処理の F-ara-A の IC₅₀ を比較すると、F-ara-A 単独の場合は 11.3 \pm 5.3 μ g/ml でコンビネーションの

場合は $5.0 \pm 5.1 \mu\text{g/ml}$ ($P=0.03$) となり DHMEQ による相乗効果が確認された。このように DHMEQ は CLL の fludarabine による抗増殖効果を高める働きをしていることが示唆された (Figure 22A)。また、MTT assay により算出された DHMEQ の IC_{50} は $9.6 \pm 4.0 \mu\text{g/ml}$ であった。fludarabine に関してはいくつかの報告がなされているが、実験条件の違い等によりその IC_{50} は各々の報告によりかなり幅の広い値となっている。今回使用した 5 検体の IC_{50} は、# 4; $13.2 \mu\text{g/ml}$, # 6; $12.4 \mu\text{g/ml}$, # 10; $7.8 \mu\text{g/ml}$, # 11; $12.7 \mu\text{g/ml}$, # 14; $4.0 \mu\text{g/ml}$ となり、# 14 以外の検体は fludarabine に耐性である可能性が示唆された。さらに DHMEQ と F-ara-A による相乗効果によりアポトーシス誘導能も増強されるかどうか検討した。CLL 細胞を $5 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ および $2 \mu\text{g/ml}$ の F-ara-A で 24 時間処理し、Annexin V 陽性細胞をフローサイトメーターにより測定した。その結果 Annexin V 陽性細胞の割合は、DHMEQ 単独処理で $30.9 \pm 2.2 \%$ 、F-ara-A 単独処理で $19.9 \pm 12.6 \%$ そして両者のコンビネーション処理で $53.3 \pm 10.2 \%$ ($P=0.03$) であった (Figure 22B)。さらにその効果はカスパーゼ 3 の cleaved form の増加や、Hoechst 33342 染色で検出された核の断片化やクロマチンの凝集といった核の形態変化からも確認された (Figure 22C & 22D)。以上の結果から DHMEQ は fludarabine により誘導されるアポトーシスをさらに増強させる効果を持つことが示唆された。

3-5. CD40 シグナル誘導性 NF- κ B の DHMEQ による阻害効果

in vivo における CLL 細胞の維持で CD 40 シグナルが重要な役割を果たしているという報告がある (65)。そこで CLL 細胞で起こっている CD 40 シグナルによる誘導性の NF- κ B に対する DHMEQ の影響を検討した。# 2, # 6, # 7, # 9, # 13 ($n=5$) 検体を実験に使用した。 1×10^6 個の CLL 細胞を 500 ng/ml の抗 CD 40 抗体で 37°C 、1 時間反応させ、引き続き $10 \mu\text{g/ml}$ の DHMEQ で 5 時間処理し核タンパク質を抽出した。抗 CD 40 抗体のコントロールとしてアイソタイプがマッチした IgG1 を用いた。EMSA で NF- κ B の DNA 結合活性を検出し、デンストメーターにより検出バンドの強度を測定したところ、CLL 細胞を抗 CD 40 抗体で刺激することで NF- κ B の DNA 結合活性は $224.5 \pm 65.0 \%$ ($P<0.01$) となり、NF- κ B の誘導がみられた。しかし恒常的活性化に加え抗 CD 40 抗体によりコントロールと比較して約 2 倍にまで誘導された

NF- κ B の DNA 結合活性は、DHMEQ により完全に阻害されることが明らかとなった (Figure 23)。

第4節 考察

慢性リンパ性白血病 (CLL) 細胞における NF- κ B の恒常的活性化は、NF- κ B の抗アポトーシス活性に加え、サイトカインの分泌や接着分子の発現を通して CLL 特有の形質にかかわっており、NF- κ B の恒常的活性化にその生存を依存した形質を持っているものと考えられる (65)。従って、NF- κ B 経路が CLL の治療の格好の標的になる可能性があると考えられた。効果的な CLL の新たな治療法として、NF- κ B を標的とした低分子化合物による分子標的療法を提案する。

本研究において、CLL 細胞に対する新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ による NF- κ B の恒常的活性化の抑制やアポトーシス誘導、化学療法剤 fludarabine と DHMEQ の併用による相乗効果さらに CD 40 シグナルで誘導されてきた NF- κ B の活性化の抑制を検討することにより、DHMEQ が慢性リンパ性白血病の分子標的治療薬として有効であるかどうかを検討した。

NF- κ B に対するデコイオリゴヌクレオチドを用いた研究によると、CLL 細胞に対しては NF- κ B 単独の抑制のみではアポトーシスを効果的に誘導できなかったが、プロテアソームインヒビターや CD 40 リガンドに対する抗体を使った最近の研究結果から、CLL 細胞の維持には NF- κ B が重要であることが示唆されている (65, 67-69)。本研究で得られた NF- κ B 活性を阻害することでアポトーシスを誘導できるという結果は、NF- κ B の恒常的活性化が CLL 細胞の生存を支えているということを明確に示している。NF- κ B に対するデコイオリゴヌクレオチドを用いた報告と本研究の結果との矛盾は、実験条件や使用した阻害剤の違いによるものと推察される。DHMEQ による NF- κ B の阻害は即座に起こりかつその阻害は完全であった (Figure18)。一方、細胞内に導入されたオリゴヌクレオチドによる NF- κ B の阻害は DHMEQ とは異なり、緩やかな状態で徐々に起こっている。さらに標的細胞へのオリゴヌクレオチドの導入効率の限界を考えた場合、オリゴヌクレオチドで NF- κ B 活性を完全に阻害することは非常に難しいと思われる (69)。

本研究の結果から DHMEQ により CLL 細胞で誘導されるアポトーシスのメカニズムに興味深い知見が得られた。DHMEQ による NF- κ B の阻害で Bcl-xL, c-IAP1, C-FLIP や Bfl-1 のような抗アポトーシス分子の発現が抑制された (Figure21)。このことから、DHMEQ 処理で誘導されるアポトーシスはアポトーシスを制御する NF- κ B に依存的な (NF- κ B の下流で制御されている)

遺伝子の発現抑制を伴っていることが示唆された。本研究の結果は、CLL 細胞の生き残りを制御するためにこれらの抗アポトーシス分子が重要であると主張している Morales らおよび Cuni らの報告と矛盾していなかった (70, 71)。DHMEQ は NF- κ B シグナルを阻害し CLL 細胞の生存を支える抗アポトーシス活性をブロックし、アポトーシスのスイッチを切り替え代わりにアポトーシス活性を優位にしていると考えられる。

さらに本研究で得られた結果は、DHMEQ が CLL の治療に有望な薬剤であることを示唆している。CLL 細胞の恒常的な NF- κ B の活性化に対して、NF- κ B に対する DHMEQ の抑制効果には速効性がありその阻害は完全である (Figure 18)。さらに CLL 細胞に対する DHMEQ 処理で、ほぼ 24~48 時間以内にアポトーシスを誘導することができた (Figure 20)。化学療法剤による前治療の有無にかかわらず、今回の実験に用いた全ての症例の CLL 細胞に対して、DHMEQ は NF- κ B 活性を完全に阻害して細胞生存率を低下させた (Figure 19)。また、DHMEQ のユニークな特性の一つとして正常細胞に対する影響がほとんどないことが挙げられる。事実正常末梢血単核球やその単核球から精製した B 細胞は DHMEQ 処理に対して耐性であり、アポトーシスを起こすことはなかった (Figure 19 & 20)。正常細胞が DHMEQ に耐性であるということは、実際治療薬として副作用を考えた場合、その特性は大変重要なポイントであると考えられる。

CLL 細胞の生存について、DHMEQ と fuludarabine による相乗効果を検討した。DHMEQ は CLL 細胞に対する fuludarabine の効果を増強させたが、これら 2 種類の薬剤の作用機序は独立した経路の阻害であると考えられる。すなわち DHMEQ による阻害は NF- κ B の核移行の阻害と NF- κ B の下流で制御されている抗アポトーシス遺伝子の発現抑制によって、アポトーシスを誘導している可能性が示唆されており、一方で fuludarabine は DNA や RNA の合成阻害によりその作用を発揮しているからである (72)。CLL 細胞は分裂休止状態にあるため、RNA 合成阻害やタンパク質の枯渇を誘導する fuludarabine の細胞毒性作用は、休止期にある CLL 細胞を死滅させるための重要な作用機序である (73)。

DHMEQ による NF- κ B の阻害は、CLL 細胞に対する fuludarabine の効果を、特に *in vivo* において増強すると思われる。CLL 細胞自身あるいはまわりの CD 40 リガンドを発現している正常 T 細胞や正常 B 細胞により誘導される

CD 40 シグナルが NF- κ B の活性をさらに高め、CLL 細胞の生存を支えていると考えられている (65, 71)。CLL 細胞は *in vivo* で CD 40 シグナルにより活性化が起こることで *fuludarabine* に耐性となり、アポトーシス誘導が抑制されてしまうと報告されている。この CD 40 シグナルによるアポトーシス誘導抑制のメカニズムは、主に I κ B が絡む NF- κ B のシグナル伝達経路の活性化によるものである。CD 40 による NF- κ B の活性化は I κ B の分解により順次下流へと伝達され、新たなタンパク質の合成は必要としない。従って mRNA の潤渇が原因で起こる *fuludarabine* によるタンパク質の合成阻害は、CD 40 による NF- κ B の活性化には影響を及ぼさないはずである (73)。本研究で CLL 細胞に対して DHMEQ は CD 40 シグナルにより誘導されてくる NF- κ B の活性化を阻害することを明らかにした (Figure 23)。したがって DHMEQ は *fuludarabine* 治療と組み合わせて使うことでより有効性が高まる薬剤であると考えられる。

本研究においてこれまで明らかにしてきたように、NF- κ B の恒常的活性化は、慢性リンパ性白血病細胞が生存して行くためになくてはならない分子基盤の特徴であった。DHMEQ でその恒常的 NF- κ B の活性化を阻害することで、慢性リンパ性白血病細胞に対しアポトーシスを誘導できたことから、慢性リンパ性白血病の治療に将来応用されることを期待する。さらに *in vitro* の系で DHMEQ による NF- κ B の阻害は、*fuludarabine* の効果を増強させることができた。*in vivo* においては CD 40 シグナルによる NF- κ B の活性化により *fuludarabine* の効果がブロックされている可能性があると考えられるが、DHMEQ と *fuludarabine* の併用により両者の特性を発揮できる可能性が示唆された。正常細胞に対して毒性がほとんどみられないという点で、DHMEQ は優れた新規 NF- κ B 阻害剤の候補のひとつであることが認識された。特異性と低毒性、臨床応用に適した特性ををバランスよく持つ DHMEQ により、CLL の予後の大きな改善がはかれると考える。

第5章 ホジキンリンパ腫 (HL) に対する NF- κ B 阻害剤の応用

第1節 序論

Hodgkin リンパ腫は欧米ではごく一般的な悪性腫瘍であり、わが国でも頻度は少ないものの悪性リンパ腫の 10–20 % を占める。しかし、ホジキンリンパ腫 (HL) は他の悪性腫瘍と比較すると非常に際立った特徴を有する。すなわち腫瘍細胞である Hodgkin-Reed-Sternberg (H-RS) 細胞は実は全体の 1–2 % を占めるにすぎない。腫瘍のほとんどは正常の T 細胞、形質細胞、細網細胞、好酸球に繊維化を伴う炎症性浸潤細胞からなる。H-RS 細胞は数こそ少ないが臨床症状と密接に関与し、発熱、体重減少、好酸球増多症、免疫異常といった HL に特徴的的症状を惹起する。この病態は H-RS 細胞と周囲の浸潤細胞との間の相互作用による増強シグナル、サイトカインや接着分子の産生により維持される微少環境により説明されてきた (74)。

HL の化学療法や放射線療法の向上により、1960 年代までの長い間 5 % であった生存率が 80 % 以上にまで改善した。二次病変の発生、脊髄形成異常や心臓奇形など化学療法が原因で生じる問題や化学療法耐性となってしまった HL の予後を改善してゆくことが HL の治療においていまだ残された課題である (16)。最近、腫瘍細胞の生存や増殖にかかわる分子を標的にする分子標的療法が提唱されてきた。分子標的療法は、腫瘍細胞に対し選択的に作用しかつ正常細胞における毒性を最小限にとどめる方法である (28)。分子標的療法は多剤化学療法への抵抗性を克服するための新たな治療戦略となりうる可能性を秘めている。本研究では、HL の分子標的療法を確立することを目的に、HL の生存を支える分子基盤を明らかにし、この分子機構を標的とする特異的阻害剤の評価を行なった。

H-RS 細胞の由来については最近まで明確な理解が得られていなかった。なぜなら H-RS 細胞は病変部にごく少数しか存在せず、検体として十分量の H-RS 細胞を得ることができなかつたからである。近年分子生物学的手法の進歩により一つの細胞を取り出して解析することが可能となり、H-RS 細胞はその約 95 % が胚中心 B 細胞に、残りが T 細胞に由来することが明らかとなっている (75, 76)。

H-RS 細胞に普遍的に存在し、HL の病態を説明する分子機構という観点からの理解は、1990 年代半ばまでは明確ではなかった。1996 年、Bargou らによる「NF- κ B の構成的活性化が H-RS 細胞に共通する分子機構であり、HL の病態を説明しうる。」との発表のあと、分子機構の側からの HL 腫病態に関する理解が急速に進んできた (77, 78)。

NF- κ B はリンパ球の機能や細胞の増殖、分化やウイルス遺伝子発現調節にかかわる転写因子である。NF- κ B が制御する遺伝子群には GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-2R, ICAM, E-Selectin, VCAM-1, IFN- γ のほか c-myc, p53 などが含まれ、これらは HL の病態に密接なかわりを有する分子群としても報告されている。また最近、Hintz らは H-RS 細胞において cyclin D2, Bfl-1/A1, c-inhibitor of apoptosis (c-IAP), tumor necrosis factor receptor associated factor 1 (TRAF 1), Bcl-xL, CD 86, CD 40 が NF- κ B により制御されていることを報告している (79)。

HL では、細胞表面で過剰発現している CD30 \rightarrow TRAF \rightarrow NF- κ B inducing kinase (NIK) \rightarrow I κ B kinase (IKK) \rightarrow I κ B α 経路を介して NF- κ B を活性化している。H-RS 細胞やその細胞株で I κ B α の変異 (C 末端側の欠失) が検出されたことから、I κ B α の変異による NF- κ B の構成的活性化という HL の病態を説明する報告がある (80-84)。しかし I κ B α の変異は HL の大部分の症例で正常型であり、変異は一部で検出される異常であることが報告されている。CD30 は H-RS 細胞のほぼ 100% に過剰発現している重要な分子として認知されている。通常 CD30 は CD30 リガンドとの会合により NF- κ B の活性化を介して細胞増殖や抗アポトーシス活性に関与している。しかし Horie らの報告により、H-RS 細胞において過剰発現した CD 30 は自ら会合し多量体化し、TRAF を動員して NF- κ B が活性化に至る経路を活性化する、つまりリガンド非依存的に NF- κ B を構成的に活性化していることが明らかになっている。H-RS 細胞における恒常的な NF- κ B の活性化は、細胞増殖やサイトカインの発現にとって重要であることも報告されている。H-RS 細胞での NF- κ B の恒常的活性化をアデノウイルスベクターに組み込んだ機能ドメインを欠く CD 30 Δ (CD30 デコイ) や I κ B α のドミナントネガティブ体の導入により阻害することで、最近 H-RS 細胞で重要性が報告された IL-13 の産生抑制やアポトーシスの誘導を起こすことが報告されている。このことは、CD 30 過剰発現によって誘導されている NF- κ B の恒常的活性化が、H-RS 細胞の病態の説明や腫瘍細胞の維持にとって重要であり、HL の治療の標的分子の候補となりうる

ことが考えられる (59)。

最近、腫瘍細胞における NF- κ B の活性化と化学療法耐性との関係が報告されている (85)。topoisomerase は細胞の生存にとって必要不可欠で様々な DNA metabolism にとって極めて重要な酵素である。topoisomerase は DNA のよじれを解消する酵素で I 型と II 型が存在する。topoisomerase I 型は転写にとって重要であるのに対して topoisomerase II 型は複製に必要となる酵素である。つまり topoisomerase I 型は DNA の二本鎖のうち一本のみを切断しねじれを解消し、topoisomerase II 型は二本とも切断して鎖の絡みを解消している。化学療法に使用されている CTP-11 の強力な活性型代謝産物である SN-38 は topoisomerase I 型の阻害剤であるのに対して、etoposide は topoisomerase II 型の阻害剤である。腫瘍細胞を topoisomerase 阻害剤で処理することで、IKK 経路を介しての一過性の腫瘍細胞のアポトーシス誘導を阻害する NF- κ B の活性化を誘導できることが報告されている (19)。

IKK でリン酸化されないように細工した I κ B α 変異体 (32 番と 36 番の Ser \rightarrow Ala 置換) をアデノウイルスベクターに組み込み細胞に導入して SN-38 で処理し、一過性に誘導されてくる NF- κ B の活性化を阻害することで、抗腫瘍活性を増強できることが明らかになっている (20)。もし H-RS 細胞において topoisomerase 阻害剤で NF- κ B の活性化を誘導することができれば、新たに誘導された NF- κ B も HL の治療の標的分子となることが期待される。topoisomerase 阻害剤を用いた報告で、NF- κ B の恒常的活性化を伴っている細胞を用いた報告はこれまで一つもなかったため、NF- κ B の恒常的活性のみられる H-RS 細胞、特に I κ B α の変異を有する H-RS 細胞で topoisomerase 阻害剤を用いて検討する必要がある。

片側の遺伝子座の欠失による変異でできてくる I κ B α タンパク質は、タンパク質としての機能を失っている。I κ B α の変異と正常 I κ B α タンパク質の欠損により IKK を介するシグナル伝達経路を制御できず、脱制御の結果として NF- κ B の恒常的活性が起こっているものと考えられていた (80-84)。また、topoisomerase 阻害剤による NF- κ B の誘導は IKK を介するシグナル伝達経路がかかわっていると報告されている (19, 86)。それゆえ I κ B α の変異を有する H-RS 細胞株を topoisomerase 阻害剤で処理しても NF- κ B 活性を誘導することはできないことが考えられる。

以上を踏まえ本研究において、正常 I κ B α を欠失する H-RS 細胞株だけ

ではなく正常 $I\kappa B\alpha$ を有する H-RS 細胞株の両者について、topoisomerase 阻害剤による IKK 経路の活性化に伴う NF- κ B の誘導を試みた。さらに、DHMEQ による HL に対する分子標的療法を視野におき、恒常的なあるいは topoisomerase 阻害剤により一過性に誘導されてくる NF- κ B の活性化の DHMEQ による阻害効果を、NF- κ B に対する特異性、NF- κ B 阻害作用、ホジキン細胞へのアポトーシス誘導などによる評価を行なうことにより検討した。

第2節 実験材料と方法

1. 試薬

DHMEQ は、慶應義塾大学理工学部 梅澤一夫博士より提供していただいた。カスパーゼ3インヒビター; Z-Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-FMK、カスパーゼ8インヒビター; Z-Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-FMK およびカスパーゼ9インヒビター; Z-Leu-Glu (OMe)-His-Asp (OMe) (LEHD)-FMK は全て Calbiochem より購入した。DHMEQ およびカスパーゼインヒビターはジメチルスルフォキシド (DMSO) (WAKO) に溶解し、-20 °Cで保存した。細胞生存率を測定する際に用いた 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium (MTT) (SIGNA) は、PBS (-) で 5 mg/ml の濃度に希釈し、-20 °Cで保存した。アポトーシス検出の際に用いた Hoechst 33342 (Calbiochem) は PBS (-) に溶解し、4 °Cで保存した。細胞の核染色に用いた TO-PRO-3 Iodide はフナコシより購入し、-20 °Cで保存した。topoisomerase 阻害剤 camptothecin-11 の活性型代謝産物 SN-38 は Yakult より提供していただいた。Daunorubicin および etoposide は SIGMA より購入した。すべての topoisomerase 阻害剤は DMSO で溶解し、SN-38 は -80 °C でその他は -20 °C で保存した。

2. 抗体

ウェスタンブロッティング法や免疫蛍光染色法に用いた一次抗体は以下のとおりである。抗 NF- κ B p50 (C-19) ヤギポリクローナル抗体、抗 NF- κ B p65 (F-6) マウスモノクローナル抗体、抗 I κ B β (S-20) ウサギポリクローナル抗体、抗 IKK α/β (H-470) ウサギポリクローナル抗体、抗 Bcl-xL (H-62) ウサギポリクローナル抗体、抗 FLICE inhibitory protein, long and short isoform (FLIPS/L) (H-202) ウサギポリクローナル抗体、抗 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (FL-335) ウサギポリクローナル抗体そして抗 α tubulin (TU-02) マウス immunoglobulin M (IgM) モノクローナル抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。活性化 NF- κ B p65 を検出できる抗 NF- κ B p65 マウスモノクローナル抗体は、Chemicon International より購入した。抗 phosphoserine (clone16B4) マウスモノクローナル IgM 抗体は Biomol より

購入した。

アポトーシスとその経路を検出するための抗 caspase-3/ CPP32 マウスモノクローナル抗体は BD Biosciences より、抗 cleaved caspase-8 (Asp384) ウサギポリクローナル抗体と抗 caspase-9 (Human Specific) ウサギポリクローナル抗体は Cell Signaling Technology より購入した。

ウエスタンブロットティング法に用いた二次抗体は以下のとおりである。Alkaline Phosphatase Conjugate 抗マウス innumoglobulin G (IgG) (H+L) 抗体および Alkaline Phosphatase Conjugate 抗ウサギ IgG (Fc) 抗体はプロメガ (Promega) より、Alkaline Phosphatase Conjugate 抗マウス IgM 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

免疫蛍光染色法に用いた二次抗体は以下のとおりである。fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled ヤギ抗ウサギ IgG 抗体および FITC-labeled ヤギ抗マウス IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

supershift EMSA に用いた抗 NF-B p50 (C-19) ヤギポリクローナル抗体、抗 NF-B p65 (C-20) ウサギポリクローナル抗体、抗 NF-B p52 (C-5) マウスモノクローナル抗体、抗 c-Rel (B-6) マウスモノクローナル抗体そして抗 RelB (C-19) ウサギポリクローナル抗体は全て Santa Cruz Biotechnology より購入した。

免疫沈降法に使用した抗 $I\kappa B\beta$ (S-20) ウサギポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

in vitro Kinase Assay に使用した抗 IKK α (clone B78-1) マウスモノクローナル抗体は BD Biosciences より購入した。

3. 細胞株と細胞培養

4 種類の H-RS 細胞株 (B cell; L428, KMH2, T cell; L540, HDLM2) は German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Germany) より購入した。56 °C で 30 分間非働化した子牛胎児血清 (B cell; 10 %, T cell; 20 %) を含む RPMI1640 培地 (SIGMA) に抗生物質としてペニシリン G (100 u/ml) (GIBCO) とストレプトマイシン (100 μ g/ml) (GIBCO) を添加したものを培養液として用いた。細胞はプラスチック製の培養フラスコを使用し、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター中で培養した。細胞株の継代は 1 対 4 から 1 対 9 の割合で細胞浮遊液を新しい培養液に加え培養した。細胞の凍結保存はセルバンカー (十慈フィールド株式

会社) を用い、ディープフリーザーにて行った。

4. 細胞増殖アッセイ (MTT Assay 法)

細胞を 5×10^5 cells/ml に調製し、96 ウェルプレート (Costar) に播種し (100 μ l/well)、各種の濃度の DHMEQ を添加し、37 °C、5 % CO₂ で一定時間インキュベートした。次に、MTT 溶液を各ウェルに 10 μ l ずつ加え、37 °C で 4 時間インキュベートした。その後、イソプロピルアルコールで希釈した 0.04 N HCl を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、ピペッティングによりホルマザン沈澱を十分に溶解させた後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により波長 570 nm で吸光度を測定した。コントロールとしてジメチルスルフォキシド (DMSO) を添加した検体の生存率を 100 % とし、各種濃度の DHMEQ を添加した時の細胞生存率を求めた。

5. ウェスタンブロッティング法

回収した細胞を PBS (-) で 2 度洗浄した後、Cell Lysis バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 % sodium dodecylsulphate (SDS), 1mM sodinu orthovanadate (V), 0.1 mM sodium molybdate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] を加えピペッティングにより溶解後、100 °C で 5 分間煮沸した。次にボルテックスにより激し混和し、得られた細胞懸濁液を 15,000 rpm、10 分間の遠心分離操作を行い上清を回収することで不溶物を取り除いた後、タンパク質濃度を DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) で測定した。タンパク質溶液は -80 °C で保存した。一定量のタンパク質に 5 X SDS-PAGE Sample バッファー [0.31 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % (w/v) sodium dodecylsulphate (SDS), 35 % (v/v) glycerol, 0.025 % (w/v) bromophenol blue, 25 % 2-mercaptoethanol] を 1 X になるように加え、100 °C で 5 分間煮沸し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) のサンプルとした。

スラブ型電気泳動槽にポリアクリルアミドゲル (テフコ) と Running バッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS) をセットし、ゲルの各ウェルに用意したサンプルを注入し、15~25 mA の定電流で電気泳動を行った。色素がゲルの先端近くまで移動したところで泳動を終了し、ゲルを取り外し転写バ

