

## HO3-1

E2A-HLFによる survivin の高発現誘導が t(17;19)+ALLs 細胞の生存に不可欠である

奥谷 真由子<sup>1)</sup>、黒澤 秀光<sup>1)</sup>、松永 貴之<sup>1)</sup>、稲葉 俊哉<sup>2)</sup>、松井 啓隆<sup>2)</sup>、古川 雄祐<sup>3)</sup>、犬飼 岳史<sup>4)</sup>、江口 光興<sup>1)</sup>

獨協医科大学 小児科<sup>1)</sup>、広島大学原医研分子細胞遺伝<sup>2)</sup>、自治医科大学幹細胞制御<sup>3)</sup>、山梨大学小児科<sup>4)</sup>

t(17;19)急性リンパ性白血病 (t(17;19)+ALLs) は小児 ALL の約 1% を占め、骨髄移植を実施しても救命できないきわめて予後不良な ALL である。この転座で生じた E2A-HLF キメラ蛋白がアポトーシスを抑制することが白血化の原因である。survivin は Inhibitor of apoptosis protein (IAPs) ファミリーに属し、M 期特異的に発現し、caspase の活性化を抑制してアポトーシスを阻害する。悪性腫瘍で高発現し、生存期間の短縮・再発率の上昇など予後不良因子である。survivin が E2A-HLF の下流遺伝子であることを見出したので報告する。【結果】 t(17;19)+ALLs 細胞株では、他の ALL 細胞株に比して survivin が高発現し、細胞周期非依存的に発現していた。t(17;19)+ALLs 細胞株に E2A-HLF を強発現すると survivin が誘導され、t(17;19)+ALLs 細胞株に E2A-HLF dominant negative (dn) を強制発現すると逆に抑制された。さらに E2A-HLF は survivin のプロモーター領域に対して転写活性を上げた。以上より E2A-HLF は survivin を全細胞周期にわたり発現を誘導していると考えられた。さらに t(17;19)+ALLs 細胞株に survivin (dn) (34T → A) を強制発現させると全細胞周期でアポトーシスが生じた。一方 t(17;19)-ALLs 細胞株に survivin (dn) を強制発現しても全くアポトーシスが生じないか、M 期にのみアポトーシスが生じる状況で、survivin (dn) 誘導によるアポトーシスは t(17;19)+ALLs 細胞特異的であると考えられた。この survivin (dn) は caspase 3/7, 9 の活性化と caspase 非依存性アポトーシス因子 AIF のミトコンドリアから核内への移行を介してアポトーシスを誘導していた。【結論】 t(17;19)+ALLs において、E2A-HLF が下流遺伝子である survivin を発現誘導することが細胞の生存に不可欠である。したがって、今後導入される antisense などの survivin の標的治療が予後不良な t(17;19)+ALLs の治療に有効である可能性が期待できる。

## HO3-2

Flt-3 inhibitor PKC412 は 11q23 転座型白血病細胞株においてアポトーシスと細胞周期停止を誘導する

高橋 和也、合井 久美子、佐藤 広樹、本名 浩子、赤羽 弘資、黒田 格、犬飼 岳史、杉田 完爾、中澤 眞平

山梨大学 小児科

【目的】 11q23 転座型急性リンパ性白血病 (ALL) で、*Flt-3* 遺伝子の増幅と変異が報告されたが、今回 *Flt-3* inhibitor の 1 つである PKC412 を添加し、増殖抑制、アポトーシス及び細胞周期への影響とその機序について解析した。【方法】 B-precursor ALL 16 株 (11q23 転座型は 8 株で 1 株 KOCL33 は *Flt-3* の第 2 キナーゼドメイン内 D835 mutation (+)、Ph1 陽性が 3 株、その他が 5 株) と D835 point mutation (+) の 11q23 転座型 myelomonocytoid 1 株 (KOCL48) を解析に用いた。real-time RT-PCR 法で *Flt-3* mRNA level を測定した後、PKC412 100 ~ 400nM 添加前後で以下の項目につき検討を行なった。1) <sup>3</sup>H-thymidine uptake 法による DNA 合成能 2) Annexin V/PI 二重染色法によるアポトーシス細胞の比率 3) BrdU/PI 二重染色法による細胞周期解析 4) Western blot 法によるシグナル伝達・アポトーシス・細胞周期関連蛋白の発現解析【結果】 *Flt-3* mRNA level は 11q23 転座型細胞株で優位に高かった。KOCL33 と KOCL48 では、構成的に STAT5、Akt、MAPK が強くリン酸化されていたが、PKC412 添加後これらの蛋白の脱リン酸化が認められた。PKC412 添加後の <sup>3</sup>H-thymidine の取込みは、特に 11q23 転座型で低下し、D835 mutation を有する KOCL33 と KOCL48 では著しく低下した。PKC412 添加後のアポトーシスの解析では、11q23 転座型細胞株で、経時的、用量依存性にアポトーシス細胞の増加を認め、pan-caspase inhibitor である zVAD-FMK でアポトーシスが抑制された。さらに、KOCL33、KOCL48 では G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期で細胞周期停止が誘導された。PKC412 添加後に、KOCL33、KOCL48 とともに、proapoptotic Bcl-2 ファミリーである Bim の発現増加、Bim の転写促進因子である FoxO3a (FKHRL1) の活性化 (脱リン酸化) が認められ、また、CDK2、cyclin D<sub>3</sub>、cyclin E の発現低下が認められた。【考察】 PKC412 は 11q23 転座型白血病細胞株にアポトーシスと細胞周期停止を誘導し、この作用は D835 mutation (+) の株で顕著であった。アポトーシスの機序は FKHRL1-Bim の経路を介したミトコンドリア依存性の caspase 活性化が、細胞周期停止の機序は CDK2、cyclins の発現低下が関与していると考えられる。