

ヘテロ環有機ビスマス化合物の

急性前骨髄性白血病細胞株 NB4 細胞に対する分化誘導

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 矢倉研究室 藤吉 佑治

急性前骨髄性白血病 (APL) は、染色体転座 t(15:17)により発現する PML-RAR α 融合タンパク質を病因とする白血病であり、現在では三酸化砒素 (As₂O₃) や ATRA (レチノイン酸) による PML-RAR α を標的とする分化誘導療法が有効であるとされている。しかし、三酸化砒素や ATRA に耐性を持つ難治性の白血病も存在し、APL の治療に有効な新規化合物を探索することは、この耐性を克服する一つの手段であると考えられる。当研究室での先行研究によって、ヘテロ環有機ビスマス化合物である bi-chlorodibenzo [c,f][1,5] thiabismocine(#3)が急性骨髄性白血病由来の HL-60 細胞の増殖を阻害し、アポトーシスを誘導することがわかっており、白血病の治療薬としての応用が期待できると考えられる。また、ビスマスと砒素は周期表において同じ窒素族元素に属しており、類似した化学的性質を持つことが知られている。よってビスマス化合物も三酸化砒素と同様に APL 細胞に対して分化誘導効果を持つ可能性が考えられる。そこで本研究では、分化マーカーの発現量の変化を調べることによって分化誘導効果を評価し、#3 が APL 由来の細胞株である NB4 細胞に対して分化誘導効果を持つかどうかを明確にすることで APL に対する分化誘導療法への応用の可能性を探ること、そして#3 による NB4 細胞の分化誘導のメカニズムを解析することを目的に研究を行った。

WST-8 法によって#3 の細胞生存能への影響を調べた。Hoechst33342 を用いて細胞の核を染色し、アポトーシスの指標である核の断片化を確認した。#3 が NB4 細胞の分化マーカーの発現を誘導するか調べるために、CD11b、CD14、CD86 の発現量を蛍光標識されたそれぞれの抗体を用いてフローサイトメトリーによって解析した。分化マーカーである CD86、CD14、CD52、p47^{phox}、CD11b、CD18 の mRNA レベルでの発現量の変化を RT-PCR 法によって調べた。RAR α に対する抗体を用いたウェスタンブロット法によって RAR α 及び PML-RAR α を検出した。また、PML に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、PML の局在を確認した。

フローサイトメトリーによる解析の結果、0.25 μ M の#3 は CD14、CD86 の発現をわずかに誘導した。また、RT-PCR による解析では、#3 によって CD14、CD86、CD52、p47^{phox} の発現が誘導されることが明らかになった。これらのことから#3 は NB4 細胞に対する分化誘導効果を持つことと、ビスマス化合物が APL の分化誘導療法に応用できる可能性を秘めていることが示されたと考える。また、CD14 は骨髄系の細胞である単球/マクロファージに強く発現するマーカーであるので、分化の方向性として#3 は NB4 細胞の単球系細胞への分化を誘導する可能性が考えられる。さらに、#3 は ATRA と併用すると、ATRA による細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果、分化誘導効果を増強した。このことから、有機ビスマス化合物が ATRA と併用する治療薬として応用できる可能性が示唆される。ウェスタンブロット法による解析より、APL 細胞で発現されており分化を阻害する因子である PML-RAR α の分解が#3 によって Caspase 依存的に誘導されることが明らかとなった。#3 誘導性の PML-RAR α の分解と分化マーカーの発現量変化との相関を調べるために、全 Caspase 阻害剤を用いて#3 誘導性の PML-RAR α の分解を阻害した条件での CD86、CD14、CD52 の発現量の変化を RT-PCR 法によって解析した。その結果、#3 が誘導する分化マーカーの発現は全 Caspase 阻害剤によって阻害されなかった。したがって、#3 が誘導する分化マーカーの発現は PML-RAR α の分解に非依存的なものであると考えられる。#3 が誘導する分化マーカーの発現にどのような因子が関与するかはまだ明らかになっておらず、今後より詳細な解析が必要である。