ッファー (125 mM Tris, 960 mM glycine, 20 % メタノール) に浸した。メタノール次に転写バッファー に浸したポリビニリデンジフロリド (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) とゲルをセミドライブロットティング装置 (日本エイドー) にセットし、180 mA の定電流で 2 時間ゲル中のタンパク質をメンブレンに転写した。

転写後のメンブレンは超純水で 3 回洗った後、5 % (w/v) スキムミルク (雪印) を含む TBST バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) により室温で 2 時間振盪し、ブロッキングを行った。一次抗体としてリン酸化抗体を用いる場合はブロッキングには 5 % (w/v) Bovine serum albumin (BSA) (SIGMA) を含む TBST バッファーを用いた。ブロッキングを行ったメンブレンは、ブロッキングバッファー で希釈した 1~2 μ g/ml の一次抗体と 4 °C で一晩反応させた。続いて TBST バッファー で 10 分間振盪しながらの洗浄を 3 回繰り返した。次に、TBST バッファー で希釈した二次抗体とメンブレンを室温で 1 時間振盪反応させ、TBST バッファー で 10 分間振盪しながらの洗浄を 3 回繰り返した。最後に Tween 20 を含まない TBS バッファー で 2 回、超純水で 1 回リンスし、Western Blue (Promega) により発色反応を行った。

6. Immunohistochemistry

PBS (-) で 2 回洗浄した細胞は、PBS (-) に再懸濁させ、Auto smear (Sakura) を使ってサイトスピンし、スライドグラス (Matsunami) にはり付けた。十分に風乾させた後、室温で 10 分間メタノールまたはホルマリン固定を行った。次に、PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS (-) で 4 μ g/ml に希釈した一次抗体 60 μ l を加え、4 °C で一晩反応させた。続いて、PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、PBS (-) で 4 μ g/ml に希釈した二次抗体 60 μ l を加え、37 °C で 30 分間暗所で反応させた。再び PBS (-) で 3 分 X 3 回の洗浄を繰り返した後、Perma Fluor Aquaqueous Mounting Medium (日本ターナー株式会社) を用いて封入した。観察までは蛍光の退色を防ぐため、冷暗所に保存した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 Radiance 2000 (Bio-Rad) を用いて行い、画像処理は Photoshop にて行った。

7. 核タンパク質の調製

細胞の核抽出液は、Andrews らの方法によって調製した。5 X 10⁵ 個の細胞を氷冷した Buffer A [10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulphonic acid (HEPES)-KOH, pH7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] 200 μl に懸濁し氷上で 5 分放置した後、ボルテックスで 10 秒間混和し、遠心分離 (15,000 rpm, 10 秒, 4 °C) を行った。次に、上清を除いた後、沈殿物に氷冷した Buffer C (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25 % glycerol, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) を 20 μl 加え氷上で 20 分放置した後、遠心分離 (15,000 rpm, 2 分, 4 °C) を行ない上清を回収し核タンパク質とした。タンパク質濃度は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて定量し実験に使用した。核タンパク質は -80 °C で保存した。

8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA で用いた二本鎖オリゴヌクレオチドは Promega より購入した。以下にその配列を示す。

NF-κB : 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

Oct-1 : 5'-TGTCGAATGCAAATCACTAGAA-3'

二本鎖オリゴヌクレオチド 1 pmol、(γ-³²P) adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Amersham Biosciences) 0.4 M Bq、T4 polynucleotide kinase (Takara) 1 μl を 20 μl の系で調製し、37 °C で 30 分反応させた。未標識のアイソトープを除くため、Push column (Stratagene) を用い精製し、得られたプローブの比活性を測定した。核タンパク質 (2 μg)、2 X binding buffer (40 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 100 mM KOH, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 0.2 % Nonidet P-40 (NP-40), 2 mM DTT, 2 mg/ml BSA Fractin V) 10 μl、1 mg/ml Poly (dI-dC) · (dI-dC) double strand (Amersham Biosciences) 2 μl そして 10 mM PMSF 1 μl を混ぜ 19 μl とし、室温で 5 分間放置後、³²P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチド (15,000-20,000 cpm) 1 μl を加え室温で 30 分結合反応を行った。スラブ型電気泳動槽にプレ泳動を行なった 6 % ポリアクリルアミドゲルと Running バッファー [25 mM Tris, 24.3 mM borate, 1 mM EDTA (0.5 X TBE)] をセットし、ゲルの各ウェルに一定量のサンプル

ルを注入し、100 V の定電圧で1 時間電気泳動を行った。泳動終了後、80 °Cで1 時間以上ゲルを乾燥させ、-80 °Cでオートラジオグラフィーを行った。X 線フィルムは XAR-5 (Kodak) を使用した。

スーパーシフトアッセイを行う場合は、³²P でラベルした二本鎖オリゴヌクレオチドを加える前に、NF- κ B サブユニットの各抗体 (2 μ g) を加え、室温で30 分反応させた。

9. *in vitro* Kinase Assay

5.0~5.7 X10⁶ 個の細胞を 37 °C、5 % CO₂ インキュベーター中で一晩培養し、100 ng/ml となるように SN-38 を加え一定時間培養を続けた。細胞を回収し cold PBS (-) で 2 回洗浄した後、TNT buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml aprotinin, 100 μ M, 20 mM β -glycerophosphate) 500 μ l に懸濁させた。ローターを使い 4 °Cで 30 分間転倒混和させた後、遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) を行ない上清を回収した。TNT buffer で洗浄した Protein G-Sepharose (アマシャム バイオサイエンス) を 50 μ l 加え再びローターを使い 4 °Cで 30 分間転倒混和させた。遠心分離 (5,000 rpm, 1 min, 4 °C) を行ない上清を回収し、2.5 μ g の抗 IKK α (clone B78-1) 抗体を加え、4 °Cで 2 時間転倒混和させた。次に TNT buffer で洗浄した Protein G-Sepharose を 20 μ l 加え再び 4 °Cで 1 時間転倒混和させた。遠心分離 (5,000 rpm, 1 min, 4 °C) を行ない上清を除去し Protein G-Sepharose を 1 ml の TNT buffer で 3 回、1 ml の Kinase buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 100 μ M Na₃O₄, 20 mM β -glycerophosphate, 2 mM DTT, 20 μ M ATP)で 1 回洗浄し、Protein G-Sepharose を 30 μ l の Kinase buffer に懸濁させた。引き続き I κ B α full length protein (amino acids; 1-317) (Santa Cruz) 1 μ g および [γ -³²P] ATP 0.5 μ l (~5 μ Ci) を加えピペティングにて混和した後、30 °Cで 30 分間反応させた。5 X SDS-PAGE Sample buffer を 18 μ l 加え 5 分間煮沸し SDS-PAGE のサンプルとした。12 % SDS-PAGE ゲルにて電気泳動を行なった後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行なった。

10. 免疫沈降法

細胞を回収し cold PBS (-) で 2 回洗浄した後、TNE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA) 500 μ l に懸濁させた。ローターを使い 4 $^{\circ}$ C で 30 分間転倒混和させた後、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) を行ない上清を回収した。TNE buffer で洗浄した Protein G-Sepharose (アマシャムバイオサイエンス) を 50 μ l 加え再びローターを使い 4 $^{\circ}$ C で 30 分間転倒混和させた。遠心分離 (5,000 rpm, 1 min, 4 $^{\circ}$ C) を行ない上清を回収し、5 μ g の抗 I κ B β (S-20) 抗体を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間転倒混和させた。次に TNE buffer で洗浄した Protein G-Sepharose を 20 μ l 加え再び 4 $^{\circ}$ C で 1 時間転倒混和させた。遠心分離 (5,000 rpm, 1 min, 4 $^{\circ}$ C) を行ない上清を除去し Protein G-Sepharose を 1 ml の TNE buffer で 5 回洗浄し、Protein G-Sepharose を 20 μ l の 5 X SDS-PAGE Sample buffer に懸濁させ 5 分間煮沸し、SDS-PAGE のサンプルとした。

11. アポトーシスと caspase の活性化機構の解析

細胞の初期アポトーシスの検出は、Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences) を用いて行った。細胞を PBS (-) で洗浄、さらに Annexin V-FITC apoptosis detection kit 付属の 1 X Binding Buffer で洗浄後、細胞を 1 X Binding Buffer 200 μ l に懸濁した。続いて、Annexin V-FITC 5 μ l を加え混和し、室温暗所で 15 分間放置した。その後、フローサイトメーター (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) により解析を行った。

Hoechst 33342 は染色体 DNA と結合し、蛍光顕微鏡 (UV フィルター) 下で観察すると青色の蛍光を発し、細胞核の形態を観察することができる。アポトーシスによってみられるクロマチンの凝集や核の断片化は、細胞を 10 μ M の Hoechst 33342 で染めた後 (37 $^{\circ}$ C、15 分間、暗所)、PBS (-) で洗浄後 UV フィルターを用いた蛍光顕微鏡 (Olympus BX50F) で観察した。

アポトーシスによってみられる caspase の活性化経路の解析は、caspase の特異抗体によるウェスタンブロッティング法と、caspase のインヒビターを用いた MTT Assay 法により検討した。5 X 10⁵ cells/ml に調製した細胞浮遊液に、終濃度が 20 μ M となるように caspase インヒビターを加え、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ で

1 時間インキュベートした。その後、終濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ となるように DHMEQ を加え、96 ウェルプレートに播種し ($100 \mu\text{l/well}$)、 37°C 、5 % CO_2 で 24 時間インキュベートした。翌日 MTT Assay を行い、各種 caspase インヒビターを添加したサンプルと添加しなかったサンプルの細胞生存率を比較した。

12. ポリアデニル酸 [Poly(A)⁺] RNA の調製

培養細胞株からの Total RNA 抽出は、ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて行なった。細胞のペレットに ISOGEN を加え激しく混和し、室温に 5 分間放置した後、1/5 vol. のクロロホルムを加え再び激しく混和した。遠心分離により上清 (RNA 層) を回収した後、等量の 2-propanol を加え転倒混和し、室温に 10 分間放置し、遠心分離により Total RNA の沈澱を得た。得られた Total RNA は、80 % エタノールでリンスし風乾後、diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解した。さらに、Oligotex-dT30 super (Roche) を用いて [Poly(A)⁺] RNA の調製を行なった。Total RNA $100 \mu\text{l}$ に等量の 2 X Elution buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.2 % sodium dodecylsulfate (SDS)] を加え混合した後、Oligotex-dT30 super を $200 \mu\text{l}$ 加えた。 65°C で 5 分間熱変性し、氷上で 3 分間急冷後、 $40 \mu\text{l}$ の 5M NaCl を加え (終濃度 500 mM) 攪拌し、 37°C で 10 分間インキュベート後、遠心分離 (15,000 rpm、室温、10 分) し上清を除去した。ペレットを $500 \mu\text{l}$ の Washing buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 0.1 M NaCl) に懸濁し、 37°C で 10 分間放置、続いて遠心分離 (15,000 rpm、室温、10 分) し上清を除去した。ペレットを $200 \mu\text{l}$ の TE 緩衝液に懸濁し、 65°C で 5 分間加熱し、Oligotex-dT30 から [Poly(A)⁺] RNA を溶出した。遠心分離 (15,000 rpm、室温、10 分) し上清を回収後、エタノール沈澱によって [Poly(A)⁺] RNA を得た。得られた [Poly(A)⁺] RNA は、80 % エタノールでリンスし風乾後、DEPC 処理水に溶解し、分光光度計による定量を行い目的の実験に使用した。

13. プローブ DNA の作製

[Poly(A)⁺] RNA $0.5 \mu\text{g}$ に DEPC 処理水を加え $12.7 \mu\text{l}$ とし、 70°C で 10 分間処理した後氷上で急冷を行なった。これに逆転写酵素付属の 5 X First strand

buffer 4 μ l、0.1 M DTT 1 μ l、25 mM 4dNTPs 0.8 μ l、(dT)₁₆ primer 50 pmol として RNase Inhibitor (TOYOBO) 0.5 μ l を加え総量 20 μ l とした。42 °C で 2 分間反応させた後、逆転写酵素 SuperScript II (Invitrogen) 1 μ l (200U) 加え 42 °C で 50 分間インキュベートした。その後、70 °C で 15 分間の反応で逆転写酵素を失活させ cDNA を合成した。

次に、cDNA 2 μ l、2.5 mM 4dNTPs 4 μ l、10 X Ex Taq buffer 5 μ l、センスプライマー 25 pmol、アンチセンスプライマー 25 pmol、Ex Taq (Takara) 0.25 μ l に滅菌水を加え 50 μ l とし、94 °C, 1 min \rightarrow (95 °C, 30 sec \rightarrow 61 °C, 30 sec \rightarrow 72 °C 1 min) X 35 cycles \rightarrow 72 °C 5 min の条件下で polymerase chain reaction (PCR) による増幅を行なった。各プライマーは以下のように設計した。

Bcl-xL センス: 5'-ATGTCTCAGAGCAACCGGGAG-3'

Bcl-xL アンチセンス: 5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGAGC-3'

c-FLIP センス: 5'-GCTTCCCTAGTCTAAGAGTAG-3'

c-FLIP アンチセンス: 5'-AGGATCCTTGAGACTCTTTTGG-3'

アガロースゲル電気泳動により目的のサイズのバンドをゲルから切り出し、suprec-01 (Takara) を用いて DNA フラグメントを溶出した。これをエタノール沈澱で濃縮した。TA クローニングベクター (pGEM-T easy; Promega) 0.03 pmol に DNA フラグメント \sim 0.08 pmol、10 X T4 DNA ligase buffer 0.5 μ l、T4 DNA ligase (Takara) 0.4 μ l と滅菌水を加え 5 μ l とし、16 °C で一晩ライゲーション反応を行なった。

次にライゲーション終了後の反応溶液はコンピテントセル *E.coli JM109* (Takara) を用いて大腸菌に導入し、個々の大腸菌クローンからプラスミド DNA を抽出し、挿入断片の有無さらにシーケンスにより塩基配列を確認し、目的のプラスミドを得た。

その後、大量調製した目的のプラスミドを制限酵素 EcoRI (Takara) で消化し、アガロースゲル電気泳動を行い目的のサイズのバンドをゲルから切り出し精製し、プローブ DNA として使用した。

14. ノーザンブロット法

サブマリン型電気泳動槽に 1 % ホルマリンアガロースゲルと Running バッファー (40 mM MOPS, 10 mM 酢酸ナトリウム pH 7.0, 1 mM EDTA) をセットし、ゲルの各ウェルに用意したサンプルを注入し、100 V の定電圧で約 3 時間電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、20 X SSC (3M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム) を用いたキャピラリー法によるブロッティングを一晩行なった。メンブレンは Hybond-C extra-nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience Corp.) を使用した。ブロッティング後のメンブレンは、4 X SSC でリンスした後、80 °C で 2 時間ベーキングを行ないメンブレンに RNA を固定した。ハイブリダイゼーションバックにメンブレンを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液 (6 X SSC, 1 X Denhardt's, 0.1 M NaPO₄, pH 7.0, 0.1 mg/ml 熱変性サケ精子 DNA) を加えてシールし、65 °C で 2~3 時間プレハイブリダイゼーションを行なった。プレハイブリダイゼーション終了後、メンブレンにハイブリダイゼーション溶液 (4 X SSC, 1 X Denhardt's, 0.5 % SDS, 0.1 M NaPO₄, pH 7.0, 10 % Dextran Na, 0.1 mg/mL 熱変性サケ精子 DNA) とアイソトープによって標識したプローブ ($\sim 1.0 \times 10^6$ cpm/mL) を加えてシールし、65 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。プローブ DNA 20 ng は、Random Primed DNA Labeling Kit (Roche) を用いて [α -³²P] dCTP 標識し、Sephadex G50 カラムで精製し熱変性後使用した。ハイブリダイゼーション後、Washing buffer (0.2~0.5 X SSC, 0.1 % SDS) で 2 回洗浄 (65 °C、15 分間) し、オートラジオグラフィーを -80 °C にて行なった。X 線フィルムはコダック社製の XAR-5 films を用いた。

15. *in vivo* モデルにおける DHMEQ の治療効果

実験で使用した NOD/SCID/ γ cnull (NOG) マウスは、財団法人実験動物中央研究所 (Central Institute for Experimental Animals) (川崎) より購入した。1 X 10⁷ 個の H-RS 細胞を NOG マウスの耳周囲の皮下に接種した。DHMEQ を、12 mg/kg の条件で細胞を接種した当日あるいは腫瘍が触知できはじめた 5 日後から週に 3 回の割合で 1 ヶ月間腹腔内に投与した。コントロールマウスには、DHMEQ 処置群と全く同じ手順で、RPMI 1640 培養液 200 μ l を投与した。細胞接種から 1 ヶ月間経過を観察し、それから腫瘍の大きさの計測や免疫組織

化学的研究を行なうために処置を施した。摘出した腫瘍は Streck Tissue Fixative (S. T. F) で固定し、パラフィン包埋ブロックとし薄切した後、ヘマトキシリンエオジン染色を行なった。マウスを使った *in vivo* モデルの実験は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 Md. Zahidunnabi Dewan 博士に協力していただいた。

第3節 結果

3-1. I κ B α 変異を持つ H-RS 細胞株に対する topoisomerase 阻害剤による一過性の NF- κ B 活性の誘導

まず初めに I κ B α 変異のない H-RS 細胞株 (L540, HDLM2) と I κ B α 変異があり正常 I κ B α タンパク質が欠失している H-RS 細胞株 (L428, KMH2) において、topoisomerase 阻害剤が NF- κ B の活性化レベルにどの程度影響を及ぼすかを検討した。5 X 10⁵ 個の細胞を、100 ng/ml SN-38、2 μ M daunorubicin あるいは 50 μ M etoposide で一定時間処理し、核タンパク質を抽出後 EMSA を行なった。I κ B α 変異のない細胞株では、topoisomerase 阻害剤で処理することで一過性の NF- κ B の活性化が認められ、活性のピークは処理後 1~2 時間であった (Figure 24A top)。一方 I κ B α 変異がある L428 と KMH2 細胞株では、予想に反し NF- κ B の活性化が認められた。L428 細胞株の活性のピークは 1 時間であったが、KMH2 細胞株ではやや遅く処理後 4~5 時間で活性のピークを迎えた (Figure 24A bottom)。topoisomerase 阻害剤で一過性に誘導されてきた NF- κ B の構成タンパク質を同定するために、各々の topoisomerase 阻害剤で処理した 5 時間後の KMH2 細胞株の核タンパク質を用いて EMSA を行なった。その結果、一過性に誘導されてきた NF- κ B の構成タンパク質には p50 および p65 が含まれていることが明らかとなった (Figure 24B)。次に H-RS 細胞株に対する topoisomerase 阻害剤処理による NF- κ B の誘導に IKK の活性化が関与しているかどうかを検討した。L540 および KMH2 細胞株に対して topoisomerase 阻害剤である SN-38 処理を施し、IKK の一過性の活性化を *in vitro* Kinase Assay 法で IKK のリン酸化検出することにより評価した。その結果、両細胞株において 0.5~1 時間で明らかに IKK のリン酸化が確認された (Figure 24C)。これらの結果より、I κ B α 変異の有る無しにかかわらず topoisomerase 阻害剤で誘導されてくる一過性の NF- κ B の活性化には IKK 経路の活性化が関与し、恒常的に活性化している NF- κ B のみならず、新たに誘導されてくる NF- κ B もホジキンリンパ腫治療の格好の標的分子となりうるということが示唆された。

3-2. topoisomerase 阻害剤による NF- κ B の誘導における I κ B β の関与

I κ B α と I κ B β は機能重複を有し酵素活性も非常に似ているという報告がなされている (87)。そこで、I κ B α 変異を持つ H-RS 細胞の topoisomerase 阻害剤による NF- κ B の誘導には I κ B β が機能していることが考えられた。この仮説を検証するために、細胞内での I κ B β と p65 や p50 の結合、SN-38 処理後の I κ B β のリン酸化や I κ B β の分解を検討した。I κ B β は I κ B α と同じように N 末側にあるセリン残基のリン酸化により制御されている (88)。そこで I κ B β タンパク質のリン酸化は免疫沈降後の I κ B β タンパク質を抗 phosphoserine 抗体で検出することで確認した。また I κ B β の分解は SN-38 処理後の活性化 p65 と I κ B β の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。免疫沈降法の結果、L428 細胞では I κ B β と p65 あるいは I κ B β と p50 が細胞内で複合体を形成していることが明らかとなった (Figure 25A)。L428 細胞では SN-38 処理後 0.5–1 時間で I κ B β タンパク質の減少が認められた (Figure 25B)。I κ B β タンパク質のリン酸化は SN-38 処理後約 15 分でピークに達して瞬時にリン酸化が起こることが明らかとなった (Figure 25C)。I κ B β タンパク質の減少はリン酸化に伴い引き続き起こる分解によるものであることが示唆された。L428 細胞を SN-38 で刺激することで誘導されてくる NF- κ B は、刺激後 1 時間でピークに達していた (Figure 25D)。共焦点レーザー顕微鏡による解析から、SN-38 処理前は細胞全体に拡散するように分布していた活性型の p65 は、SN-38 処理後 1 時間で核内に集まり、2 時間後には再び細胞質にも分布することが明らかとなった (Figure 25E top panels)。一方、I κ B β は SN-38 処理後 1 時間で発現量が減少し、2 時間で元のレベルまでようやく回復してくる結果が得られた (Figure 25E bottom panels)。topoisomerase 阻害剤処理 → IKK の活性化 → I κ B β のリン酸化 → I κ B β の分解 → NF- κ B の活性化というシグナル伝達の一連の流れが L428 細胞で確認された。以上の結果から、野生型 I κ B α を欠失する H-RS 細胞の topoisomerase 阻害剤による NF- κ B の誘導には I κ B β が関与することが強く示唆された。

3-3. DHMEQ による恒常的 NF- κ B の活性化阻害に伴う H-RS 細胞増殖の抑制とアポトーシス誘導

次に、H-RS 細胞株の恒常的 NF- κ B の活性化に対する DHMEQ の効果を調べることを目的に、4 種類の H-RS 細胞株を 10 μ g/ml の DHMEQ で 7 時間処理し恒常的 NF- κ B の DNA 結合活性を EMSA により検討した。I κ B α の変異が有る無しにかかわらず全ての細胞株でみられる NF- κ B の恒常的活性化は DHMEQ 処理により明らかに阻害される結果となった (Figure 26A)。L428 および L540 細胞株を用いて DHMEQ 処理後の活性型 NF- κ B p65 の動態を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、DHMEQ は NF- κ B の核移行を阻害するという概念を支持する結果が得られた (Figure 26B)。さらに NF- κ B の DNA 結合活性は DHMEQ 処理後 1 時間ではほぼ完璧に阻害され、コントロールの Oct-1 に対してほとんど影響を及ぼさず、その阻害効果は NF- κ B に特異的であることが示された (Figure 26C)。また、DHMEQ により影響を受けた NF- κ B の構成タンパク質には p50 および p65 が含まれていることが supershift EMSA の結果より明らかとなった (Figure 26D)。

次に DHMEQ の H-RS 細胞株の生存率に及ぼす影響を調べた。MTT assay の結果より、4 種類全ての H-RS 由来細胞株の細胞生存率の減少は DHMEQ 濃度依存的であることが示された。しかし、正常末梢血単核球 (PBMC) の生存率は 20 μ g/ml の高濃度の条件においてさえも H-RS 由来細胞株のような明らかな影響は示さなかった (Figure 27A)。さらに DHMEQ による H-RS 細胞株へのアポトーシス誘導の可能性を Annexin V 活性や核の断片化を解析することで評価した。DHMEQ の濃度は MTT assay の結果に基づいて決定し、L428 および KMH2 は 20 μ g/ml、L540 および HDLM2 は 10 μ g/ml を採用した。フローサイトメーター法による解析結果から H-RS 細胞株に対する DHMEQ 処理で Annexin V 陽性細胞数の明らかな増加が認められた (Figure 27B)。Hoechst 33342 染色の結果から核の断片化やクロマチンの凝集が確認でき、H-RS 細胞株に対する DHMEQ 処理でアポトーシスが誘導されることが示唆された (Figure 27C)。H-RS 細胞株とは対照的に正常 PBMC では DHMEQ 処理によって現れるアポトーシスの特徴が認められず、DHMEQ の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。以上の結果から、H-RS 細胞に対して DHMEQ は NF- κ B の恒常的活性化を選択的に阻害し、I κ B α の変異が有る無しにかかわらずアポト

