

澤山 靖 論文内容の要旨

主 論 文

## Expression of myeloperoxidase enhances the chemosensitivity of leukemia cells through the generation of reactive oxygen species and the nitration of protein.

ミエロペルオキシダーゼ発現は活性酸素合成と蛋白質のニトロ化を介して  
白血病細胞における化学療法剤感受性を上昇させる

澤山靖、宮崎泰司、安東恒史、堀尾謙介、堤千寿子、今西大介、対馬秀樹、今泉芳孝、  
波多智子、福島卓也、吉田真一郎、鬼丸康之、岩永正子、田口潤、栗山一孝、  
朝長万左男

(Leukemia・2008年1月4日受理)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻

(主任指導教員：朝長 万左男教授)

### 緒 言

ミエロペルオキシダーゼ(MPO)は骨髄系造血細胞に細胞系列特異的に発現するタンパク質で、急性骨髄性白血病(AML)と急性リンパ性白血病の鑑別における Golden marker として世界的に頻用されている。一方、MPO が白血病の予後因子として有用であるとの報告も存在する。そこで我々は JALSG プロトコールにより治療を受けた AML491 症例を、白血病芽球の MPO 発現率により高発現群と低発現群に分けて生存率を比較し、さらに現在 AML で最も強い予後因子とされる染色体核型を加えた多変量解析を実施した。その検討では MPO 高発現群の全生存率が有意に高く、多変量解析においても MPO は独立した予後因子であり、MPO は診断マーカーとしてのみならず、予後因子としても重要であることが明らかとなった (Matsuo T. et al. Leukemia 2003)。また、AML 幹細胞が含まれる AC133 (CD133)陽性の未分化 AML 細胞を対象として MPO 遺伝子、蛋白質および酵素活性の発現を検討したところ、MPO 遺伝子は白血病幹細胞レベルで予後良好 AML に高頻度に発現している可能性が示唆された (Taguchi J. et al. Leukemia research 2006)。

以上より我々は白血病細胞における MPO 発現が化学療法剤感受性を上昇させているとの作業仮説を立て、MPO 発現の有無による化学療法剤感受性の違いを検討した。

### 対象と方法

- 1) MPO 陰性の骨髄性白血病細胞株 K562 に、電気穿孔法を用いて MPO 遺伝子を導入し、抗癌剤 (シトシンアラビノシド, AraC) に対する感受性をコントロールベクター導入株および MPO 活性をもたない変異 MPO 導入株と比較した。
- 2) 抗がん剤によって引き起こされるアポトーシスとその際に合成される活性酸素の量が MPO 発現の有無によって差があるのかフローサイトメーターで調べた。また、MPO 阻害剤や抗酸化剤によって活性酸素合成が抑制されるか検討した。
- 3) MPO によって活性窒素が合成されることも報告されており、活性窒素が生じた際に認められるニトロ化を受けた蛋白質 (ニトロチロシン) が AraC 処理後に存在するかウエスタンブロット法で確認した。

4) AML 患者検体を用いて、AraC 存在下での (1) コロニー形成能の低下率 (2) 白血病細胞内の活性酸素の合成、(3) ニトロチロシン合成と MPO 発現レベルとを比較した。

## 結 果

- 1) 野生型 MPO 遺伝子を導入した K562 細胞株 (MP021)、非活性型 MPO を発現する細胞株 (R569W2) 並びにコントロール細胞株 (MOCK) を樹立。通常培養条件下では MOCK, MP021, R569W2 の増殖に差はなかったが AraC 処理にて MP021 は他の二者より早期に死滅した。
- 2) アポトーシスを Annexin V/PI、ミトコンドリア膜電位消失 (JC-1) を利用して評価したところ、AraC 処理後 MP021 で有意にアポトーシス細胞が増加した。
- 3) MP021 では AraC 処理により細胞内活性酸素がより多く合成され、活性酸素の供与体として酸化剤 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を加えるとその反応が増強された。活性酸素合成は MPO 阻害剤、抗酸化剤 NAC によって抑制された。
- 4) MP021 では AraC 処理により細胞内蛋白質のニトロ化反応が強く認められた。
- 5) AraC 存在下での AML 患者検体のコロニー形成能は MPO 高発現のものほど抑制される傾向にあった。
- 6) AraC 処理後の AML 患者検体の活性酸素合成およびニトロチロシン合成は MPO 高発現のものほど強い反応を示した。

## 考 察

MPO は白血病細胞内において、AraC による活性酸素合成を増強し、加えて細胞内蛋白質のニトロ化反応を増強することよりアポトーシス誘導を促進していると思われた。AraC による活性酸素合成は MPO 特異的阻害剤で抑制されたこと、活性欠損型の変異 MPO 発現株では上昇がみられなかったことから MPO と活性酸素合成の直接的な相関が考えられ、白血病細胞における MPO 活性が化学療法剤感受性を上昇させている可能性が示唆された。

AML 患者検体の AraC 存在下でのコロニー形成能は、MPO 高発現の白血病細胞ほど低い傾向にあった。しかし AraC 非存在下であっても MPO 高発現のものはコロニー数が少なかった。K562 においては MPO の有無によって増殖能に変化なく MPO は細胞増殖に影響しなかったが、MPO 高発現の AML には低発現例と異なる特性を有している可能性がある。今後、AML 細胞、とくに AML 幹細胞分画における MPO 発現調節機構の解明が必要である。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。