ーシスを誘導することが示唆された。

3-4. カスパーゼ 3、 8 および 9 の活性化を伴うアポトーシス

DHMEQ により NF- κ B の恒常的活性化を阻害することで起こるアポトーシスの誘導にカスパーゼカスケードの活性化がかかわっていることを確かめるために、まず初めにカスパーゼ 3 の活性化をウエスタンブロット法により調べた。カスパーゼ 3 はアポトーシスの典型的な特徴を示すのに必須の物質である。不活性前駆体として細胞質に存在し 32 kDa のプロカスパーゼ 3 は、カスケードの活性化により分子内の特定部位で切断が起こり プロセッシングにより 32 kDa プロカスパーゼ量の減少が示された。この結果より DHMEQ により誘導されるアポトーシスはカスパーゼカスケードの活性化が関わっていることが示唆された。細胞内でのカスパーゼの活性化機構には、ミトコンドリアから流出したシトクロム c が カスパーゼ 9 の活性化因子である Apaf-1 に結合し活性化される系と、Fas や TNF レセプター (デスレセプター) の複合体にカスパーゼ 8 もしくは -10 が直接結合し活性化される系の二つがある。次にカスパーゼ 3 の上流にあるこの 2 つのカスパーゼカスケードの活性化を調べた。46 kDa プロカスパーゼ 9 の減少とカスケードの活性化により生じるカスパーゼ 8 の 10 kDa の切断断片の増加が認められ、DHMEQ 処理によりカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 カスケードの両方が活性化されることが明らかとなった (Figure 28A)。以上の結果を踏まえ、DHMEQ 処理により誘導されてくるアポトーシスを各々のカスパーゼ阻害剤を用い抑制できるかどうか検討した。KMH2 細胞株を 50 μ M のカスパーゼ阻害剤で 1 時間反応させた後 15 μ g/ml の DHMEQ で 12 時間処理し MTT assay により細胞生存率を求めた。カスパーゼ阻害剤によるアポトーシスの抑制は完全ではなかったが、カスパーゼ阻害剤処理により明らかにアポトーシスの軽減が認められた (Figure 28B)。

H-RS 細胞においては抗アポトーシス活性を有する Bcl-xL や c-FLIP といった抗アポトーシス遺伝子の発現がしばしば報告されている (89-92)。Bcl-xL はミトコンドリア系カスパーゼに、c-FLIP は膜系カスパーゼに対する強力なインヒビターとして働く分子として知られていたため、DHMEQ 処理後のこれらの分子の発現の変化をノーザンブロット法と免疫化学染色法により調べた (93)。DHMEQ 処理で Bcl-xL の発現レベルは 1/4 程度にまで、c-FLIP の発現レベル

は 1/10 程度にまで抑制されることが明らかとなった (Figure 28C & 28D)。以上の結果をまとめると、DHMEQ 処理により誘導されてくる H-RS 細胞株のアポトーシスは、Bcl-xL や c-FLIP の発現抑制を伴う膜系およびミトコンドリア系カスパーゼカスケードの活性化により誘導されることが確認された。

3-5. *in vivo* モデルにおける H-RS 細胞に対する DHMEQ の増殖抑制効果

これまで得られた結果からホジキンリンパ腫患者の治療にとっての DHMEQ の有効性が期待された。そこで、NOG マウスモデルを使い移植された H-RS 細胞の DHMEQ 処理による増殖抑制効果を検討した。予想通り 1 ヶ月で DHMEQ 処理群は腫瘍の大きさが縮小し、明らかに腫瘍組織のサイズおよび重さも 1/3 程度にまで減少する結果となった (Figure 29A & 29B)。DHMEQ はマウスの生体内で樹立された腫瘍 (L540 や KMH2 細胞) の増殖を抑制し、結果として腫瘍サイズの縮小が認められた。このことは *in vitro* の実験でも証明されたように、野生型 I κ B α の欠失に関係なく DHMEQ は作用することを示唆している (Figure 29C & 29D)。今回の DHMEQ の投与量 (12 mg/kg を 1 週間に 3 回、1 ヶ月間投与) では体重減少や悪液質といった副作用は認められず、十分耐容性のある濃度であった。さらに DHMEQ 投与マウスの腫瘍組織標本では、アポトーシスを起こした細胞が見られた (Figure 29E)。以上の結果は、DHMEQ は野生型 I κ B α の欠失に関係なく *in vivo* においてもホジキンリンパ腫腫瘍の縮小に効果的であることを示唆する。

3-6. topoisomerase 阻害剤の抗腫瘍活性の DHMEQ による増強作用

KMH2 細胞株で topoisomerase 阻害剤で一過性に誘導されてくる NF- κ B 活性に対する DHMEQ の効果を調べた。恒常的な NF- κ B 活性に加え、topoisomerase 阻害剤で一過性に誘導されてくる NF- κ B 活性も DHMEQ 処理によりほとんど完全に阻害される結果となった (Figure 30A)。共焦点レーザー顕微鏡観察により、SN-38 と DHMEQ 処理により活性型 NF- κ B p65 の分布が核内から細胞質へと蓄積の変化が認められ、DHMEQ は NF- κ B の核移行を阻害するという概念をさらに支持する結果となった (Figure 30B)。

topoisomerase 阻害剤と DHMEQ により H-RS 細胞に対する抗腫瘍効果の増

強がみられるか検討を行なった。10 μ g/ml DHMEQ に対して抵抗性のあった B cell 系 H-RS 細胞株である KMH2 細胞株を使用した。致死量以下の topoisomerase 阻害剤に 10 μ g/ml DHMEQ の有無で 48 時間反応させ MTT assay を行ない細胞生存率を求めた。SN-38、daunorubicin、etoposide いずれの topoisomerase 阻害剤においても DHMEQ との併用で抗腫瘍効果の増強が認められた (Figure 30C)。さらに topoisomerase 阻害剤と DHMEQ の併用で認められた抗腫瘍効果の増強作用によりアポトーシスの誘導能も増強されるかどうか検討を行なった。コンビネーションで用いることによって、Annexin V 陽性細胞の増加、細胞核の形態変化をきたした細胞の増加が認められた (Figure 30D & 30E)。加えて DHMEQ は L428 細胞株に対し SN-38 で誘導されるカスパーゼ 3 の活性化を増強させることが示された (Figure 30F)。以上の結果から H-RS 細胞での topoisomerase 阻害剤で誘導される一過性の NF- κ B を DHMEQ により阻害することで、topoisomerase 阻害剤本来の抗腫瘍活性を増強できることが考えられる。

第4節 考察

本研究において H-RS 細胞での NF- κ B レベルは非常に高いにもかかわらず、topoisomerase 阻害剤での IKK 経路の活性化によりさらなる NF- κ B の活性化が誘導されたことを示した。そしてその一過性の NF- κ B の活性化は、I κ B α の変異の有る無しにかかわらず 調べた全ての H-RS 細胞株で共通な現象であり、野生型 I κ B α が欠失している H-RS 細胞の NF- κ B の誘導には I κ B β が関与していることを明らかにした (Figure 25)。さらに新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は H-RS 細胞の I κ B α の変異の有無にかかわらず topoisomerase 阻害剤で誘導される一過性の NF- κ B を阻害することで、topoisomerase 阻害剤が持つ本来の細胞毒性作用を増強させる効果があることを明らかにした (Figure 30)。これらの結果から、ホジキンリンパ腫の分子基盤の特徴と治療を考えあわせると、恒常的に発現している NF- κ B と誘導性の NF- κ B は重要な標的分子の一つであることが示唆される。そして DHMEQ の細胞増殖抑制効果やアポトーシス誘導効果から、ホジキンリンパ腫の分子標的薬として適していることが考えられた。

topoisomerase 阻害剤によって誘導される NF- κ B シグナル上流の IKK と I κ B α の活性化機構についての研究は多数報告されている (19, 86)。topoisomerase 阻害剤は核内の二本鎖 DNA にニックを入れて二本鎖 DNA のコイル構造やスーパーコイル構造を作っていたねじれを解消し DNA に障害を与え、その障害が IKK 複合体に伝わり IKK のシグナル伝達経路が活性化されると言われている。例えば P13K 関連キナーゼの一種である ATM (ataxia-telangiectasia mutated) や DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) といったいくつかの分子がこの活性化経路に関わっていることが報告されている (94, 95)。最近の研究報告においては、topoisomerase 阻害剤によって NF- κ B を活性化するような新たな分子が合成されるということは言われていない。従って H-RS 細胞に対する topoisomerase 阻害剤による一過性の IKK および NF- κ B の活性化は、NF- κ B の強力で恒常的活性化を有する H-RS 細胞株においても同様の活性化経路により制御されていることが示唆される。

H-RS 細胞のおよそ 10~20% は I κ B α 遺伝子上にホモまたはヘテロの変異があり、そこから読み取られた I κ B α は C 末端側欠失を有しその結果 NF- κ B に結合できなくなっていることが報告されている。I κ B α の変異による正常

I κ B α の欠失が H-RS 細胞での恒常的 NF- κ B の活性化の原因の一つとなっていることが報告されている (80-84)。もし I κ B α が H-RS 細胞で NF- κ B を制御する唯一の分子であるならば、正常な I κ B α の欠失により、NF- κ B は上流の IKK の活性化状態に関係なく脱制御状態となると考えられる。しかし正常な I κ B α を欠失する H-RS 細胞株に対する topoisomerase 阻害剤処理において IKK 経路を介する NF- κ B の活性化が明らかとなったことより、I κ B α に替わってシグナル伝達に関わる I κ B α 以外の分子の存在が示唆された。H-RS 細胞にアデノウイルスベクターに組み込んだ細胞質ドメインを持たないデコイ CD30 を導入することで、NF- κ B の構成的活性化を阻害するという結果が得られている (59)。さらにプロテアソームインヒビター PS341 が正常 I κ B α の欠失している H-RS 細胞に対してアポトーシスを誘導するという報告がなされていることから、I κ B α に替わる分子の存在が想定される (96)。本研究では I κ B β が H-RS 細胞において NF- κ B の活性化に関与していること、正常 I κ B α の欠失している H-RS 細胞では I κ B β が I κ B α の代わりに IKK-NF- κ B 経路を制御していることを示唆する結果を示した。さらに I κ B α と I κ B β の機能的類似性や酵素活性の類似性が報告されていることを考えあわせると、I κ B α を欠失する H-RS 細胞においては I κ B β が I κ B α に替わって機能していることが強く示唆された (87)。

本研究の結果から、NF- κ B の恒常的な活性だけではなく一過性に誘導されてくる NF- κ B 活性もホジキンリンパ腫治療の格好の標的分子となることが考えられた。topoisomerase 阻害剤である SN-38、daunorubicin や etoposide は、H-RS 細胞株でみられる強力な恒常的 NF- κ B 活性に加えてさらに一過性の NF- κ B 活性を誘導することができた (Figure 24A)。H-RS 細胞株を 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF) ファミリーの一員である CD 40 リガンドや TNF- α で刺激しても NF- κ B 活性がそれ以上活性化されないことが報告されている (81, 84)。このことは、H-RS 細胞では TNF レセプターファミリーから TRAF を介して IKK にいたる経路は強力的に活性化しており、さらなる活性化刺激に反応しないが、IKK のレベルでは活性化刺激に反応することを示唆している。本研究では topoisomerase 阻害剤による誘導性の NF- κ B 活性を DHMEQ により阻害することで topoisomerase 阻害剤の効果を増強させることが示された (Figure 30)。このことは誘導性の NF- κ B 活性は H-RS 細胞に対する topoisomerase 阻害剤の感受性を鈍らせるが、DHMEQ により誘導性の NF- κ B

活性を阻害することにより topoisomerase 阻害剤の抗腫瘍活性を回復させることができることを示唆する。

DHMEQ による NF- κ B 活性の阻害効果は処理後 1 時間からそれ以降もはっきりと認められ、NF- κ B 活性の阻害よりも遅れてアポトーシス誘導が起こっている。このことは H-RS 細胞に対する DHMEQ によるアポトーシス誘導は二次的な現象であり、遺伝子発現の制御を介してアポトーシスが誘導されているものと考えられる。H-RS 細胞をアポトーシスに導くためには、death レセプターや細胞毒性作用を持つ薬剤による刺激がない状態で恒常的な NF- κ B の活性化を阻害することで十分であると考えられる。H-RS 細胞の生存は抗アポトーシス活性とアポトーシス促進活性のバランスの上に成り立っている。DHMEQ により抗アポトーシス分子として機能する c-FLIP や Bcl-xL の発現抑制が起こり、両活性のバランスの崩壊によりアポトーシスが誘導されたものと思われる (90-92)。

速効性と特異性を有する DHMEQ は H-RS 細胞の NF- κ B を阻害するのに相応しい化合物であると考えられる。他の研究機関で行なわれた gliotoxin、MG132、arcenic や PS341 を使用した報告からも、これらの低分子化合物により H-RS 細胞の NF- κ B 活性を阻害できる可能性があることを示唆している。しかし gliotoxin、MG132、arcenic や PS341 の NF- κ B に対する特異性を DHMEQ のそれと比較すると相対的に低いと考えられる (96-98)。理由として gliotoxin、MG132、arcenic や PS341 の標的は IKK であるのに対して、DHMEQ の標的は IKK よりさらに下流に存在していることが挙げられる。さらに gliotoxin、MG132 や PS341 は 元々はプロテアソーム阻害剤であり、機能の一部として抗 NF- κ B 活性を有しているにすぎない (96, 98)。arcenic もスルフィドリル基の活性阻害を通して種々の分子の機能を阻害、そして IKK を含む NF- κ B 経路の阻害もその機能の一部であることが知られている (97)。したがってその特異性が問題点として挙げられる。

DHMEQ の興味深い特性として正常細胞に対して毒性が低いことが挙げられる。正常末梢血単核球は DHMEQ によるアポトーシス誘導に耐性であったが、そのメカニズムはまだはっきりとわかっていない。NOG マウスによる *in vivo* モデルの結果から、DHMEQ の細胞増殖抑制効果を発揮する濃度でのマウスに対する毒性はほとんどないように思われる。一週間に 3 回の DHMEQ 投与で明らかに抗腫瘍活性が現れ、それに伴う体重減少のような副作用は全く認めら

れなかった (Figure 29)。今回の実験で設定した 12 mg/kg という濃度は、LD50 (180 mg/kg) の約 1/10 にも満たない量であった。従って DHMEQ は H-RS 細胞に対する NF- κ B 阻害剤として相応しいものであると考える。

恒常的あるいは誘導性の NF- κ B は、I κ B α の変異には関係なくホジキンリンパ腫治療の格好の標的分子となり得ることが示唆された。そしてトランスレショナルリサーチに向けて新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ は有望な薬剤の一つであり、臨床応用されることを期待する。

第6章 総括

第一章では本研究の背景と目的について概説した。NF- κ B が癌化や癌細胞の増殖、生存に重要な働きをしていることが明らかになっており、NF- κ B は重要な分子標的の一つとして考えられている。NF- κ B の恒常的活性化を伴う代表的な血液系悪性腫瘍に、多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM)、成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma; ATL)、慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia; CLL)、ホジキンリンパ腫 (Hodgkin lymphoma; HL) そしてマントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma; MCL) が挙げられる。本研究では、抗リウマチ薬として開発途上にあつた新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ を用い、血液系悪性腫瘍 (MM、ATL、CLL、HL) に対する NF- κ B 活性化阻害作用、細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果とその作用機序などを調べ、DHMEQ による血液系悪性腫瘍の治療と化学予防の基礎的検討を行った。

第二章では多発性骨髄腫 (MM) に対する DHMEQ の効果を検討した。MM 細胞株および新鮮 MM 細胞における NF- κ B の恒常的活性化は、DHMEQ により特異的に阻害され、細胞周期の G0/G1 における停止およびアポトーシスを誘導した。この過程には細胞周期に関わる cyclinD1、D2 および抗アポトーシスに関わる c-FLIP および Bcl-xL の発現抑制が関与することが示唆された。DHMEQ は正常末梢血単核球 (PBMC) の NF- κ B の恒常的活性化に対する抑制、アポトーシス誘導とも明らかではなかった。さらに *in vivo* モデルの系においても DHMEQ は MM 細胞に対する抗腫瘍活性を示し、マウスへの毒性は明らかでなかった。縮小した MM 腫瘍においては VEGF の発現が低下しており、VEGF が NF- κ B でコントロールされていること、腫瘍の増殖に関与していることを示唆する結果を示した。

第三章では成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATL) および HTLV-1 キャリア PBMC 中の感染細胞に対する DHMEQ の効果を検討した。ATL 細胞株および新鮮 ATL 細胞における NF- κ B の恒常的活性化は、DHMEQ により特異的に阻害され、細胞周期の G0/G1 における停止およびアポトーシスを誘導した。この過程には cyclinD1、D2、および c-FLIP および Bcl-xL の発現抑制、Rb のリン酸化の抑制がかかわり、細胞周期の G0/G1 における停止およびアポトーシスが誘導されると考えられた。DHMEQ は正常末梢血 T 細胞の NF- κ B の恒

常的活性化に対しては抑制、アポトーシス誘導とも明らかではなかった。*in vivo* モデルの系においても DHMEQ は ATL 細胞に対する抗腫瘍活性を示し、マウスの生存を有為に高めた。

さらに HTLV-1 キャリア末梢血感染細胞においてすでに恒常的 NF- κ B を呈することを明らかにし、DHMEQ は HTLV-1 ウイルスのコピー数を減じることができることを示した。このことは、HTLV-1 感染細胞において恒常的 NF- κ B が感染細胞の生存、増殖を支えていること、DHMEQ 処理により感染細胞が除去できることを示唆する。さらに NF- κ B が ATL の発症予防の重要な分子標的であることが示唆された。

第四章では慢性リンパ性白血病細胞 (CLL) に対する DHMEQ の効果を検討した。DHMEQ は新鮮 CLL 細胞における NF- κ B の恒常的活性化を阻害、アポトーシスを誘導した。この過程は膜およびミトコンドリア系カスパーゼの活性化、抗アポトーシスにかかわる c-FLIP、c-IAP、Bcl-xL および Bfl-1 の発現抑制を伴うことを示した。DHMEQ は正常末梢血 B 細胞の NF- κ B の恒常的活性化に対しては抑制、アポトーシス誘導とも明らかではなかった。Fludarabine は現在 CLL の key drug として臨床で使用されているが、DHMEQ が fludarabine により CLL 細胞に誘導されるアポトーシスを増強することを示した。CD40-NF- κ B シグナルは *in vivo* における CLL 細胞の生存および fludarabine 抵抗性に関与していると考えられている。本研究では DHMEQ が CLL 細胞における CD40-NF- κ B シグナルを阻害できることを示した。これらの結果は、臨床の現場において DHMEQ と fludarabine の併用が CLL に対する化学療法の有効性を高めたり、CLL の化学療法抵抗性の克服に寄与するものと考えられた。

第五章ではホジキンリンパ腫 (Hodgkin lymphoma; HL) に対する DHMEQ の効果を検討した。HL の腫瘍成分である Hodgkin-Reed-Sternberg (H-RS) 細胞株における NF- κ B の恒常的活性化は DHMEQ により阻害され、H-RS 細胞株にアポトーシスが誘導された。この過程において H-RS 細胞の生存に重要とされている c-FLIP および Bcl-xL の発現抑制を認めた。さらに *in vivo* モデルの系においても DHMEQ は H-RS 細胞株に対する抗腫瘍活性を示し、マウスへの毒性は明らかではなかった。H-RS 細胞の一部は I κ B α の変異を認め、NF- κ B の恒常的活性化に関与すると報告されている。DHMEQ の効果は *in vitro*、*in vivo* とも I κ B α の変異の有無に関わらず認められた。topoisomerase

阻害剤は、DNA 障害を介して IKK-I κ B-NF- κ B 経路を活性化させ、topoisomerase 阻害剤抵抗性に関与することが報告されている。topoisomerase 阻害剤は H-RS 細胞において I κ B α の変異の有無に関わらず一過性のさらなる NF- κ B 活性化を誘導した。このことは I κ B α 変異を有する H-RS 細胞においては I κ B α に代る分子の存在が想定される。本研究において同じ I κ B ファミリーに属する I κ B β が I κ B α の機能を代替していることを示した。さらに DHMEQ は、H-RS 細胞の topoisomerase 阻害剤で誘導される一過性の NF- κ B を阻害することで、topoisomerase 阻害剤の細胞毒性作用を増強させる効果があることを明らかにした。したがって、恒常的および誘導性 NF- κ B は DHMEQ の分子標的であり、DHMEQ は単独あるいは topoisomerase 阻害剤を含む NF- κ B 誘導能のある従来の化学療法剤との併用による臨床応用が期待されることを示した。

参考文献

1. Adjei AA, Rowinsky EK. Novel anticancer agents in clinical development. *Cancer Biol Ther* 2003;2: S5-15.
2. Jonkers J, Berns A. Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* 2004;6: 535-8.
3. Capdeville R, Silberman S, Dimitrijevic S. Imatinib: the first 3 years. *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 5: S77-82.
4. Radford IR. Imatinib. Novartis. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3: 492-9.
5. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, Gu LJ, Wang ZY. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988;72: 567-72.
6. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14: 649-83.
7. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18: 6910-24.
8. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16: 225-60.
9. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109 Suppl: S81-96.
10. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25: 6680-4.
11. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 2001;107: 241-6.
12. Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1999;26: 107-14.
13. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18: 6938-47.
14. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;348: 1875-83.
15. Watanabe T. HTLV-1-associated diseases. *Int J Hematol* 1997;66: 257-78.
16. Diehl V. Chemotherapy or combined modality treatment: the optimal treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2004;22: 15-8.

17. Abbott BL. Diagnosis and management of lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006;7: 30-2.
18. Horie R, Ito K, Tatewaki M, Nagai M, Aizawa S, Higashihara M, Ishida T, Inoue J, Takizawa H, Watanabe T. A variant CD30 protein lacking extracellular and transmembrane domains is induced in HL-60 by tetradecanoylphorbol acetate and is expressed in alveolar macrophages. *Blood* 1996;88: 2422-32.
19. Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magne N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61: 7785-91.
20. Wang CY, Cusack JC, Jr., Liu R, Baldwin AS, Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999;5: 412-7.
21. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 2006;25: 6887-99.
22. Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002;1: 63-74.
23. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004;10: 299-304.
24. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3: 17-26.
25. Matsumoto N, Ariga A, To-e S, Nakamura H, Agata N, Hirano S, Inoue J, Umezawa K. Synthesis of NF-kappaB activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg Med Chem Lett* 2000;10: 865-9.
26. Matsumoto N, Iinuma H, Sawa T, Takeuchi T, Hirano S, Yoshioka T, Ishizuka M. Epoxyquinomicins A, B, C and D, new antibiotics from *Amycolatopsis*. II. Effect on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Antibiot (Tokyo)* 1997;50: 906-11.
27. Ariga A, Namekawa J, Matsumoto N, Inoue J, Umezawa K. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha -induced nuclear translocation and activation of NF-kappa B

- by dehydroxymethylepoxyquinomicin. *J Biol Chem* 2002;277: 24625-30.
28. Griffin J. The biology of signal transduction inhibition: basic science to novel therapies. *Semin Oncol* 2001;28: 3-8.
 29. Elsayed YA, Sausville EA. Selected novel anticancer treatments targeting cell signaling proteins. *Oncologist* 2001;6: 517-37.
 30. Ni H, Ergin M, Huang Q, Qin JZ, Amin HM, Martinez RL, Saeed S, Barton K, Alkan S. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol* 2001;115: 279-86.
 31. Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D, Shima Y, Chauhan D, Mitsiades C, Raje N, Richardson P, Anderson KC. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001;98: 428-35.
 32. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 2001;15: 1950-61.
 33. Kiriakidis S, Andreakos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J Cell Sci* 2003;116: 665-74.
 34. Ghobrial IM, Leleu X, Hatjiharissi E, Hideshima T, Mitsiades C, Schlossman R, Anderson KC, Richardson P. Emerging drugs in multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2007;12: 155-63.
 35. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi N, Treon SP, Anderson KC. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2002;99: 4079-86.
 36. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003;17: 2481-95.
 37. Mori N, Fujii M, Hinz M, Nakayama K, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Kashanchi F, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N. Activation of cyclin D1 and D2 promoters by human T-cell leukemia virus type I tax protein is associated with

- IL-2-independent growth of T cells. *Int J Cancer* 2002;99: 378-85.
38. Huang Y, Ohtani K, Iwanaga R, Matsumura Y, Nakamura M. Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* 2001;20: 1094-102.
 39. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999;19: 2690-8.
 40. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13: 9-22.
 41. Bureau F, Vanderplasschen A, Jaspar F, Minner F, Pastoret PP, Merville MP, Bours V, Lekeux P. Constitutive nuclear factor-kappaB activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins. *Blood* 2002;99: 3683-91.
 42. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3: 745-56.
 43. Yamaguchi K, Watanabe T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int J Hematol* 2002;76 Suppl 2: 240-5.
 44. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* 2001;97: 987-93.
 45. Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, Takatsuki K. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 1996;88: 3065-73.
 46. Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, Okayama A, Yamaguchi K, Kamihira S, Watanabe T. 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J Virol* 2002;76: 9389-97.
 47. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 1998;93: 1231-40.
 48. Sun SC, Ballard DW. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. *Oncogene* 1999;18: 6948-58.
 49. Arima N, Molitor JA, Smith MR, Kim JH, Daitoku Y, Greene WC. Human T-cell

- leukemia virus type I Tax induces expression of the Rel-related family of kappa B enhancer-binding proteins: evidence for a pretranslational component of regulation. *J Virol* 1991;65: 6892-9.
50. Hironaka N, Mochida K, Mori N, Maeda M, Yamamoto N, Yamaoka S. Tax-independent constitutive IkappaB kinase activation in adult T-cell leukemia cells. *Neoplasia* 2004;6: 266-78.
 51. Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, Yamamoto N. Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1999;93: 2360-8.
 52. Yamada Y, Tomonaga M, Fukuda H, Hanada S, Utsunomiya A, Tara M, Sano M, Ikeda S, Takatsuki K, Kozuru M, Araki K, Kawano F, Niimi M, Tobinai K, Hotta T, Shimoyama M. A new G-CSF-supported combination chemotherapy, LSG15, for adult T-cell leukaemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study 9303. *Br J Haematol* 2001;113: 375-82.
 53. Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Okamoto T. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Leukemia* 2006;20: 590-8.
 54. Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga JI, Toyokuni S, Matsuoka M. Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia* 2004;18: 1357-63.
 55. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 2002;100: 1828-34.
 56. Tanaka G, Okayama A, Watanabe T, Aizawa S, Stuver S, Mueller N, Hsieh CC, Tsubouchi H. The clonal expansion of human T lymphotropic virus type 1-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J Infect Dis* 2005;191: 1140-7.
 57. Furukawa Y, Fujisawa J, Osame M, Toita M, Sonoda S, Kubota R, Ijichi S, Yoshida M. Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells in HTLV-1-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood* 1992;80: 1012-6.
 58. Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human

- T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 1995;69: 2863-8.
59. Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S, Kadin ME. Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 2002;21: 2493-503.
 60. Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 1997;272: 21096-103.
 61. Mitra-Kaushik S, Harding JC, Hess JL, Ratner L. Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on tumor growth in HTLV-1 Tax transgenic mice and Tax tumor transplants. *Blood* 2004;104: 802-9.
 62. Tan C, Waldmann TA. Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 2002;62: 1083-6.
 63. Hanon E, Stinchcombe JC, Saito M, Asquith BE, Taylor GP, Tanaka Y, Weber JN, Griffiths GM, Bangham CR. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* 2000;13: 657-64.
 64. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, Kantarjian H. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998;92: 1165-71.
 65. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2000;164: 2200-6.
 66. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999;19: 5785-99.
 67. Kelley TW, Alkan S, Srkalovic G, Hsi ED. Treatment of human chronic lymphocytic leukemia cells with the proteasome inhibitor bortezomib promotes apoptosis. *Leuk Res* 2004;28: 845-50.
 68. Pahler JC, Ruiz S, Niemer I, Calvert LR, Andreeff M, Keating M, Faderl S, McConkey DJ. Effects of the proteasome inhibitor, bortezomib, on apoptosis in

- isolated lymphocytes obtained from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2003;9: 4570-7.
69. Romano MF, Lamberti A, Tassone P, Alfinito F, Costantini S, Chiurazzi F, Defrance T, Bonelli P, Tuccillo F, Turco MC, Venuta S. Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998;92: 990-5.
 70. Morales AA, Olsson A, Celsing F, Osterborg A, Jondal M, Osorio LM. High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 2005;113: 730-7.
 71. Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas JA, Sanchez A, Martin-Saavedra FM, Ballester S, Garcia-Marco J, Jorda J, Durantez A. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004;18: 1391-400.
 72. Tallman MS, Hakimian D. Purine nucleoside analogs: emerging roles in indolent lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995;86: 2463-74.
 73. Huang P, Sandoval A, Van Den Neste E, Keating MJ, Plunkett W. Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia* 2000;14: 1405-13.
 74. Gruss HJ, Herrmann F, Drexler HG. Hodgkin's disease: a cytokine-producing tumor--a review. *Crit Rev Oncog* 1994;5: 473-538.
 75. Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 2002;84: 277-312.
 76. Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1998;9 Suppl 5: S17-20.
 77. Bargou RC, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, Royer HD, Scheidereit C, Dorken B. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 1996;87: 4340-7.
 78. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997;100: 2961-9.
 79. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.

- Oncogene 1999;18: 6853-66.
80. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha. *Oncogene* 1999;18: 3063-70.
 81. Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dorken B, Scheidereit C. Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 1999;18: 943-53.
 82. Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Brauninger A, Spieker T, Wolf J, Diehl V, Hansmann ML, Rajewsky K, Kuppers R. Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* 2000;191: 395-402.
 83. Emmerich F, Meiser M, Hummel M, Demel G, Foss HD, Jundt F, Mathas S, Krappmann D, Scheidereit C, Stein H, Dorken B. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 1999;94: 3129-34.
 84. Wood KM, Roff M, Hay RT. Defective IkappaBalpha in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-kappaB. *Oncogene* 1998;16: 2131-9.
 85. Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470: M55-62.
 86. Cusack JC, Jr., Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, Baldwin AS, Jr. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 2001;61: 3535-40.
 87. Cheng JD, Ryseck RP, Attar RM, Dambach D, Bravo R. Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta. *J Exp Med* 1998;188: 1055-62.
 88. Huang TT, Miyamoto S. Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 2001;21: 4737-47.
 89. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, Jundt F, Hirsch B, Johrens-Leder K, Vornlocher HP, Bommert K, Stein H, Dorken B. c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced

- apoptosis. *J Exp Med* 2004;199: 1041-52.
90. Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, Schultze JL, Draube A, Vockerodt M, Re D, Diehl V, Wolf J. Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 2002;160: 1521-8.
 91. Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, Reynolds GM, Starczynski J, Crocker J, Young LS, Murray PG. Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 6611-6.
 92. Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 2004;44: 257-67.
 93. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53: 153-9.
 94. Basu S, Rosenzweig KR, Youmell M, Price BD. The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247: 79-83.
 95. Piret B, Schoonbroodt S, Piette J. The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage. *Oncogene* 1999;18: 2261-71.
 96. Zheng B, Georgakis GV, Li Y, Bharti A, McConkey D, Aggarwal BB, Younes A. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3207-15.
 97. Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheidereit C, Bommert K, Dorken B. Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 2003;102: 1028-34.
 98. Izban KF, Ergin M, Huang Q, Qin JZ, Martinez RL, Schnitzer B, Ni H, Nickoloff BJ, Alkan S. Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol* 2001;14: 297-310.

謝 辞

本研究を進めるにあたり御指導ならびに御高配を賜りました慶應義塾大学理工学部教授 梅澤一夫博士に謹んで感謝の意を表します。

さらに御指導を賜りました慶應義塾大学理工学部教授 西山繁博士、同教授 佐藤智典博士ならびに慶應義塾大学医学部教授 池田康夫博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を行なうにあたり直接御指導、御鞭撻頂きました北里大学医学部血液内科准教授 堀江良一博士に心より深く感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたりこのような機会を与えて下さり、御協力を賜りました北里大学医学部血液内科教授 東原正明博士に厚く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、絶大なる御指導、御協力を賜りました東京大学大学院新領域教授 渡辺俊樹博士、石田尚臣博士、正田桃子氏、ならびに東京大学医科学研究所 相澤繁美博士に心から感謝の意を表します。

また、実験動物を使った *in vivo* モデルの実験で御協力頂きました東京医科歯科大学大学院客員教授、国立感染症研究所エイズ研究センター長 山本直樹博士、同研究員 Md. Zahidunnabi Dewan 博士、ならびに熊本大学生命資源研究センター准教授 大杉剛生博士に厚く感謝の意を表します。

免疫組織化学的研究で御協力を賜りました東邦大学医学部病理学教室准教授 伊藤金次博士に厚く感謝の意を表します。

臨床サンプルの供与に御協力頂きました今村病院 宇都宮與博士ならびに東京女子医大病院血液内科 岡村隆光博士に厚く感謝の意を表しますと同時に、ボランティアとして御協力下さった全ての方々に心から感謝致します。

FACS 解析の御指導ならびに御協力を頂きました北里大学医学部血液内科技術員 平美也子氏に厚く感謝の意を表します。

そして、実験施設を提供していただきました北里大学医学部細胞生物学研究室、バイオイメージングセンター RI 部門ならびに DNA 実験センターの皆様心から感謝致します。

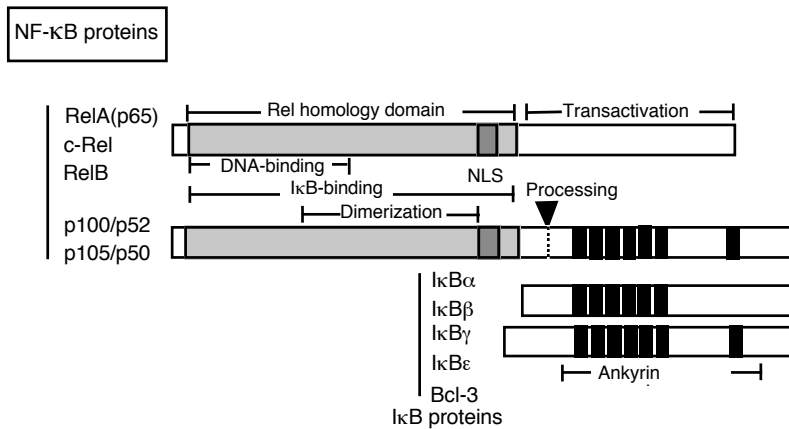


Figure 1. Structure of Rel/NF-κB and the IκB family.

The NF-κB family consists of five cellular proteins: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF-κB1 (p50 and its precursor p105), and NF-κB2 (p52 and its precursor p100). NF-κB1 and NF-κB2 are translated as precursor proteins, p105 and p100, which upon proteasome-mediated processing generate the mature NF-κB subunits, p50 and p52 respectively. The NF-κB forms homo- or heterodimers and exists as an inactive complex with IκB regulatory proteins in the cytoplasm. The NF-κB precursor proteins, p105 and p100, contain IκB domain in the C-terminus and the processing of these precursors serves to generate mature NF-κB subunits and disrupts their IκB-like function. The NF-κB proteins show homologies in an approximately 300 amino acid domain called the Rel homology domain (RHD), which is responsible for dimerization, DNA binding, binding with IκB, and nuclear translocations. The IκB protein consists of IκBα, IκBβ and related proteins p105 and p100. These proteins contain six or seven ankyrin repeats and these stacked helical domains bind to RHD and mask the nuclear localization signal of NF-κB.

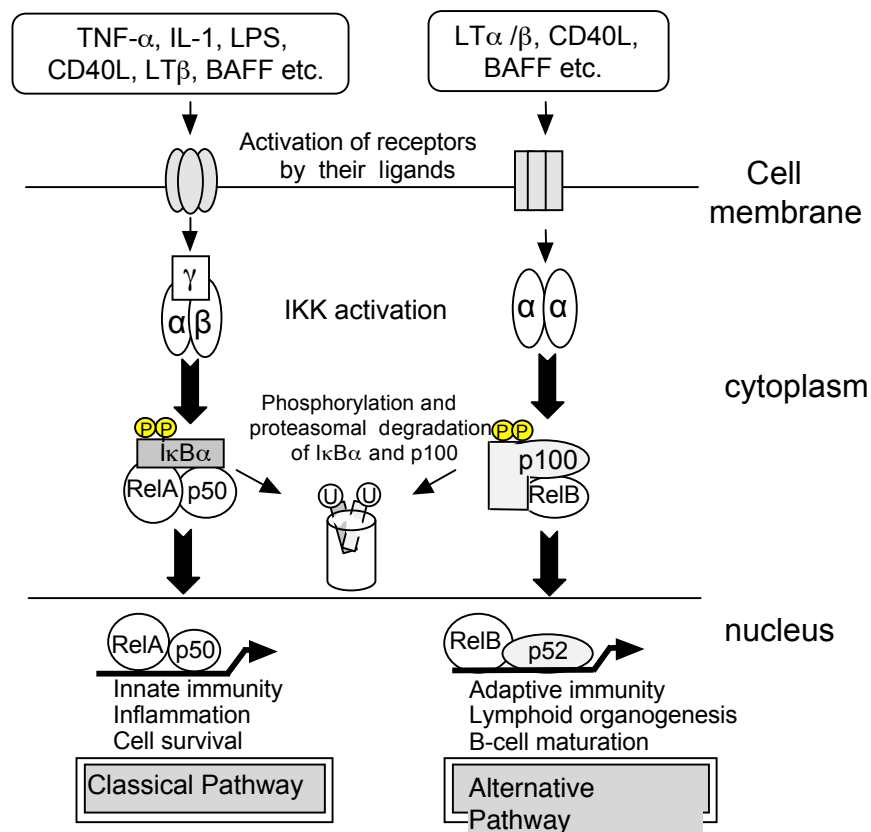


Figure 2. General mechanisms of NF-κB activation

Various stimuli such as viral infection, cytokines, phorbol ester, and antigens converge into NF-κB activation; however, the most common proximal step is the phosphorylation of IκB by a large IκB kinase (IKK) complex, which targets two NF-κB pathways: the classical and alternative pathways. The classical pathway of NF-κB activation is induced by diverse stimuli and mediated by IKK complex consisting of IKKα, IKKβ and IKKγ, which releases RelA/p50 after subsequent degradation of IκBα by phosphorylation. Activation of this pathway represents cell survival, inflammation and innate immunity. The alternative pathway of NF-κB activation is induced by some of TNF family members and mediated by IKK complex consisting of IKKα, which activates p52/RelB by degradation of C-terminus of p100 after phosphorylation. Activation of this pathway plays a particular roles in regulation of B-cell maturation and lymphoid organogenesis. NF-κB exhibits binding affinities to the consensus sequence GGGRNYYCC (where R is purine, Y is pyrimidine, and N is any base) called the κB site that exists in the promoter enhancer regions of target genes. In the classical pathway, IκBα newly synthesized by NF-κB enters the nucleus and dissociates p50/RelA from the target genes, transporting NF-κB to the cytoplasm.

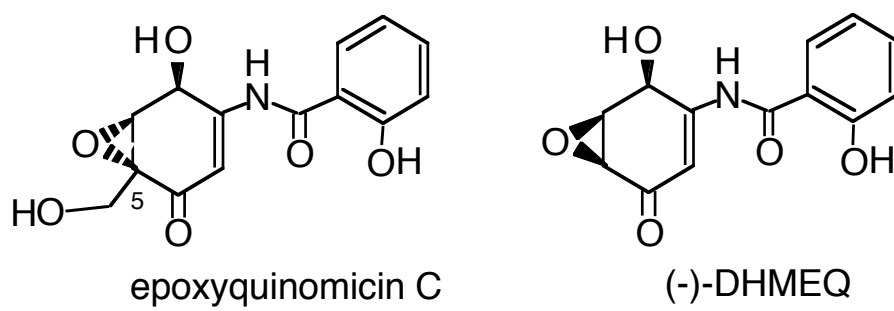


Figure 3. Structure of DHMEQ

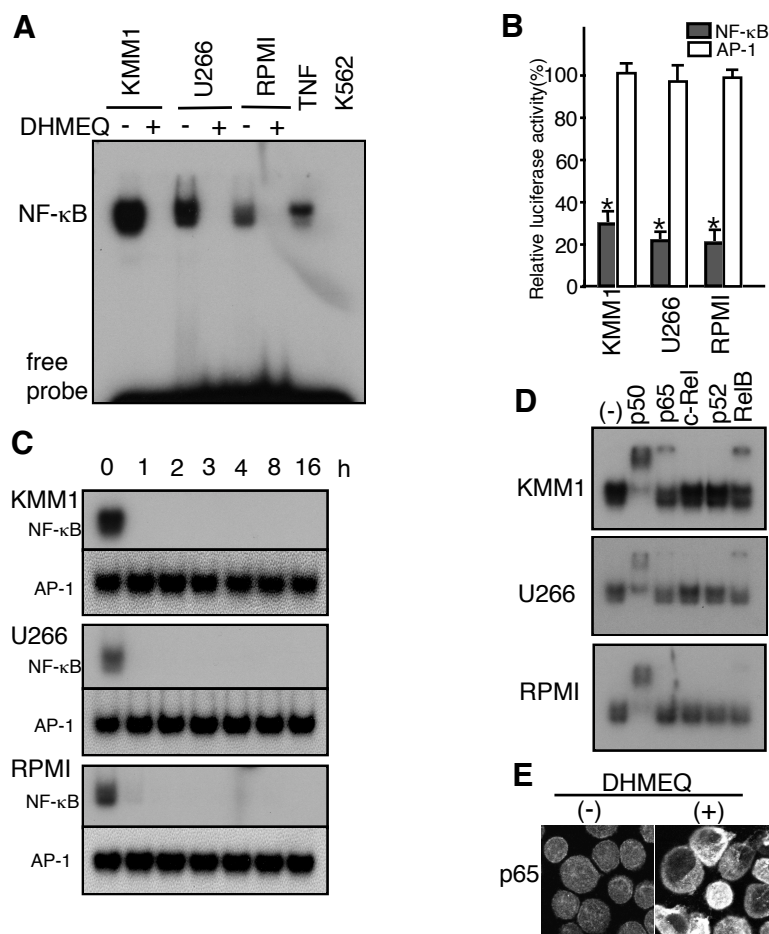


Figure 4. Inhibition of constitutive NF- κ B activity in MM cell lines by DHMEQ.

(A) Inhibition of constitutive NF- κ B binding activity in MM-derived cell lines. MM-derived cell lines, KMM1, U266 and RPMI8226, were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. Nuclear extracts were examined for NF- κ B binding activity by EMSA with a radio-labeled NF- κ B specific probe. Nuclear extracts of Jurkat cells treated with TNF- α and those of K562 cells were used as controls. The position of shifted bands corresponding to NF- κ B and free probes are indicated on the left. RPMI, RPMI8226.

(B) Inhibition of the NF- κ B-driven promoter activities in MM-derived cell lines by DHMEQ. A luciferase reporter construct with a NF- κ B-driven promoter (p[kB]6 -Luc) or (p[AP-1]7-Luc) was transiently transfected into KMM1, U266 and RPMI8226 cells for 3 hours followed by DHMEQ treatment (10 μ g/ml) for 16 hours. Luciferase activities are expressed as percentages of those in untreated cells. *, more significant than controls. (P<0.01)

(C) Time course studies of NF- κ B inhibition by DHMEQ. KMM1, U266 and RPMI8226 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated periods. EMSA of the same kinetics was done with NF- κ B probe as well as AP-1 probe.

(D) NF- κ B subcomponent analysis. Subcomponents of NF- κ B constitutively activated in MM cell lines were determined by supershift analysis. Antibodies used are indicated on the top.

(E) Inhibition of nuclear localization of activated p65 by DHMEQ. KMM1 cells were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. Confocal immunofluorescence microscopic analysis was done with cytospin samples stained with a specific antibody against activated p65 NF- κ B.

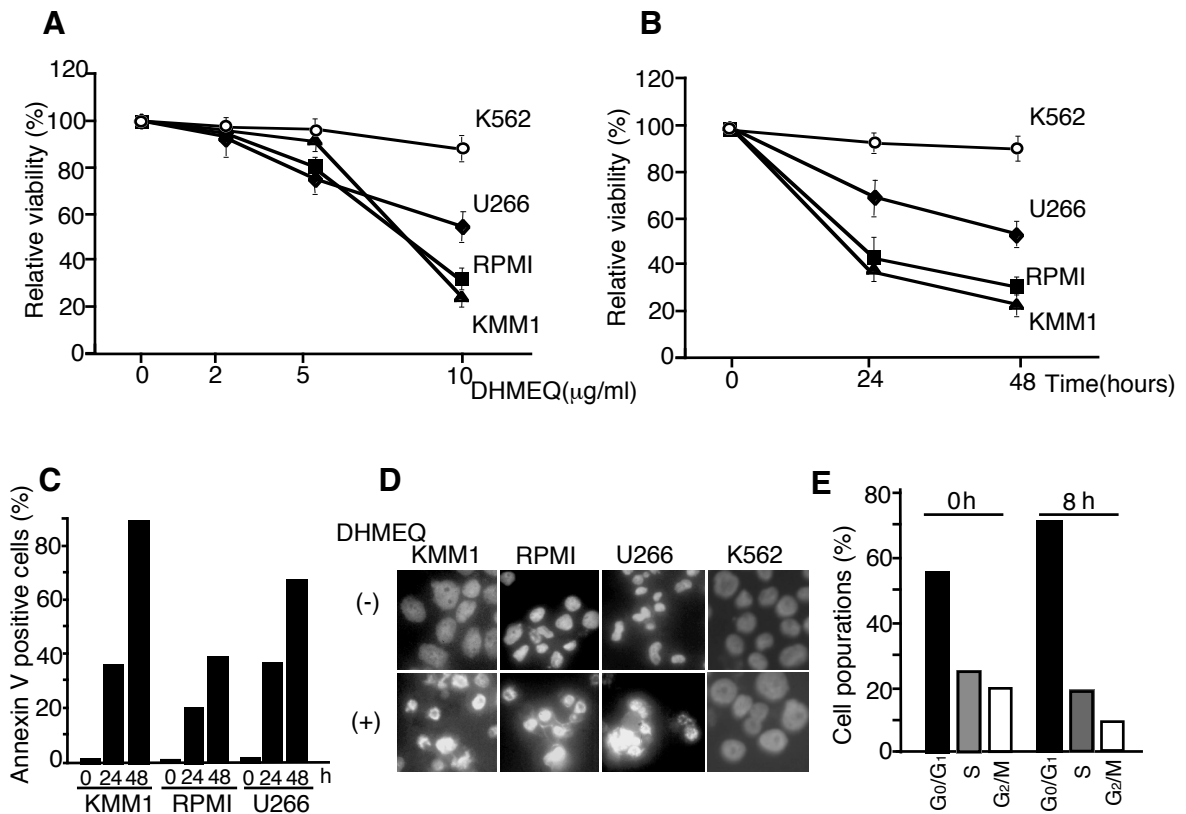


Figure 5. DHMEQ induces apoptosis of MM cell lines.

(A) Dose dependent reduction of cell viabilities of MM cell lines treated with DHMEQ. MM cell lines KMM1, U266 and RPMI8226 as well as unrelated cell line K562 were treated with indicated concentrations of DHMEQ for 48 hours. Cell viabilities were determined by MTT assay. Data represent the mean \pm SD of relative viabilities of three independent experiments. (B) Time course analyses of cell viabilities of MM cell lines treated with DHMEQ. MM cell lines and K562 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated periods. Cell viabilities were determined by MTT assay. Data represent the mean \pm SD of relative viabilities of three independent experiments.

(C) Flow cytometric analysis of Annexin V reactive cells. Cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated periods. After labeling with FITC-conjugated Annexin V, cells were analyzed by flow cytometry. Representative results of three independent experiments are shown.

(D) Nuclear fragmentation of cells treated with DHMEQ. Cells were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 48 hours and stained with 10 μ M Hoechst 33342.

(E) Effects of DHMEQ on cell cycle profiles. KMM1 cells were cultured for indicated times in the presence of DHMEQ (10 μ g/ml). Before analysis by flow cytometry, cells were fixed with cold 70% ethanol overnight and then treated with RNase and propidium iodide (50 μ g/ml). The graph shows the percentages of cells in G₀/G₁, S and G₂/M phases of the cell cycle.

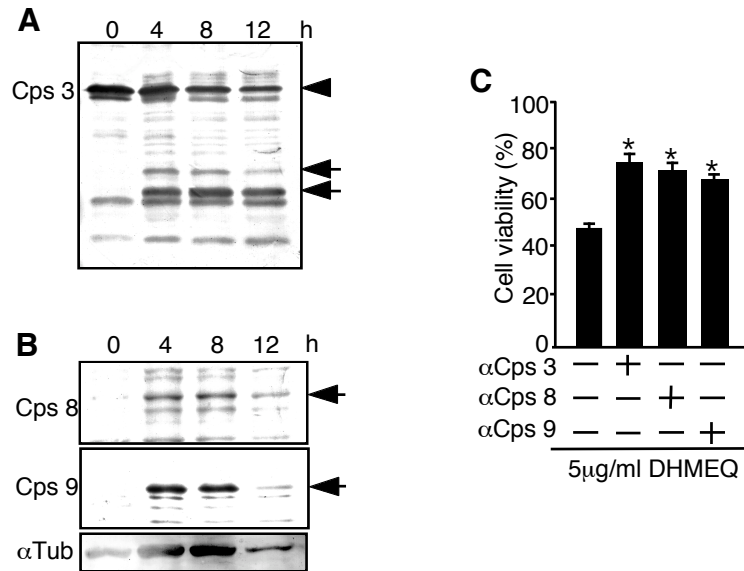


Figure 6. DHMEQ-induced apoptosis involves activation of caspase 3, 8 and 9.

(A) Immunoblot analysis of caspase 3. KMM1 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated time. Samples of 30 μ g of whole cell lysates were examined. Positions of uncleaved (arrow head) and cleaved form (arrows) of caspase 3 were indicated on the right. Casp 3, anti-Caspase 3 antibody.

(B) Immunoblot analysis of caspase 8 and caspase 9. KMM1 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated time. Samples of 30 μ g of whole cell lysates were examined by immunoblot. Positions of cleaved form (arrow) of caspase 8 (upper panel) and caspase 9 (middle panel) were indicated on the right. Immunoblot of α tubulin served as a control (lower panel). Casp 8, anti-Caspase 8 antibody; Casp 9, anti-Caspase 9 antibody; α Tub, α Tubulin antibody.

(C) Inhibition of DHMEQ-induced apoptosis by blockade of caspase 3, caspase 8 and caspase 9 activities. Prior to incubation with 5 μ g/ml of DHMEQ, KMM1 cells were treated for 1 hour with 20 μ M of caspase 3 inhibitor z-DEVD-FMK (α Cps 3), caspase 8 inhibitor z-IETD-FMK (α Cps 8) or caspase 9 inhibitor z-LEHD-FMK (α Cps 9). After 18 hours of DHMEQ treatment, cell viability was examined by MTT assay. *, more significant than controls. (P<0.01)

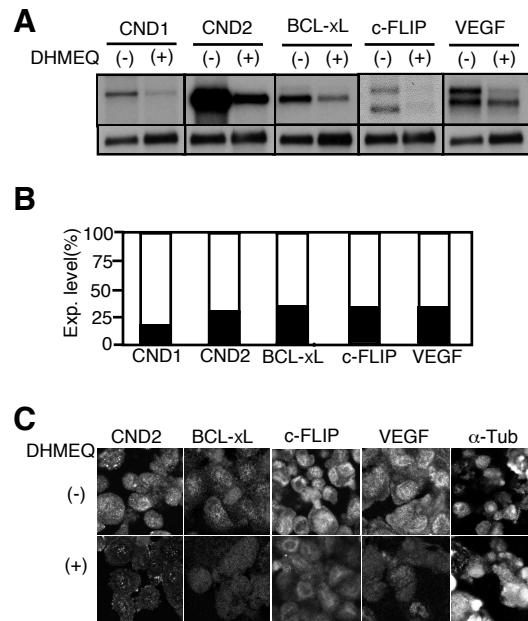


Figure 7. Effect of DHMEQ on genes and proteins regulating cell cycle progression, anti-apoptosis and angiogenesis.

(A) The expression of mRNA involved in cell cycle regulation and anti-apoptosis. MM derived cell line RPMI8226 was treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. The expression of mRNA involved in cell cycle regulation (cyclin D1 and cyclin D2), anti-apoptosis (Bcl-xL and c-FLIP) and angiogenesis (VEGF) were examined by northern blot analysis as described, using PT-PCR amplified fragments as probes. Expression of GAPDH mRNA served as a control (lower panel). CND1, cyclin D1; CND2, cyclin D2.

(B) Quantification of relative expression levels. GAPDH signals were measured by densitometry and the values were used to normalize the levels of densitometric quantification of cyclin D1, cyclin D2, Bcl-xL and c-FLIP mRNA expression in RPMI8226 cells. The relative expression levels of treated samples are expressed as percentages of those of untreated ones.

(C) Expression of the proteins involved in cell cycle regulation and anti-apoptosis. MM derived cell line RPMI8226 was treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. Cells were spun by centrifugation onto glass coverslips and stained with antibodies specific for cyclin D2, c-FLIP and Bcl-xL and observed with fluorescence confocal microscopy. Expression of α -tubulin served as a control. α -Tub, α -tubulin antibody.

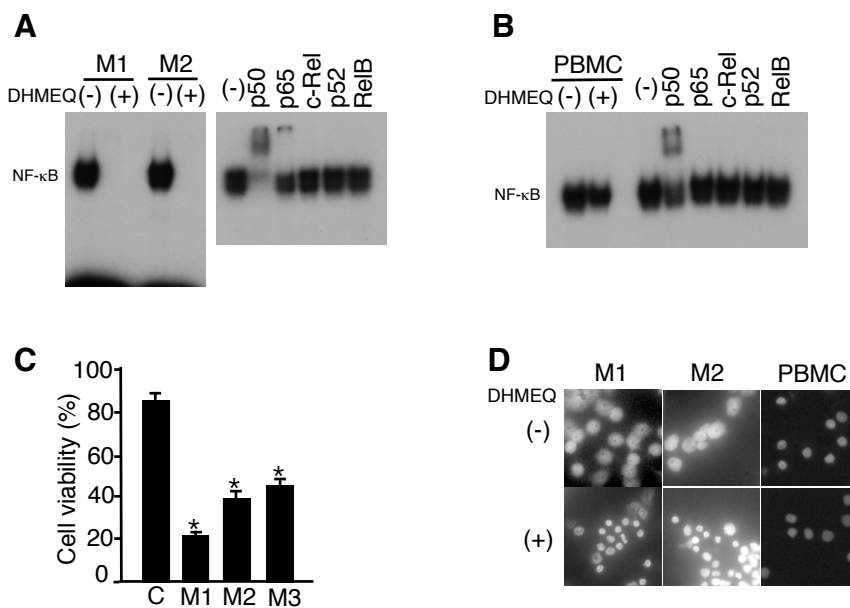


Figure 8. Inhibition of constitutive NF-κB binding activity by DHMEQ in primary MM cells.

(A) Primary MM cells were treated with or without 10 μg/ml of DHMEQ for 16 hours. Nuclear extracts were examined by EMSA using a radio-labeled NF-κB specific probe. Positions of shifted bands were indicated on the left. (left panel) Nuclear extracts from untreated primary MM cells were subjected to supershift analysis with antibodies specific for p50, p65, p52, c-Rel, and RelB. Antibodies used are indicated on the top. (right panel).

(B) Subcomponents of NF-κB constitutively activated in PBMCs with or without DHMEQ treatment were determined by supershift analysis. PBMCs were treated with or without 10 μg/ml of DHMEQ for 16 hours. Nuclear extracts were examined for NF-κB binding activity by EMSA with a radiolabeled NF-κB specific probe. Nuclear extracts of untreated PBMCs were subjected to supershift analysis with antibodies specific for p50, p65, p52, c-Rel, and RelB. Antibodies used are indicated on the top.

(C) DHMEQ reduces cell viability of primary MM cells. Primary MM cells and PBMCs were treated with 10 μg/ml of DHMEQ for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay. The relative viabilities of treated samples are expressed as percentages of those of untreated ones. Data represent the mean ± SD percentage of relative viability of 3 independent experiments. *, more significant than controls. (P<0.01)

(D) Nuclear fragmentation induced by treatment with DHMEQ in primary MM cells. Primary MM cells and PBMCs were treated with 10 μg/ml of DHMEQ for 24 hours and subjected to the staining with Hoechst 33342.

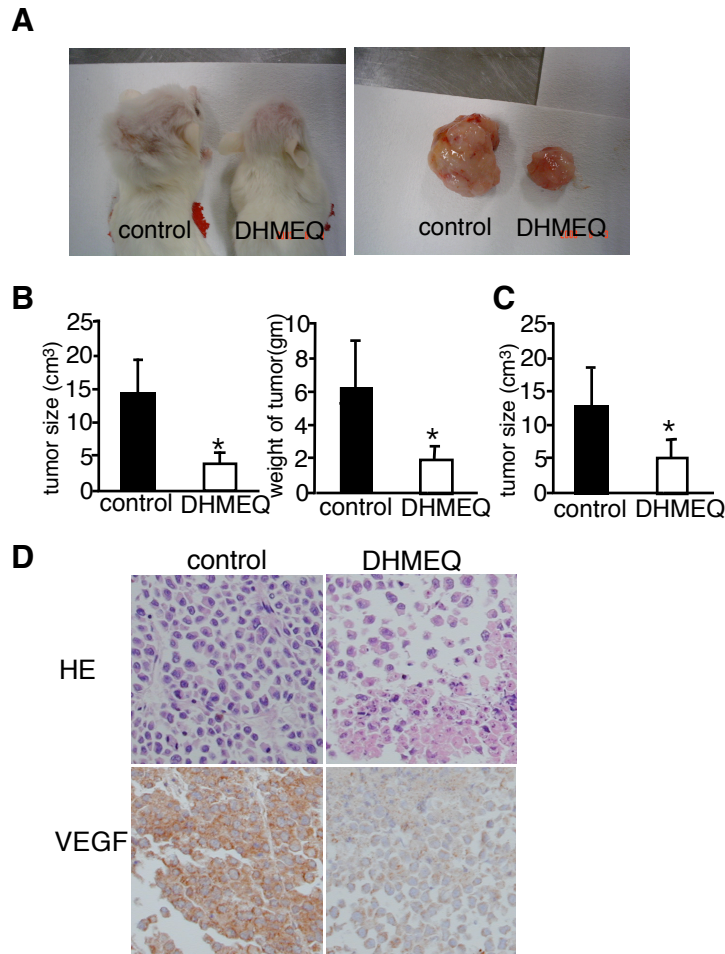


Figure 9. Effect of DHMEQ on MM cells inoculated in NOG mice. 1×10^7 KMM1 cells were inoculated in the post-auricular region of NOG mice. For the treatment group, 12 mg/kg of DHMEQ was administered intra-peritoneally three times a week for 1 month, beginning on either day 0 or day 5 when tumors were palpable. The control mice received RPMI 1640 ($200 \mu\text{l}$) simultaneously.

(A) Gross appearance of the mice with (right) or without (left) DHMEQ treatment. Macroscopic images of the subcutaneously formed tumors resected from mice with (right) or without (left) DHMEQ treatment.

(B) Size and weight of the resected tumors were measured and represented as bar graphs. Data represent the mean \pm SD from 6 mice.

(C) Effect of DHMEQ on established tumors. Size of tumors was measured and represented as bar graphs. Data represent the mean \pm SD from 4 mice.

(D) Growth inhibitory effect of DHMEQ on MM cells is accompanied by apoptosis, reduction of vascular formation and VEGF production. Microscopic images of HE stained tumor tissues of the mice with or without DHMEQ treatment (right and left, respectively) revealed apoptotic cells and decreased vascular formation in DHMEQ treated mice (upper panel). VEGF production of the tumor of mice with (right) or without (left) DHMEQ treatment was examined using antibodies that react with human VEGF (lower panel). *, more significant than controls. ($P < 0.01$)

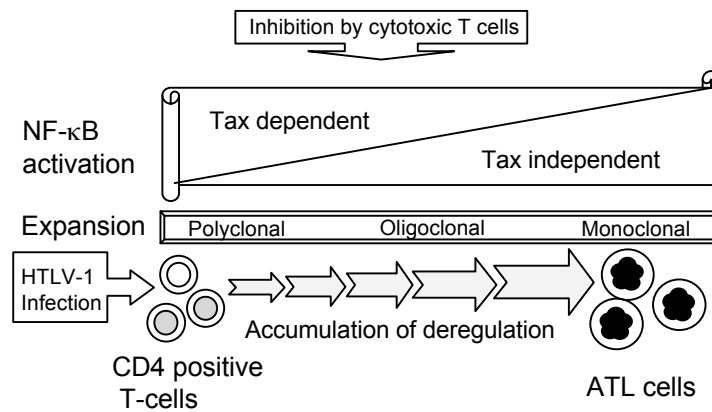


Figure 10. Schematic representative of the natural course from HTLV-1 infection to the onset of HTLV-1 associated disease and ATL.

After infection to CD4⁺ T cells, HTLV-1 utilizes several regulatory proteins encoded by virus gene for viral infectivity and proliferation of infected cells. Among them, tax plays a key role in the proliferation of infected cells and their transformation. Tax becomes the target of the host immune system. In the process of expansion and suppression of HTLV-1 infected cells, outgrowth of ATL cells, which lost Tax expression and acquired tax-independent growth occurs.

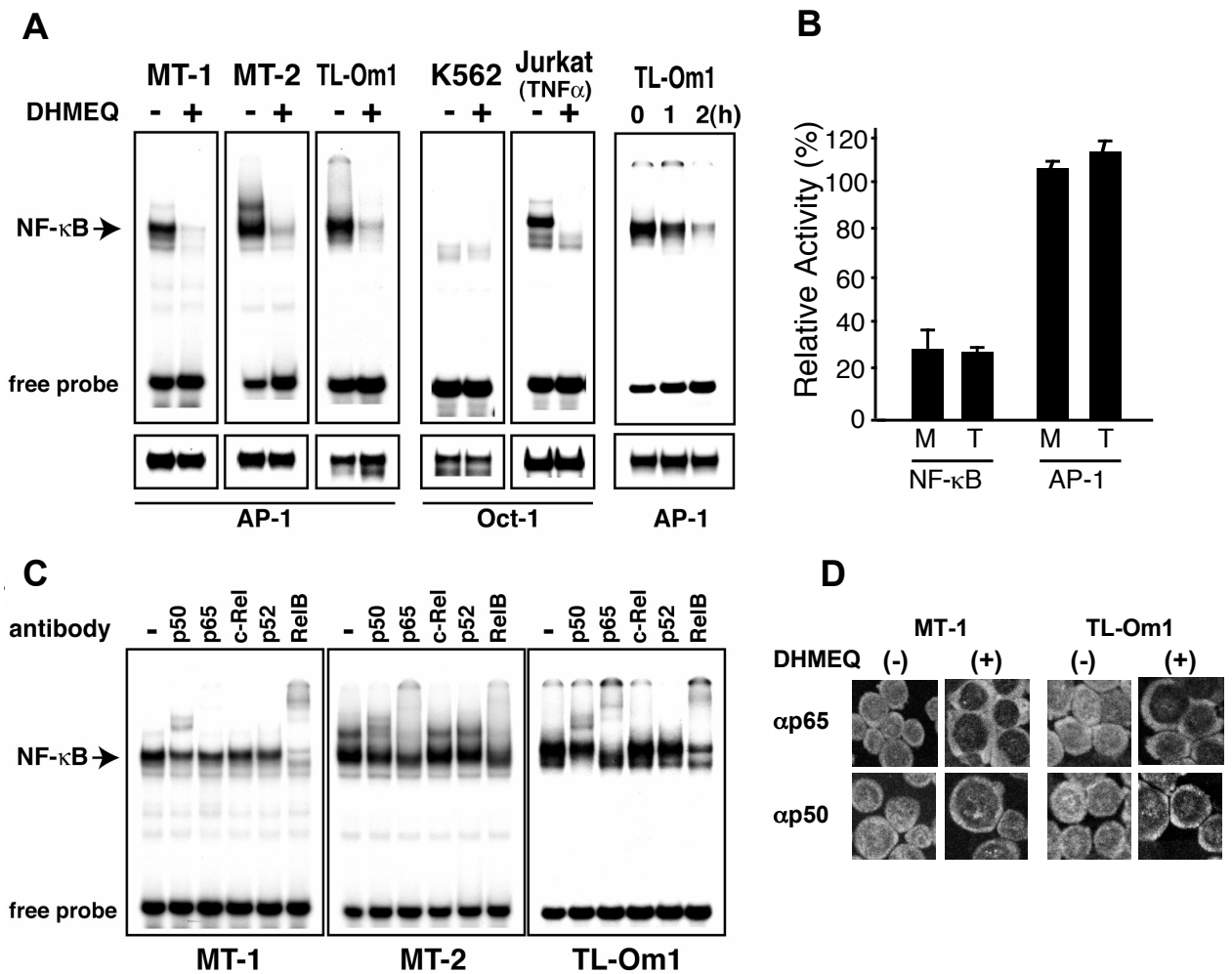


Figure 11. DHMEQ inhibits constitutive NF- κ B activity in HTLV-1-transformed and ATL-derived cell lines

(A) Electrophoretic mobility shift analysis (EMSA) of NF- κ B. Inhibition of constitutive NF- κ B binding activity by DHMEQ in HTLV-1-transformed and ATL-derived cell lines (left three panel). A myeloid leukemia cell line K562 without HTLV-1-infection was used as a control. Cells were cultured with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. Nuclear extracts from Jurkat cells treated with TNF- α served as a control. Upper panels show inhibition of NF- κ B binding activity by DHMEQ. Lower panels show results of EMSA with control probes, AP-1 and OCT1. OCT1 probe was used for HTLV-1-uninfected cells that do not show constitutive activation of AP-1.

(B) Inhibition of NF- κ B transcription activities in ATL-derived cell lines by DHMEQ. Relative levels of luciferase activities are shown in percentages compared with the levels of untreated cells. M, MT-1 cells; T, TL-Om1 cells; NF- κ B, NF- κ B-driven luciferase construct; AP-1, AP-1-derived luciferase construct. Renilla luciferase vector (pRL-TK) was used to standardize the transfection efficiency.

(C) Supershift analysis of the NF- κ B components in HTLV-1-transformed and ATL-derived cell lines. Antibodies used were indicated on the top. The position of shifted band corresponding to NF- κ B is indicated on the left.

(D) Inhibition of nuclear translocation of NF- κ B by DHMEQ. Representative results of confocal immunofluorescence analysis using antibodies against NF- κ B p65 or NF- κ B p50.

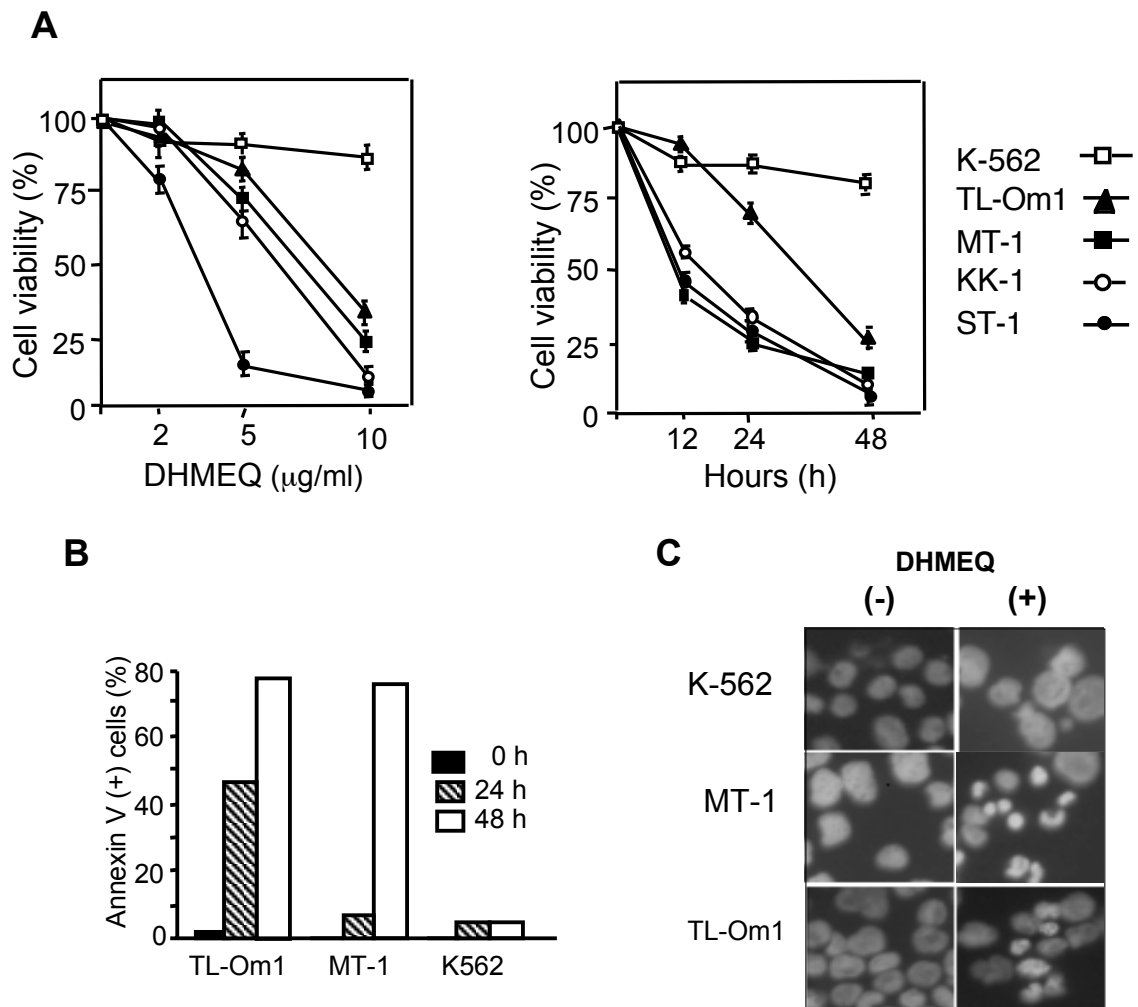


Figure 12. DHMEQ induces apoptosis in ATL derived cell lines.

(A) Results of dose-response and time course experiments. Relative levels of cell viability of DHMEQ-treated ATL-derived cell lines compared with those treated by DMSO. Mean and SD of triplicated experiments are presented. TL-Om1, MT-1, KK-1 and ST-1, ATL-derived cell lines; K562, an uninfected cell line used as a control.

(B) Induction of apoptosis by DHMEQ. Cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ DHMEQ for indicated periods and binding of FITC-conjugated Annexin V was analyzed by flow cytometry. Representative results of three independent experiments are shown.

(C) Hoechst 33342 staining of the cells. Cells were treated by DHMEQ (10 $\mu\text{g/ml}$) or DMSO (0.1%) for 24 hours, and stained by Hoechst 33342.

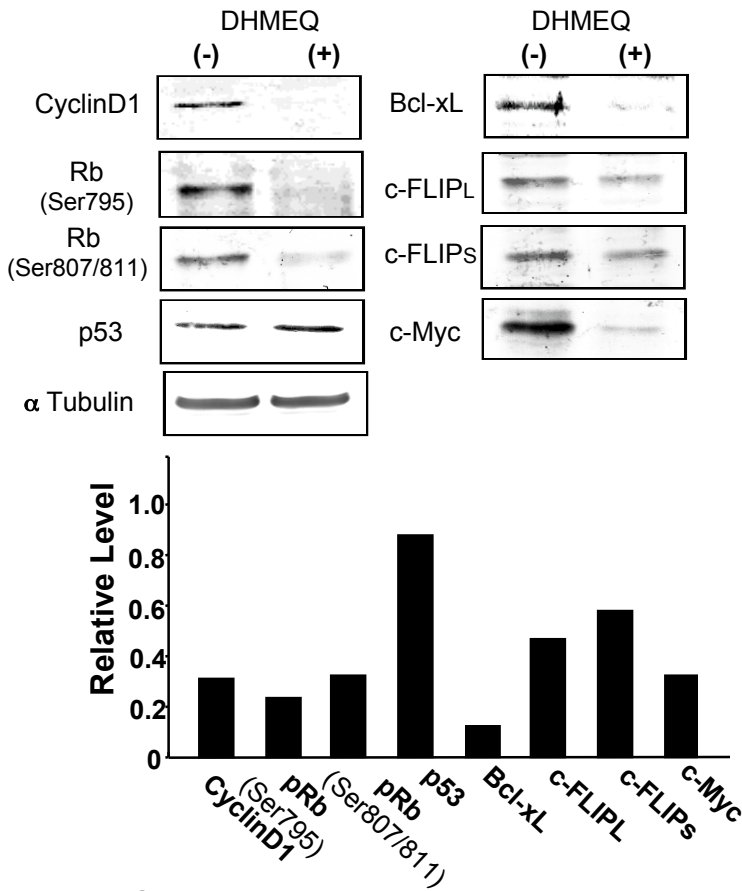
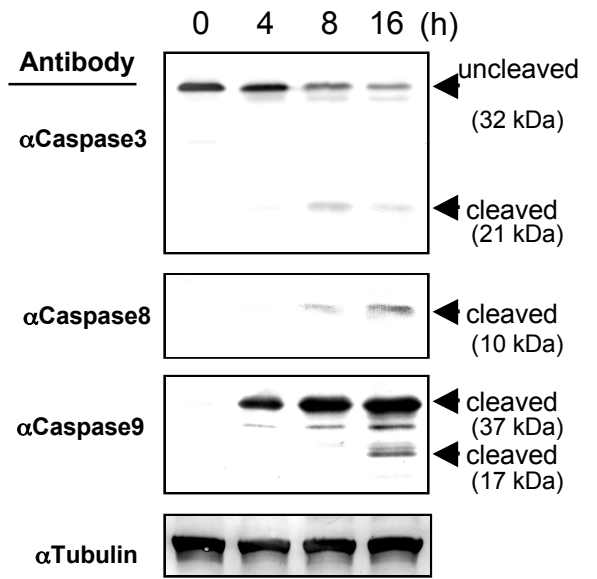
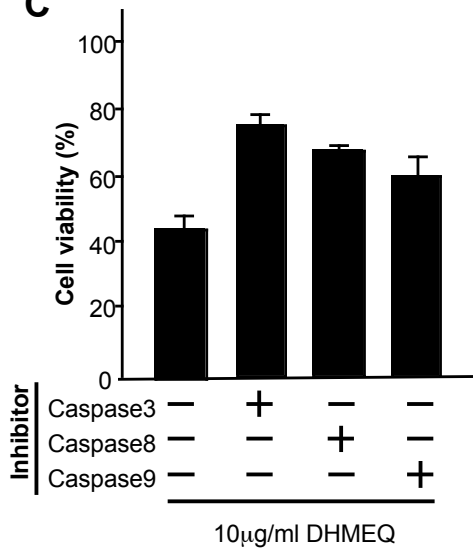
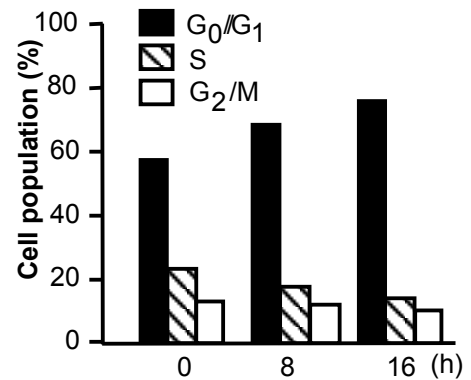
A**B****C****D**

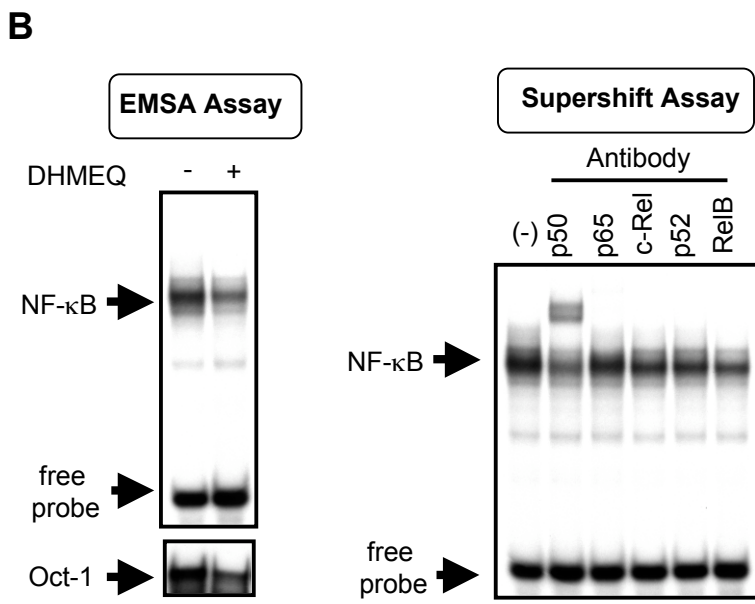
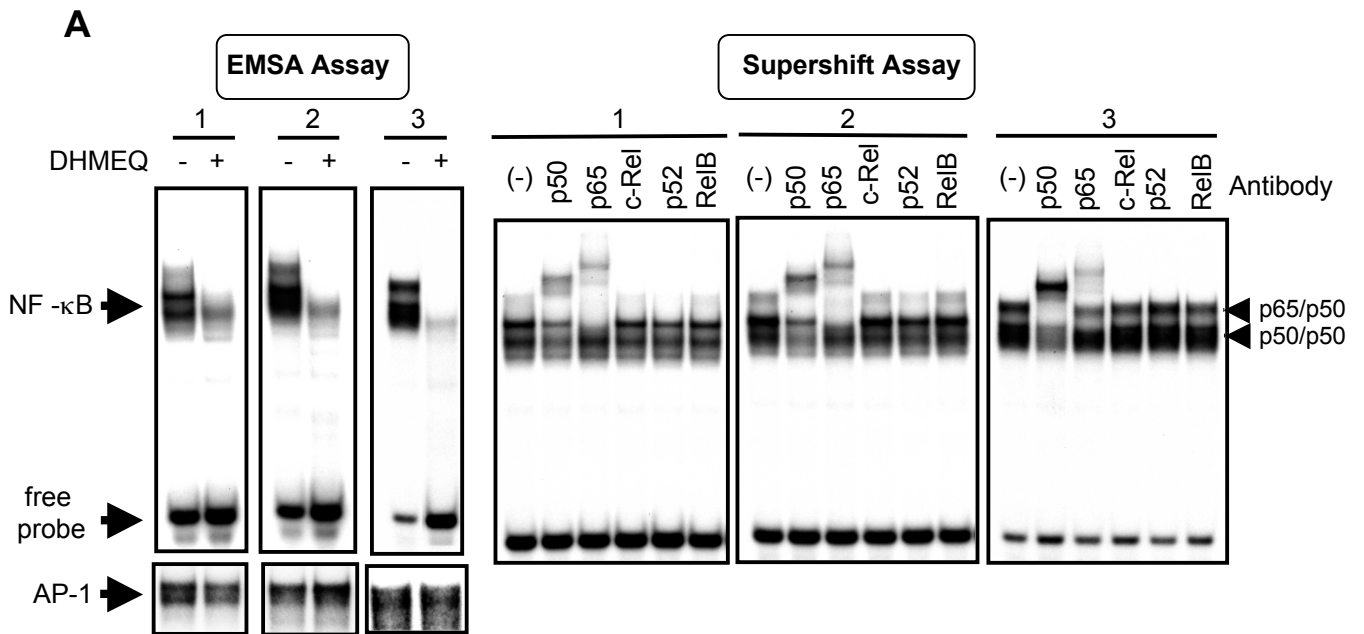
Figure 13. Expression of genes involved in cell cycle progression and anti-apoptosis after DHMEQ treatment.

(A) Immunoblot analysis of DHMEQ-treated MT-1 cells. Cells were treated by with 10 μ g/ml DHMEQ for 16 hours. Total cell lysates were subjected to the analysis. Antibodies used for detection are presented on the left. Levels of tubulin expression are used to confirm equal amounts of total cell lysates in each lane. Lower panel, results of densitometric analysis of detected bands. Results are expressed as relative levels compared with those of untreated samples. Tubulin bands were used to normalize densitometric measurement.

(B) Activation of caspases. Cleavage of caspase-3, -8 and -9 was examined by immunoblot analysis. Samples were prepared at the indicated time points after DHMEQ treatment. Arrows indicate the position of cleaved or uncleaved fragments.

(C) Inhibition of apoptosis pathways. Effects of caspase inhibitors on DHMEQ-induced apoptosis were studied using specific inhibitors for caspase-3 (Z-DEVD-FMK) and caspase-8 (Z-IETD-FMK) as well as caspase 9 inhibitor (z-LEHD-FMK). Inhibitors were added to the culture media 1 hour prior to DHMEQ addition. Left panel, cell viabilities after DHMEQ treatment in the presence of specific caspase inhibitors.

(D) Effects of DHMEQ on cell cycle progression. MT-1 cells were treated with DHMEQ (10 μ g/ml) for indicated periods followed by PI staining and subjected to cell cycle analysis by flow cytometry.



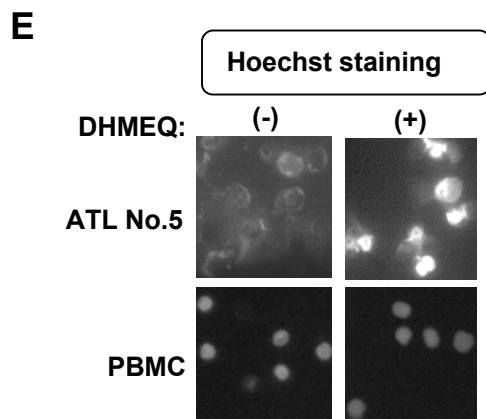
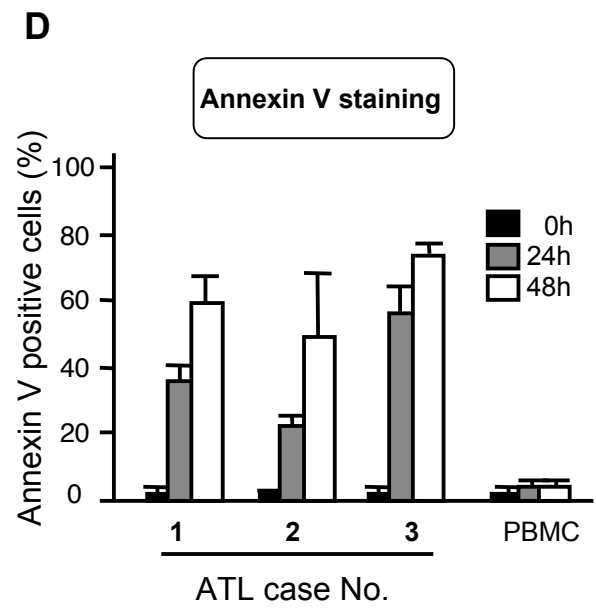
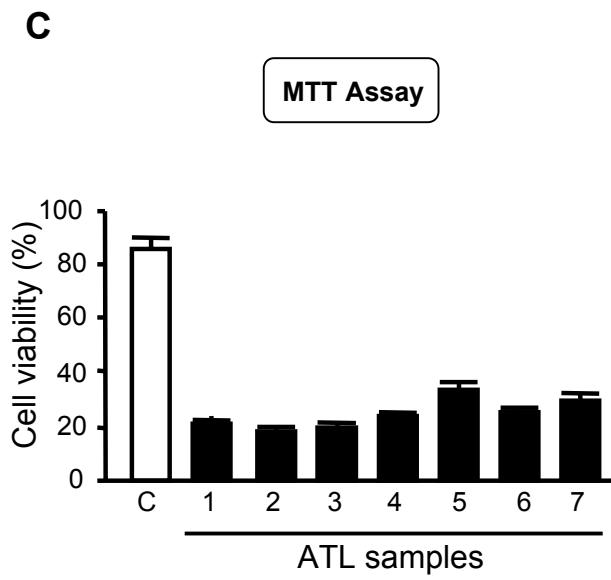


Figure 14. DHMEQ inhibits constitutive NF- κ B activity and induces apoptosis of primary ATL cells.

(A) EMSA and supershift analyses. Left three panels, inhibition of constitutively activated NF- κ B in three samples of primary ATL cells by DHMEQ (upper panels). Cells were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. Positions of shifted bands and free probes were indicated on the left. Results of EMSA with AP-1 probe are shown in the lower panels. Right three panels, supershift analysis of NF- κ B components in three samples of primary ATL cells. Nuclear extract of ATL samples were subjected to supershift analysis with antibodies specific for p50, p65, c-Rel, p52 and RelB.

(B) EMSA of DHMEQ effects on T-cell enriched normal PBMC and supershift analysis of NF- κ B components. Left panel, nuclear extracts were prepared after 16 hours treatment with or without 10 μ g/ml of DHMEQ. Results of control EMSA with OCT1 probe are shown at the bottom. Right panel, supershift analysis of NF- κ B components using antibodies indicated above the gel. The position of shifted bands is indicated on the left. Antibodies used are indicated on the top.

(C) Effects of DHMEQ on the viability of primary ATL cells. Cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay and the relative levels compared with those of DMSO-treated cells are presented. Data represent the mean \pm SD of 3 independent experiments.

(D) Detection of apoptosis by Annexin V. Three ATL samples and normal PBMC were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ and binding of FITC-conjugated Annexin V was analyzed by flowcytometry after 24 or 48 hours. Data represent the mean \pm SD of 3 independent experiments.

(E) Changes in the nuclear morphology by DHMEQ treatment. Primary ATL cells and control PBMC were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for 24 hours and stained with Hoechst 33342.

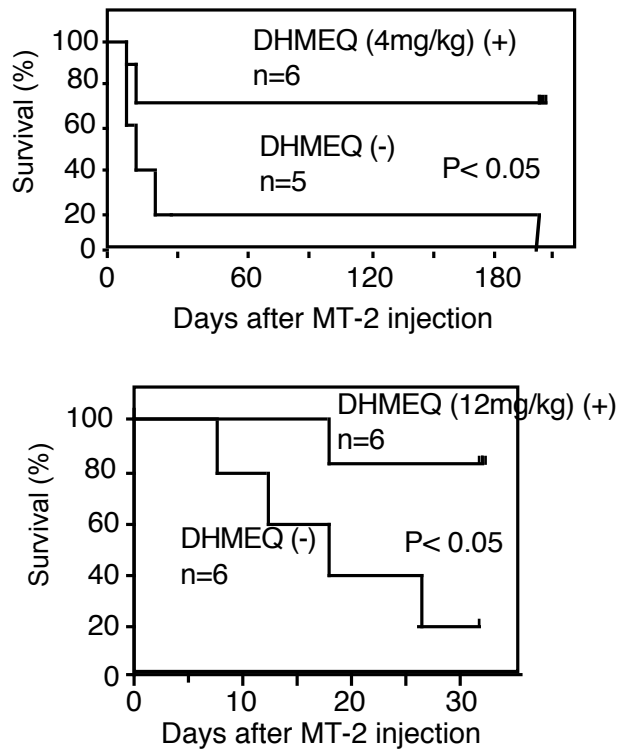
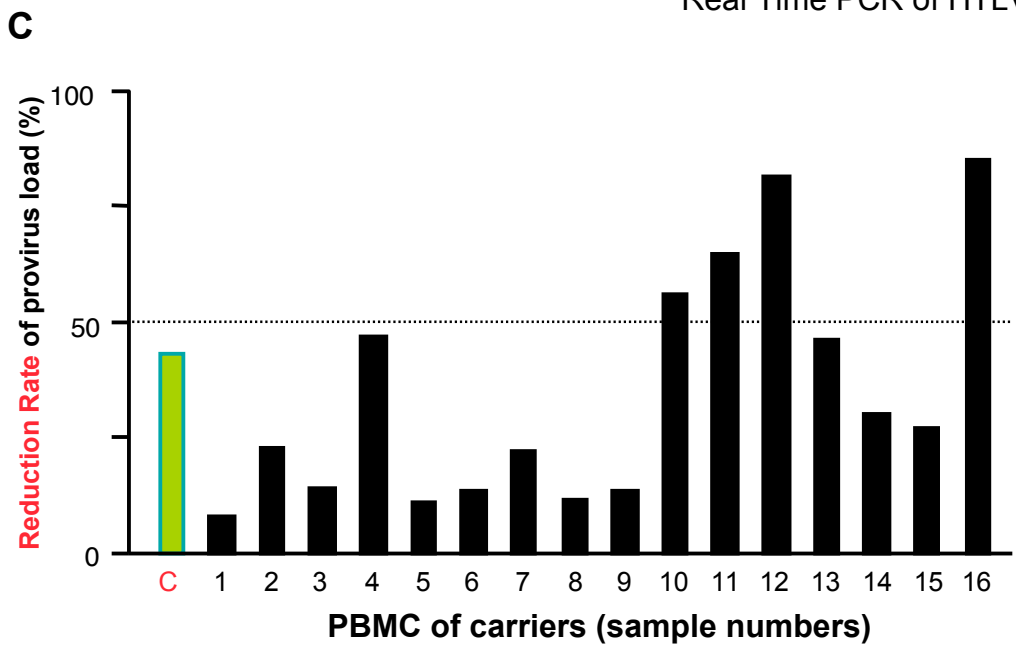
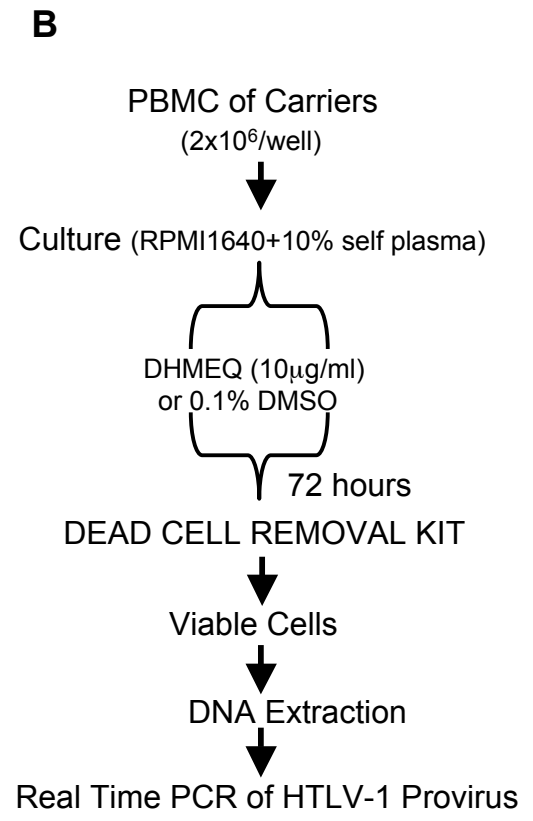
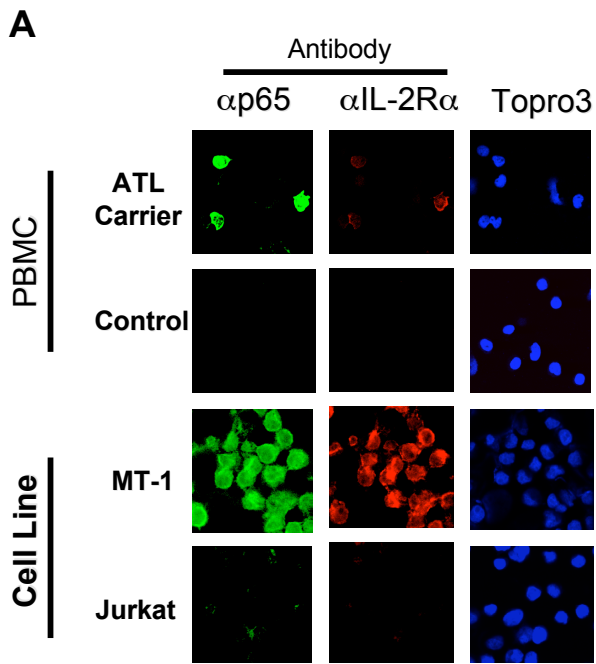


Figure 15. DHMEQ can rescue SCID mice inoculated with MT-2 cells.

Survival curves of the SCID mice injected with MT-2 cells. DHMEQ was used at the a dose of 4mg or 12mg/kg body weight. The differences are statistically significant (both $p < 0.05$ by Cox-Mantel test).



C: control reaction: mixture K562 (Negative for HTLV-1) 50%
 TL-Om1 (Positive for HTLV-1) 50%

Figure 16. Reduction of HTLV-1 provirus load of PBMC by DHMEQ

- (A) Detection of NF- κ B activated cells with IL-2R expression in PBMCs of asymptomatic HTLV-1 carriers. Confocal immunofluorescence microscopy of PBMC samples (upper panels) and control cells lines (lower panels). Primary antibodies used are indicated on the top, as well as a the agent used for nuclear staining.
- (B) The experimental protocol for measuring changes in the provirus copies after DHMEQ treatment of PBMC.
- (C) Reduction of HTLV-1 provirus load in PBMC by DHMEQ. Reduction rates of HTLV-1 provirus proviral copies of DHMEQ-treated PBMC of virus carriers are presented. Mixture of equal number of K562 and TL-Om1 cells served as a control (C).

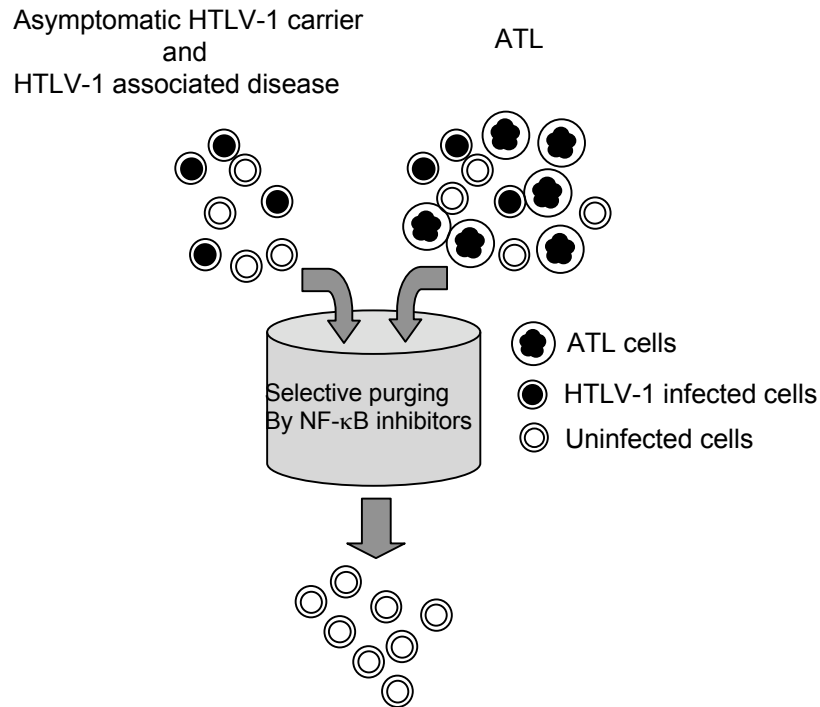


Figure 17. Schematic view of the action of NF-κB inhibitor in HTLV-1 carriers and patients with ATL

Constitutively activated NF-κB appears to be a common feature of ATL and HTLV-1 infected untransformed cells. NF-κB inhibitor purges HTLV-1-infected cells from HTLV-1 carrier (left). In ATL patients NF-κB inhibitor purges not only ATL cells but also HTLV-1 infected untransformed cells from the body (right).

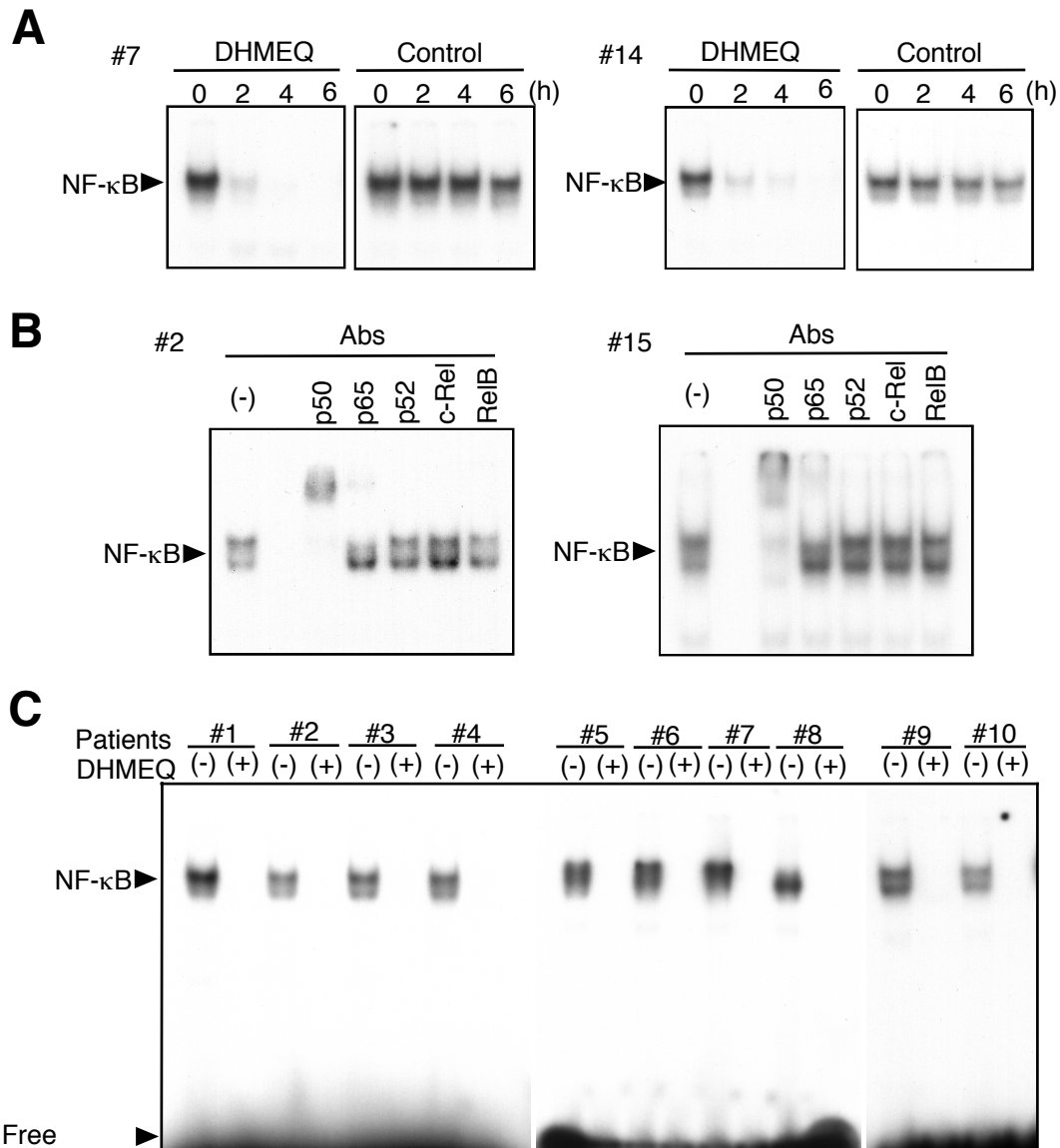


Figure 18. Inhibition of constitutive NF-κB activity in CLL cells by DHMEQ

(A) Time course studies of NF-κB inhibition by DHMEQ. CLL cell cells were treated with 10 μg/ml of DHMEQ for indicated hours. Nuclear extracts (2 μg) were examined for NF-κB binding activity by EMSA with a radiolabeled NF-κB specific probe.

(B) NF-κB subcomponent analysis in CLL cells. Subcomponents of NF-κB constitutively activated in CLL cells were determined by supershift analysis. Nuclear extracts (2 μg) of untreated DHMEQ were subjected to supershift analysis with antibodies specific for NF-κB p50, p65, p52, c-Rel and RelB.

(C) Inhibition of constitutive NF-κB binding activity in CLL cells. CLL cells were treated with (+) or without (-) 10 μg/ml of DHMEQ for 3 hours. Nuclear extracts (2 μg) were examined for NF-κB binding activity by EMSA with a radiolabeled NF-κB specific probe. The position of shifted bands corresponding to NF-κB and free probes are indicated on the left.

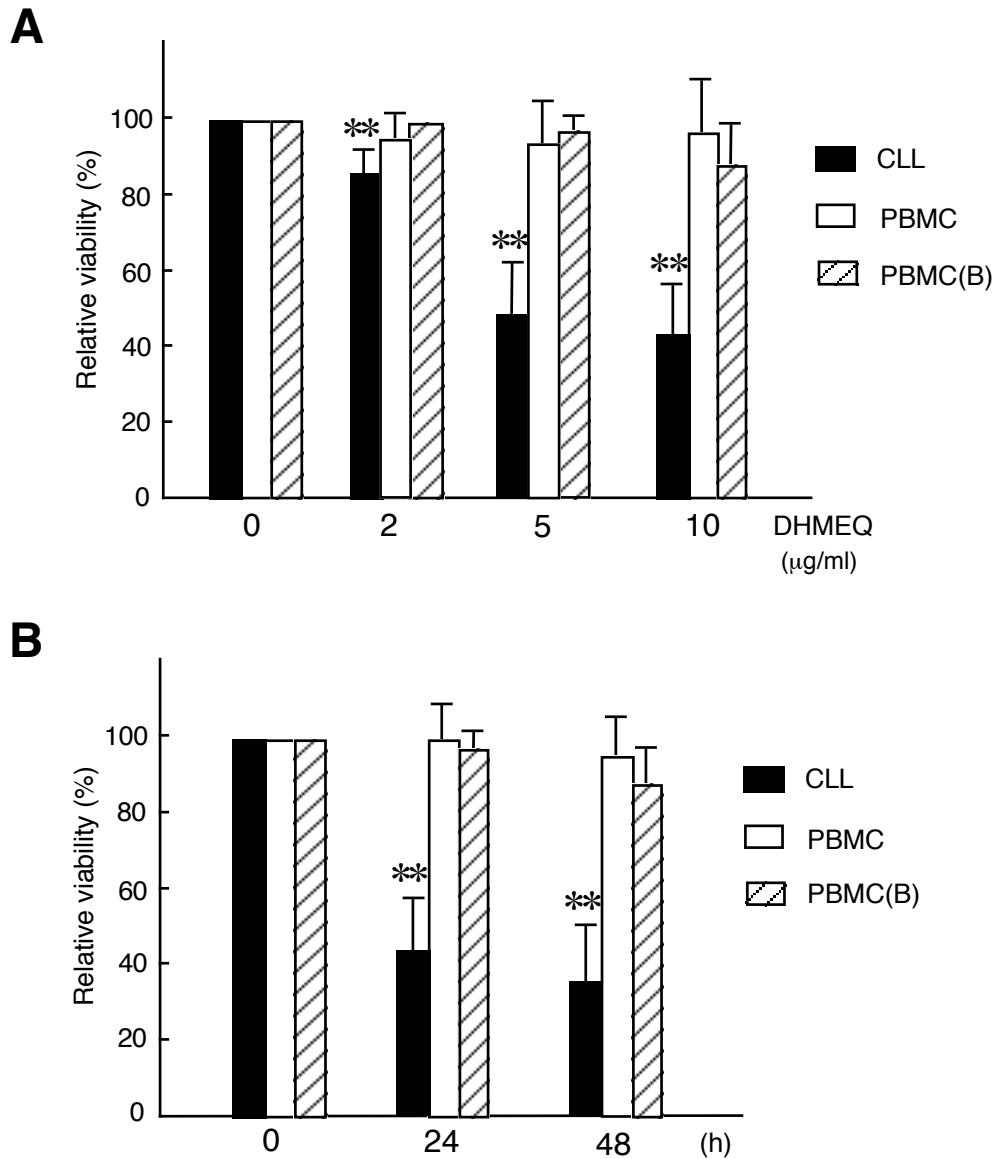


Figure 19. DHMEQ reduces viability of CLL cells

Reduction of viability of CLL cells treated with DHMEQ. CLL cells, PBMC and purified B cells were treated with indicated concentrations of DHMEQ for 48 hours (A) or were treated for the indicated hours with 10 µg/ml of DHMEQ (B). Cell viabilities were determined by MTT assay. For each case experiments were done in triplicate. The data are means \pm s.d. of indicated cases. ** $P < 0.01$

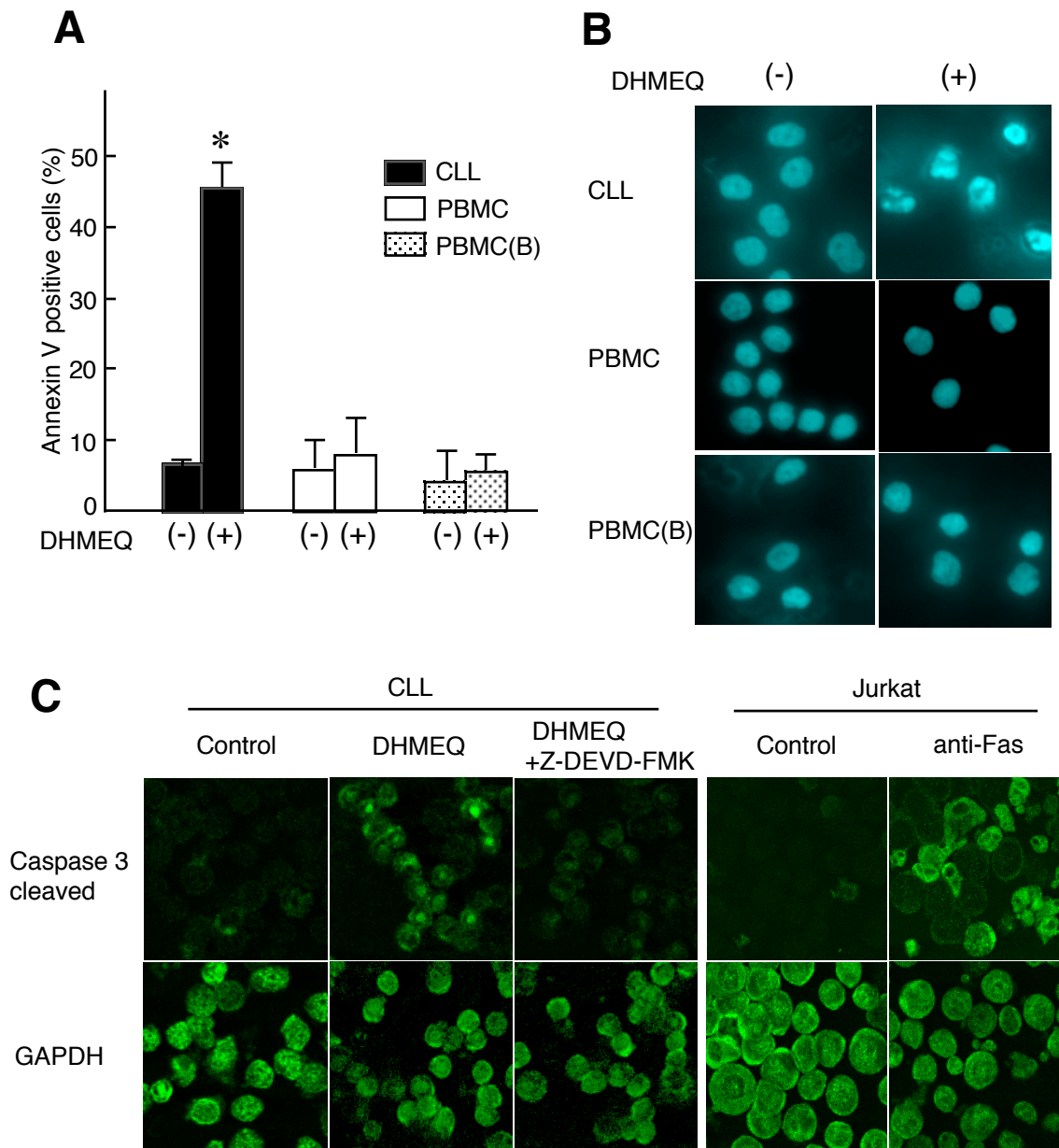


Figure 20. DHMEQ induces apoptosis of CLL cells

(A) Flow cytometric analysis of Annexin V reactive cells. CLL cells, PBMC and purified B cells were treated with 5 μ g/ml of DHMEQ for 24 hours. After labeling with FITC-conjugated Annexin V, cells were analyzed by flow cytometry. For each case experiments were done in triplicate. The data are means \pm s.d. of indicated cases. * $P < 0.05$

(B) Nuclear fragmentation of cells treated with DHMEQ. CLL cells, PBMC and purified B cells were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 24 hours and stained with 10 μ M Hoechst 33342.

(C) Immunohistological detection of caspase 3 activation after DHMEQ treatment in CLL cells. CLL cells were incubated with or without 5 μ g/ml of DHMEQ for 24 hours. For inhibition of caspase 3, 20 μ M of Z-DEVD-FMK was added to the culture media one hour prior to DHMEQ addition. For positive control Jurkat cells treated with 200 ng/ml of anti-Fas antibody for 3 hours were used. Cells were spun with a cytocentrifuge and stained by antibody for cleaved caspase 3 and observed by confocal microscopy. Staining of GAPDH served as controls.

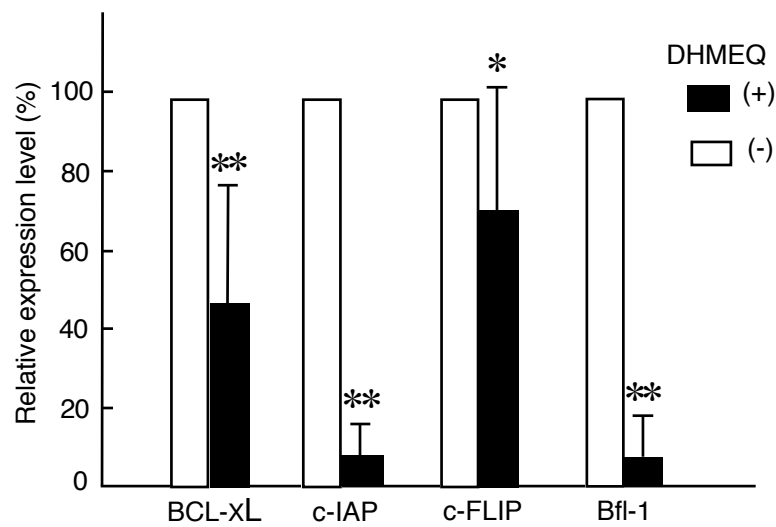


Figure 21. Effects of DHMEQ on genes regulating apoptosis in CLL cells.

Quantification of the gene expression by real time PCR. CLL cells were treated with or without 10 ...g/ml of DHMEQ for 16 hours. The expression of Bcl-xL, c-IAP, c-FLIP, and Bfl-1 were quantified by real time PCR. For each case experiments were done in triplicate. The data are means \pm s.d. of indicated cases.

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

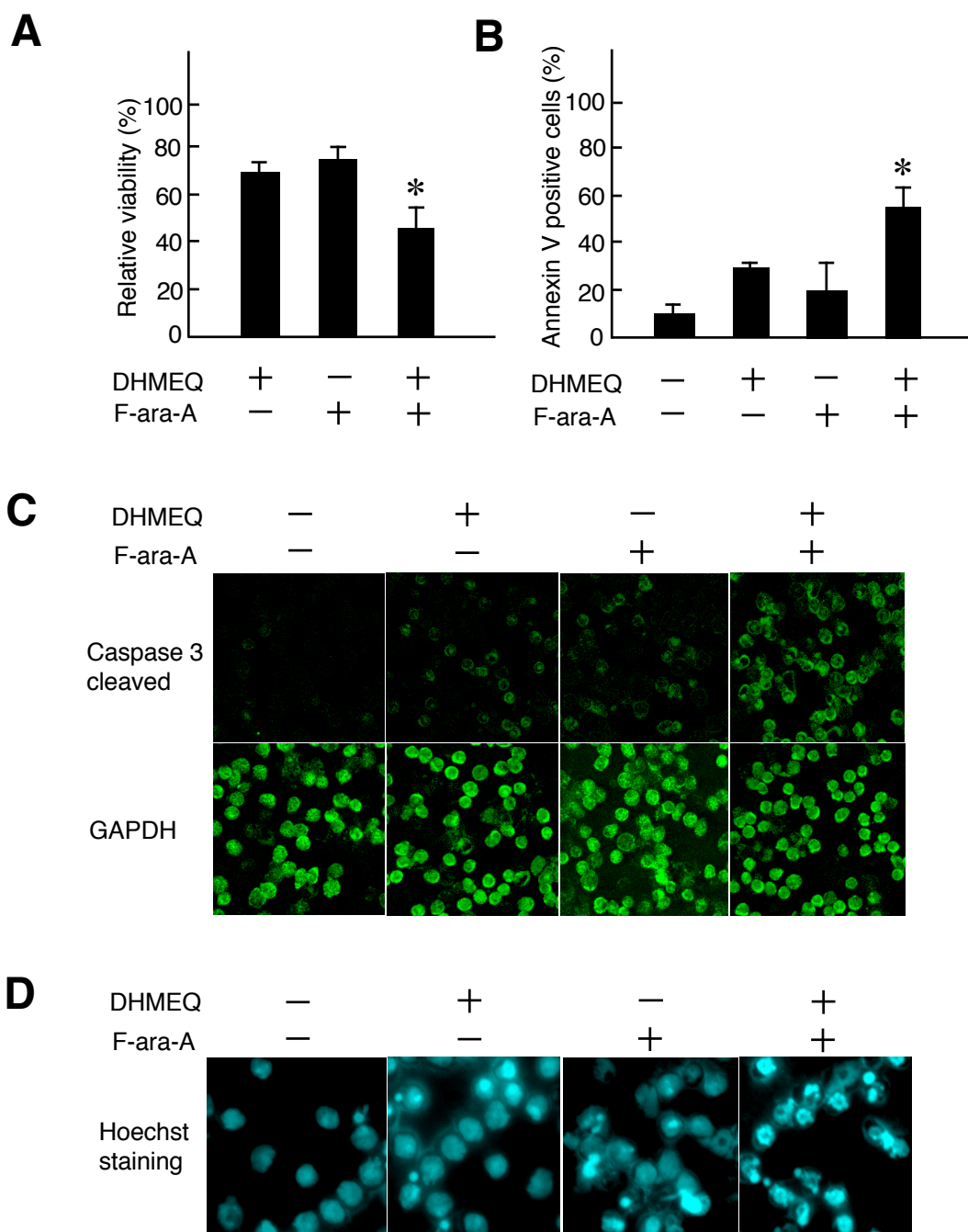


Figure 22. DHMEQ enhances anti-tumor effect of fludarabine in CLL cells

(A), (B), (C) and (D) Evaluation of combined effect of DHMEQ and F-ara-A. CLL cells were treated with $5 \mu\text{g/ml}$ of DHMEQ, $2 \mu\text{g/ml}$ of F-ara-A or combination of these two agents for 24 hours. MTT assay (A), Flow cytometric analysis of Annexin V reactive cells (B), Immunohistological detection of caspase 3 (C) and Nuclear fragmentation of CLL cells detected by Hoechst 33342 (D). In (a) and (B) experiments were done in triplicate and the data are means \pm s.d. of indicated cases. * $P < 0.05$

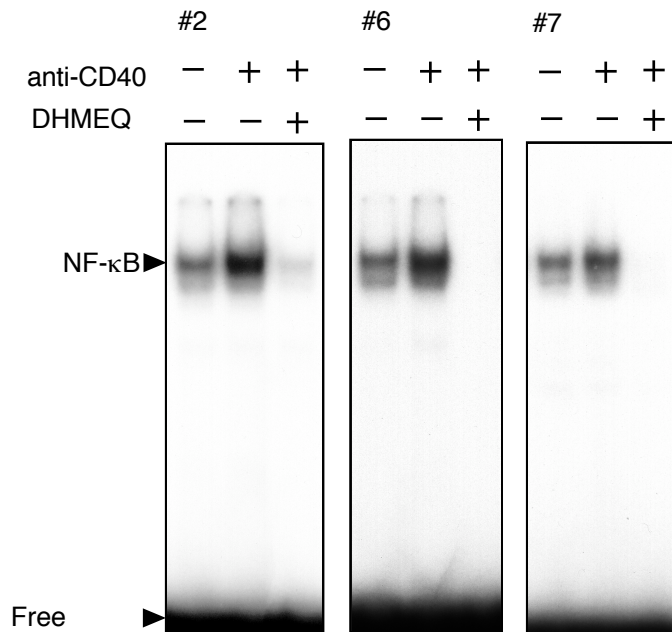


Figure 23. DHMEQ abrogates constitutive and inducible NF- κ B triggered by CD40

CLL cells (1×10^6) were cross-linked by 500 ng/ml of anti-CD40 agonistic mouse antibody (Immunotech, Marseille Cedex, France) for one hour and treated by 10 μ g/ml of DHMEQ for 5 hours. CLL cells cross-linked by isotype matched IgG (Dako) served as controls. Two μ g of nuclear extracts were examined for NF- κ B binding activity by EMSA using a radiolabeled NF- κ B probe

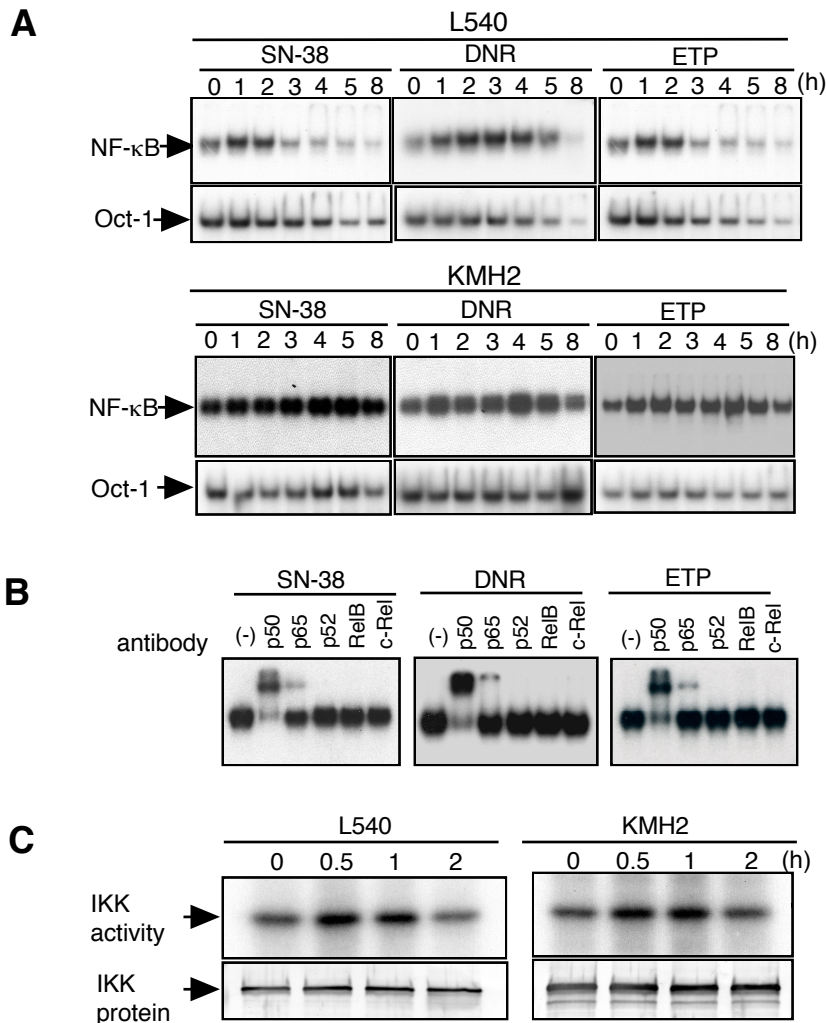


Figure 24. Treatment by topoisomerase inhibitors further induces NF- κ B activity via IKK in H-RS cell lines with or without I κ B α mutations

(A) The effect of SN-38, daunorubicin and etoposide on NF- κ B activity of H-RS cells with or without I κ B α mutations. H-RS cell lines; L540 cells without I κ B α mutations or KMH2 cells with I κ B α mutations were treated with 100 ng/ml of SN-38, 2 μ M daunorubicin or 50 μ M etoposide for indicated hours. Nuclear extracts (1 μ g) were examined for NF- κ B binding activity by EMSA with radiolabeled NF- κ B specific probe. Topoisomerase inhibitors used are indicated above. DNR, daunorubicin; ETP, etoposide. Lower panels show results of EMSA with a control probe, Oct-1.

(B) Analysis of NF- κ B subcomponent after treatment with topoisomerase inhibitors by supershift assay. KMH2 cells were treated with topoisomerase inhibitors for 5 hours and harvested. 2 μ g of nuclear extracts were subjected to analysis. Antibodies used are indicated above.

(C) In vitro kinase assay of H-RS cell lines with or without I κ B α mutations. L540 cell or KMH2 cells treated with 100 ng/ml of SN-38 for indicated hours were immunoprecipitated by anti-IKK antibody and subjected to in vitro kinase assay using I κ B α as substrate. Phosphorylation of I κ B α by IKK, which represents IKK activity is shown in the upper panels. Immunoblot of immunoprecipitates by anti-IKK antibody in lower panels shows an equal amount of IKK was used in each reaction.

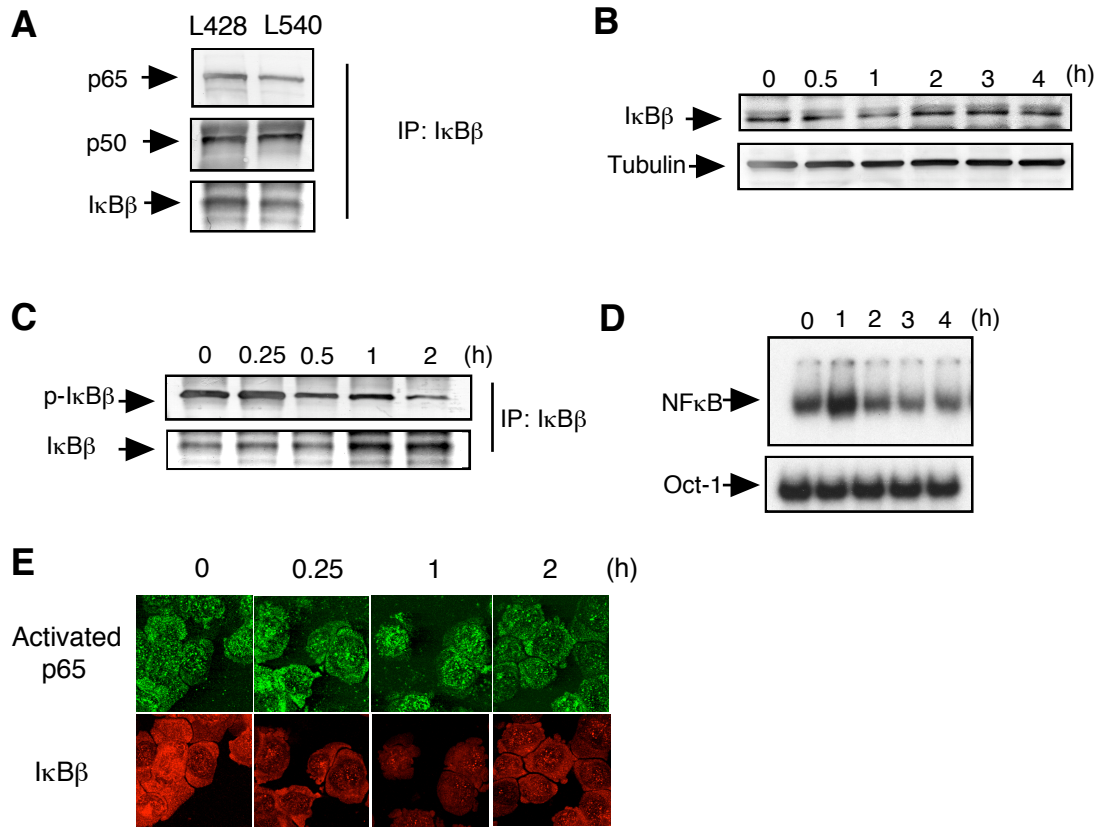


Figure 25. Topoisomerase inhibitor-mediated induction of NF- κ B is mediated by the phosphorylation and degradation of I κ B β in H-RS cells with I κ B α mutations

(A) Coimmunoprecipitation analysis of NF- κ B p50 and p65 with I κ B β . Immunoprecipitates of anti-I κ B β antibody were blotted with anti-NF- κ B p50 or p65 antibodies (upper panels). Immunoprecipitates were blotted with anti-I κ B β antibody (bottom panel). IP, immunoprecipitation.

(B) Expression level of I κ B β protein in L428 cells after treatment with topoisomerase inhibitor. Whole cell lysates of L428 treated with SN-38 for the indicated number of hours were blotted with anti-I κ B β antibody (upper panel) or anti- α tubulin antibody (bottom panel).

(C) Phosphorylation of I κ B β protein in L428 cells after treatment with topoisomerase inhibitor. L428 cells were treated with 100 ng/ml of SN-38 for the indicated number of hours. Immunoprecipitates of anti-I κ B β antibody were blotted with anti-phosphoserine antibody (upper panel) or anti-I κ B β antibody (bottom panel).

(D) The effect of SN-38 on NF- κ B activity in L428 cells. L428 cells were treated with 100 ng/ml of SN-38 for the indicated number of hours. Nuclear extracts (1 μ g) were examined for NF- κ B binding activity by EMSA with radiolabeled NF- κ B-specific probe.

(E) Localization of activated NF- κ B p65 and I κ B β after treatment with topoisomerase inhibitor. L428 cells were treated with 100 ng/ml of SN-38 for the indicated number of hours. Confocal immunofluorescence microscopic analysis was done on cytospin samples stained with antibodies against activated NF- κ B p65 and I κ B β .

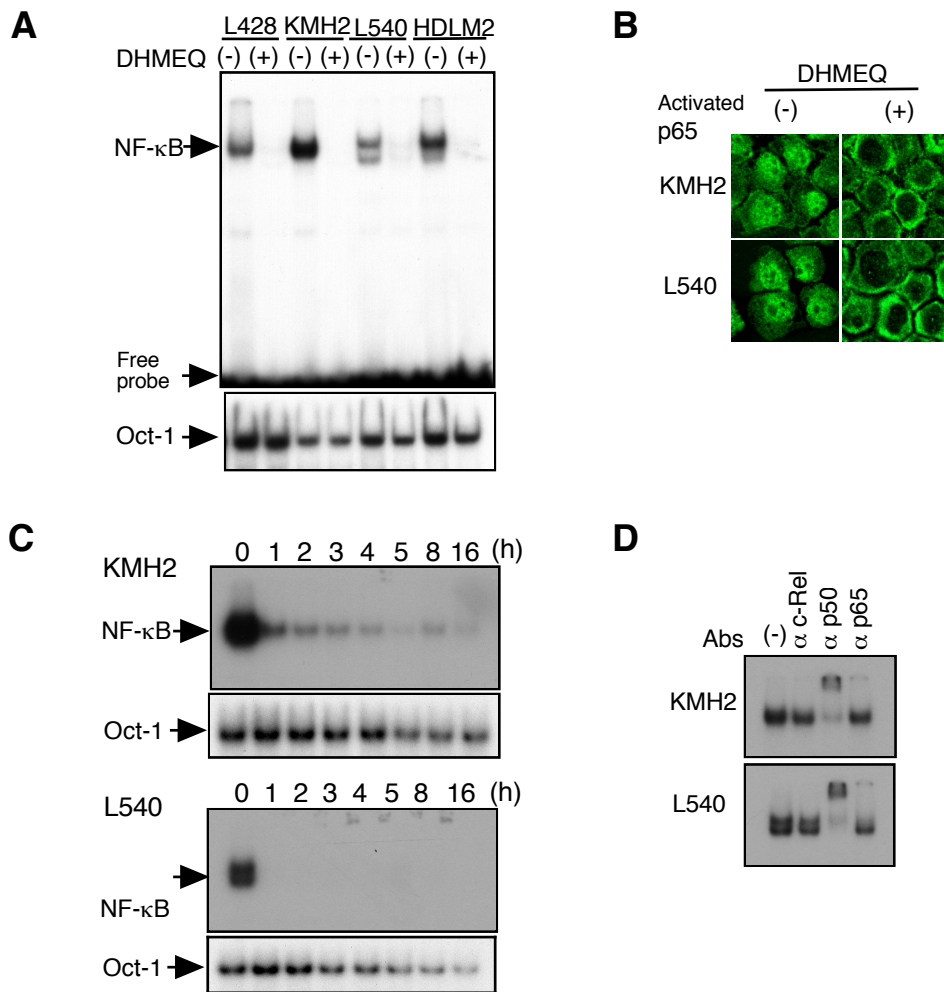


Figure 26. DHMEQ suppresses constitutive NF- κ B activity in H-RS cell lines

(A) Inhibition of constitutive NF- κ B binding activity in H-RS cell lines. H-RS cell lines, L428, KMH2, L540 and HDLM2, were treated with (+) or without (-) 10 μ g/ml of DHMEQ for 7 hours. Nuclear extracts (2 μ g) were examined for NF- κ B binding activity by EMSA with a radiolabeled NF- κ B specific probe. The upper panel shows inhibition of NF- κ B binding activity by DHMEQ. The lower panel shows results of EMSA with a control probe, Oct-1. The position of shifted bands corresponding to NF- κ B and free probes are indicated on the left.

(B) Accumulation of active NF- κ B p65 in the cytoplasm after DHMEQ treatment. L428 and L540 cells were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 6 hours. Confocal immunofluorescence microscopic analysis was done on cytospin samples stained with antibody against active NF- κ B p65.

(C) Time course studies of NF- κ B inhibition by DHMEQ. L540 and KMH2 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated hours. Nuclear extracts (2 μ g) were examined for NF- κ B binding activity by EMSA with a radiolabeled NF- κ B specific probe. EMSA with Oct-1 served as control.

(D) NF- κ B subcomponent analysis in H-RS cell lines. Subcomponents of NF- κ B constitutively activated in H-RS cell lines were determined by supershift analysis. Nuclear extracts (2 μ g) of untreated DHMEQ were subjected to supershift analysis with antibodies specific for c-Rel, NF- κ B p50 and NF- κ B p65. Cell lines used are indicated on the left.

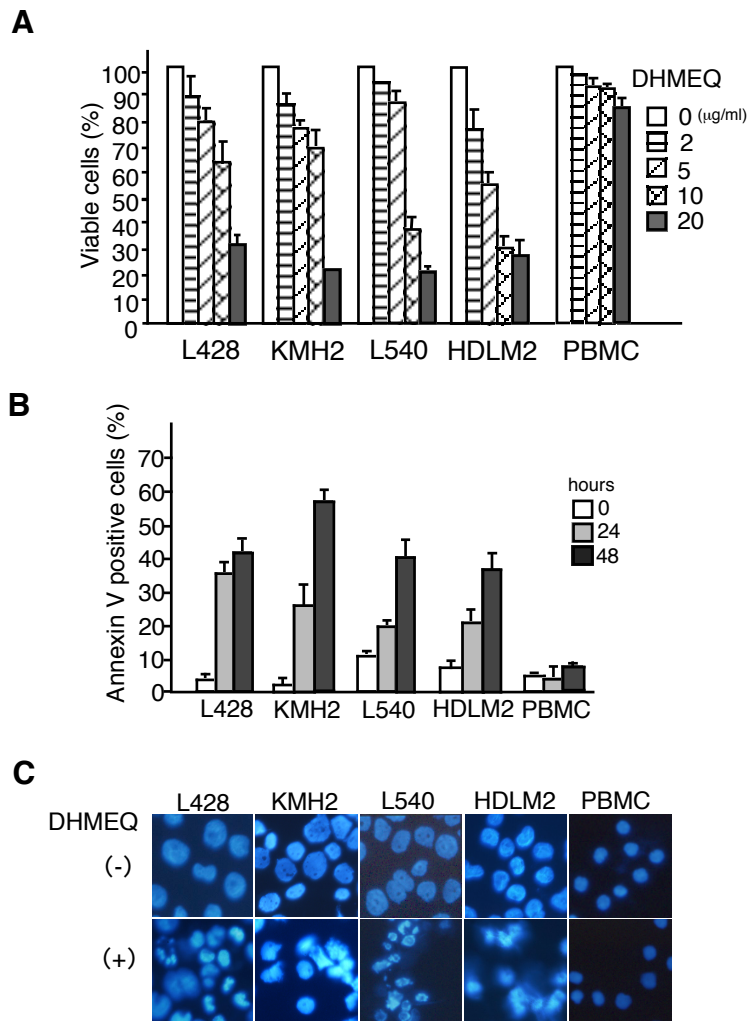


Figure 27. DHMEQ induces apoptosis of H-RS cell lines

(A) Dose dependent reduction of cell viabilities of H-RS cell lines treated with DHMEQ. H-RS cell lines; L428, KMH2, L540 and HDLM2 as well as PBMC were treated with indicated concentrations of DHMEQ for 48 hours. Cell viabilities were determined by MTT assay. Data represent the mean \pm s.d. of 3 independent experiments.

(B) Flow cytometric analysis of Annexin V reactive cells. L428 and KMH2 cells were treated with 20 μ g/ml of DHMEQ for indicated hours. L540, HDLM2 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ. PBMC were treated with 20 μ g/ml of DHMEQ. After labeling with FITC-conjugated Annexin V, cells were analyzed by flow cytometry. Data represent the mean \pm s.d. of 3 independent experiments.

(C) Nuclear fragmentation of cells treated with DHMEQ. Cells were treated with the same concentration of DHMEQ used in the detection of Annexin V reactive cells for 48 hours and stained with 10 μ M Hoechst 33342. Cells used are indicated above.

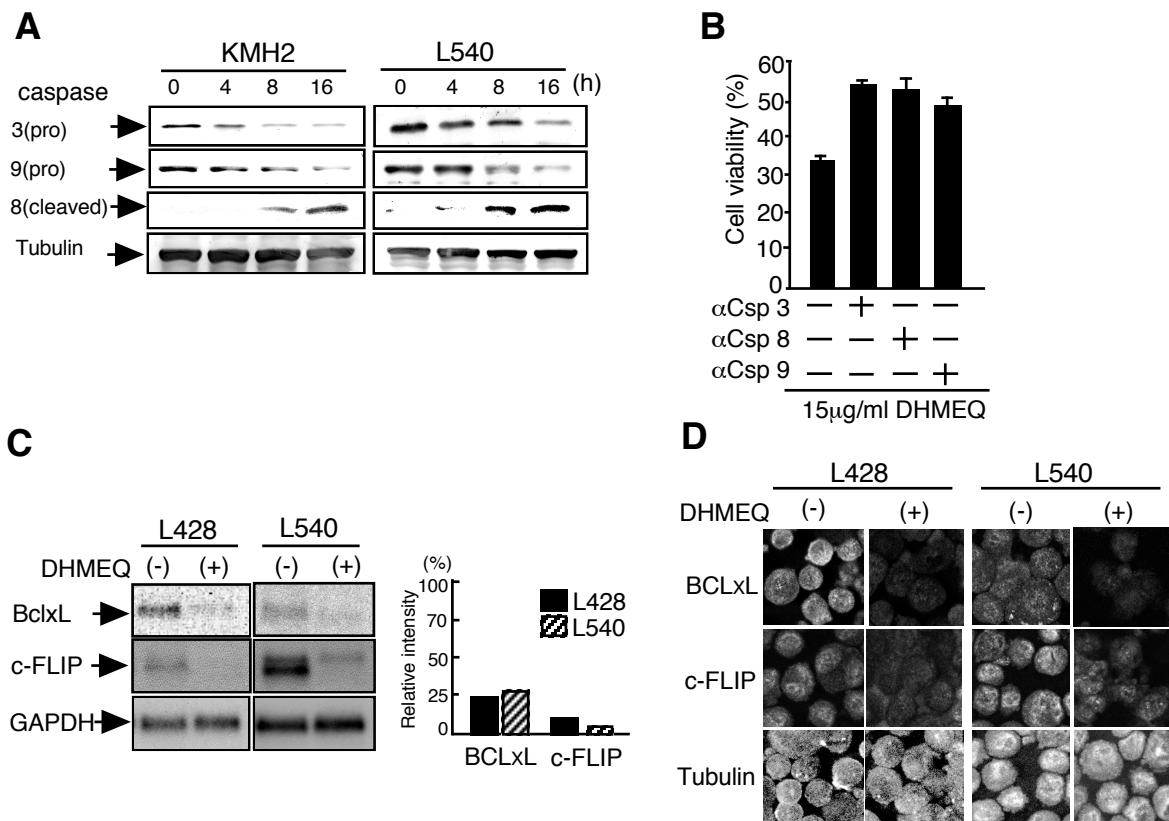


Figure 28. DHMEQ-induced apoptosis of H-RS cell lines involves activation of membranous and mitochondrial caspase pathways and downregulation of c-FLIP and Bcl-xL

(A) Immunoblot analyses of caspase 3, 8 and 9. L540 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ and KMH2 cells were treated of 20 μ g/ml with DHMEQ for indicated hours. 30 μ g of whole cell lysates were subjected to the analysis.

(B) Inhibition of DHMEQ induced apoptosis by blockade of caspase 3, 8 and 9 activities in KMH2 cells. Prior to the incubation with 15 μ g/ml of DHMEQ, KMH2 cells were treated with 50 μ M of caspase 3-inhibitor z-DEVD-FMK, caspase 8-inhibitor z-IETD-FMK or caspase 9-inhibitor z-LEHD-FMK. After 12 hours of treatment with DHMEQ, cells were analyzed by MTT assay.

(C) The expression of Bcl-xL and c-FLIP mRNA. L428 and L540 cells were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. The expression of Bcl-xL and c-FLIP was examined by Northern blot analysis, using RT-PCR amplified fragments as probes. Two μ g of poly (A)-selected RNA were subjected to the analysis. Results of Northern blot analyses are shown on the left. Expression of GAPDH served as a control. Quantification of relative levels of expression is shown on the right. GAPDH signals were measured by densitometry and the values were used to normalize the levels of densitometric quantification of Bcl-xL and c-FLIP mRNA expression in L428 and L540 cells. The relative expression levels of treated samples are expressed as percentages of those of untreated ones, which are set to 100%.

(D) Expression of Bcl-xL and c-FLIP proteins involved in anti-apoptosis. L428 and L540 cells were treated with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 16 hours. Cells were spun by centrifugation onto glass coverslips and stained with antibodies specific for Bcl-xL and c-FLIP and observed with fluorescence confocal microscopy. Expression of α tubulin served as control.

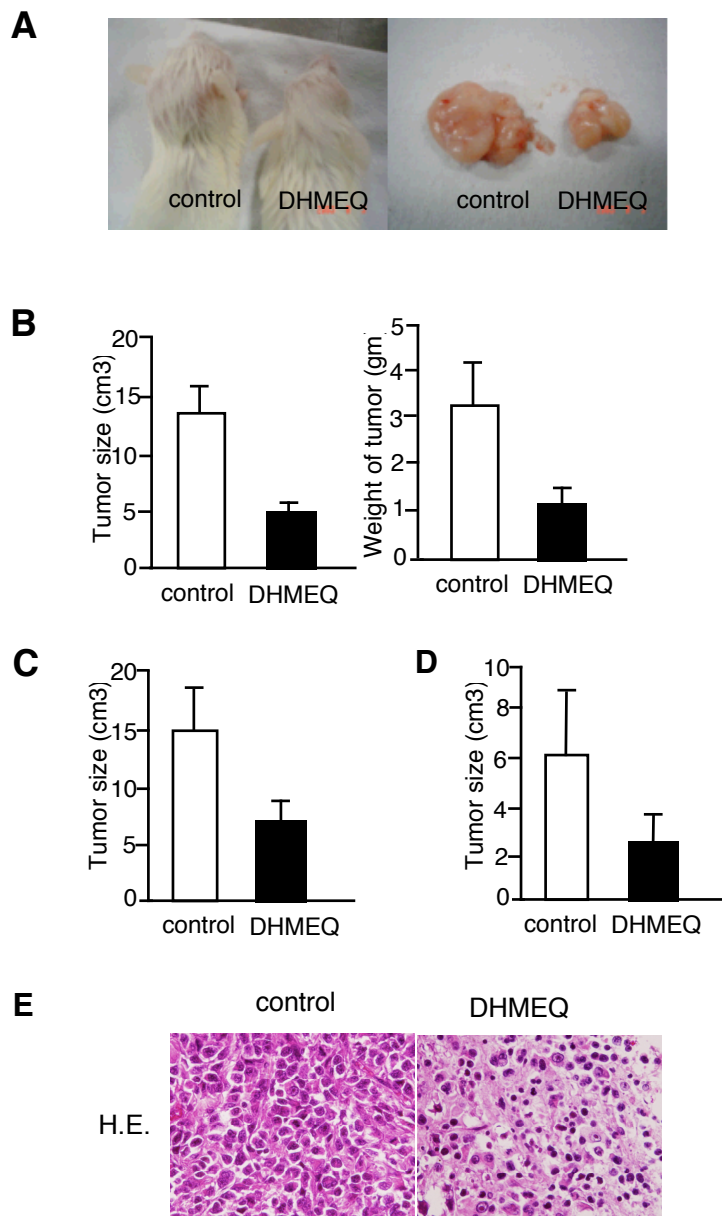


Figure 29. Effects of DHMEQ on H-RS cell lines inoculated in NOG mice

1×10^7 of L540 cells were inoculated in the post-auricular region of NOG mice. For the treatment group, 12 mg/kg of DHMEQ was administered intra-peritoneally three times a week for 1 month, beginning on either day 0 or day 5 when tumors were palpable. The control mice received RPMI 1640 (200 μ l) simultaneously.

(A) Gross appearance of the mice with (right) or without (left) DHMEQ treatment. Macroscopic images of subcutaneous tumors formed by L540 and those resected from mice with (right) or without (left) DHMEQ treatment.

(B) Size and weight of the resected tumors were measured and represented as bar graphs. Data represent the mean \pm s.d. from 6 mice.

(C) and (D) Effects of DHMEQ on established tumors. L540 cells (C) and KMH2 cells (D) were used for the experiments. Size of tumors was measured and represented as bar graphs. Data represent the mean \pm s.d. from 4 mice.

(E) Growth inhibitory effect of DHMEQ on H-RS cells is accompanied by apoptosis. Microscopic images of HE stained tumor tissues of mice with or without DHMEQ treatment (right and left, respectively) revealed apoptotic cells in DHMEQ treated mice.

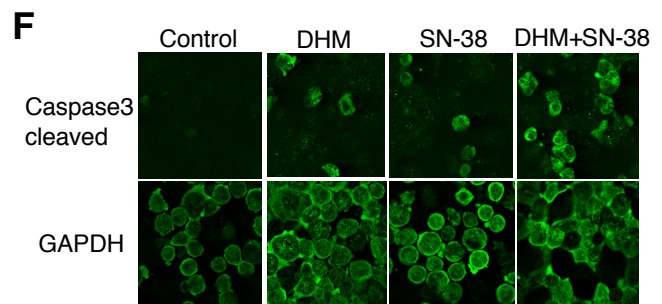
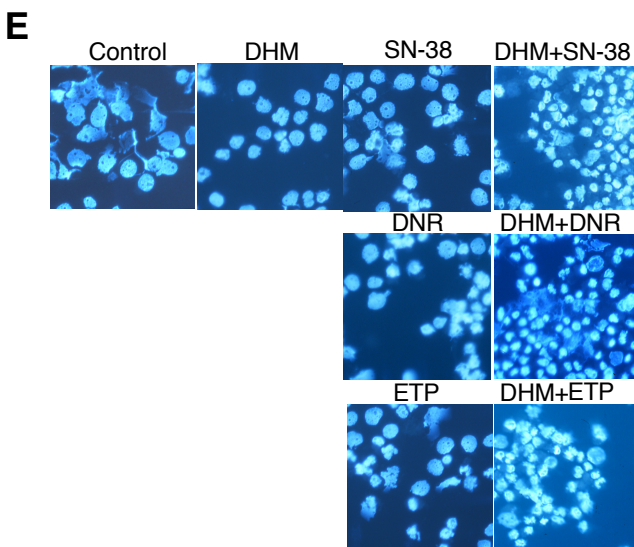
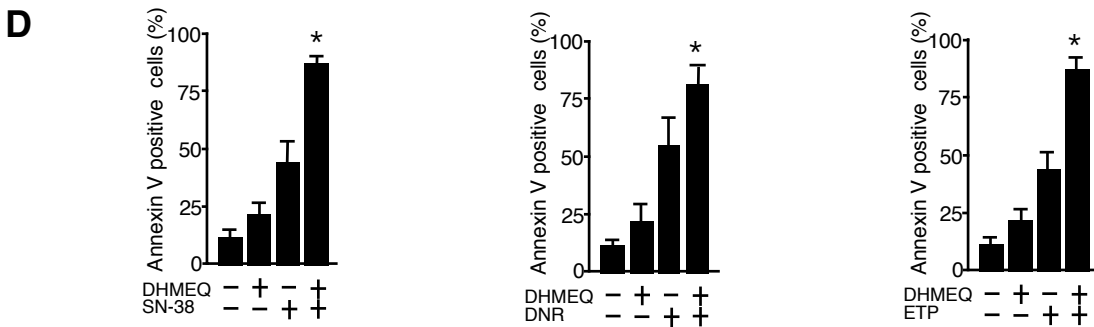
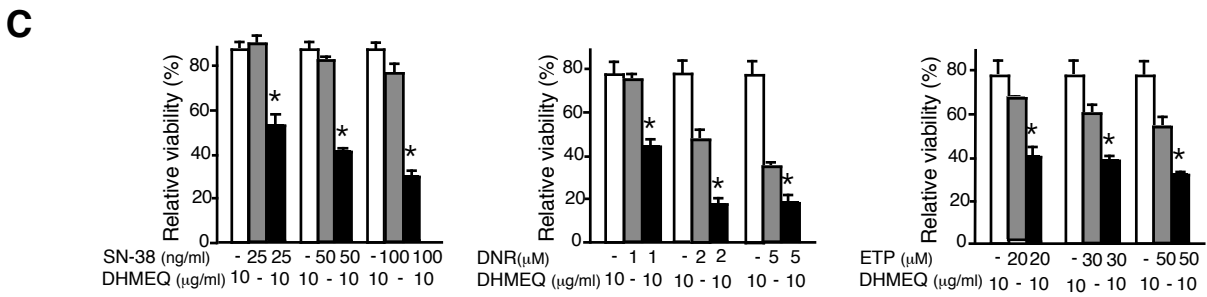
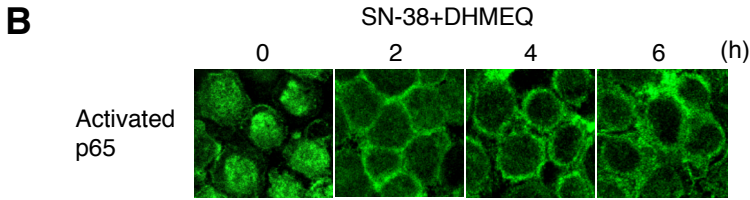
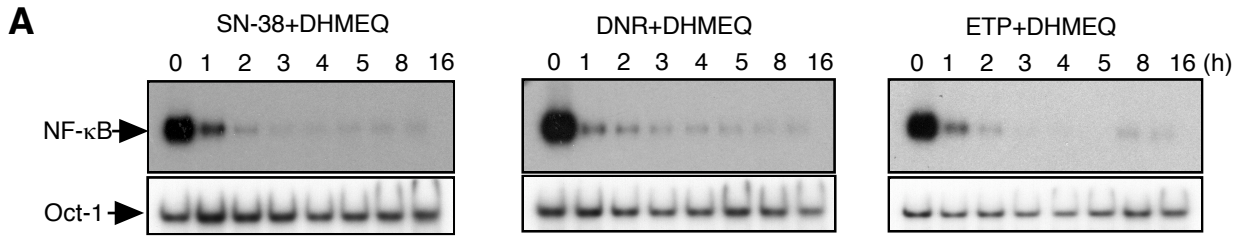


Figure 30. DHMEQ abrogates inducible NF- κ B and enhances anti-tumor effect of topoisomerase inhibitors in H-RS cell lines

(A) Inhibition of topoisomerase inhibitors mediated NF- κ B induction by DHMEQ. KMH2 cells were exposed to 100 ng/ml of SN-38, 2 μ M daunorubicin or 50 μ M etoposide in combination with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated hours. Two μ g of nuclear extracts were examined for NF- κ B binding activity by EMSA using NF- κ B probe. Lower panels show results of EMSA with a control probe, Oct-1. DHMEQ, DHM; daunorubicin, DNR, ETP, etoposide

(B) Accumulation of active NF- κ B p65 after DHMEQ treatment. KMH2 cells were exposed to 100 ng/ml of SN-38 in combination with 10 μ g/ml of DHMEQ for indicated hours. Confocal immunofluorescence microscopic analysis was done on cytospin samples stained with antibodies against active NF- κ B p65.

(C) Effect of DHMEQ on viability of H-RS cells treated by topoisomerase inhibitors. KMH2 cells were treated with indicated concentrations of topoisomerase inhibitors with or without 10 μ g/ml of DHMEQ. Forty-eight hours after treatment, cell viability was measured by MTT assay and the relative viability was determined. MTT values of DMSO-treated cells were set to 100%. Data present the mean \pm s.d. of 3 independent experiments. * P <0.05, compared with SN-38, DNR or ETP alone

(D) Analysis of Annexin V reactive cells. KMH2 cells were treated with 10 μ g/ml of DHMEQ with or without topoisomerase inhibitors for 24 hours. Cells were stained by FITC-conjugated Annexin V and analyzed by flow cytometry. Data present the mean \pm s.d. of 3 independent experiments. Concentration of the agents was SN-38; 100ng/ml, daunorubicine; 2 μ M and etoposide; 50 μ M. * P <0.05, compared with SN-38, DNR or ETP alone.

(E) Nuclear fragmentation. KMH2 cells were treated with topoisomerase inhibitors with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 24 hours. After treatment, KMH2 cells were harvested and subjected to staining by Hoechst 33342. Concentration of the agents was the same as in flow cytometric analysis of Annexin V reactive cells.

(F) Activation of caspase 3. L428 cells were treated with 100 ng/ml of SN-38 with or without 10 μ g/ml of DHMEQ for 24 hours. Cells were spun onto slide glass and stained with antibody for cleaved caspase 3 and analysed by confocal microscopy. Staining by GAPDH served as a control.