

食品機能性成分ブテインの 抗成人T細胞白血病効果と作用機序の解明

石川 千恵

琉球大学亜熱帯島嶼科学超域研究推進機構 助教

緒 言

成人T細胞白血病(ATL)は発がんウイルスであるヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)によって引き起こされる予後不良の疾患である。HTLV-1は主に乳児期に母乳を介して感染する。生体内での宿主細胞は免疫担当細胞であるCD4陽性Tリンパ球であり、HTLV-1はプロウイルスとして自身のゲノムを宿主ゲノム内に組み込む。このためいったん感染が成立すると排除されることはなく、生涯宿主細胞とともに存続する。感染後約20~80年の潜伏期間を経て一部の感染者(2~10%)がATLを発症する¹⁾。

HTLV-1感染者は全世界に約2,000万人いると推定されている。感染者の割合は地理的偏りがあり、日本、カリブ海諸島、中央アフリカなどが高浸淫地域である。その中で日本は唯一の先進国である。日本では108万人の感染者がいるとされる。これまで九州・沖縄が感染者の多い地域とされていたが、最近の研究では人口移動に伴い大都市部でも感染者の増加が明らかになっている。日本では年間約1,200人がATLを発症しており、今後も感染者からのATL発症が予想されることから、その発症予防薬・治療薬の開発は急務である²⁾。

ATL細胞では細胞内生存シグナルの異常な活性化があり、これまで筆者はそれらの解析に基づいたATL治療法の開発に努めてきた。食品機能性成分ブテインはカルコン構造を持つ黄色色素であり、細胞内シグナルであるNF- κ B、STAT3、JNK等を標的とした抗がん・抗炎症作用が報告されている³⁾。ブテインのこれらの作用はATL細胞に対しても有用であると考えられた。そこで、本研究では試験管内実験および動物実験によりブテインの抗ATL効果を検証した。

実験方法

1. 細胞生存率の解析

ブテインの細胞生存率に対する影響について、

HTLV-1感染T細胞株(MT-4、HUT-102)、ATL由来細胞株(TL-OmI)および健康人末梢血単核球(PBMC)を用いて検討した。細胞生存率の解析は発色基質である水溶性テトラゾリウム塩を利用した生細胞数測定法であるWST-8法で行った。

2. 細胞周期の解析

ブテインの細胞周期に与える影響を検討した。細胞周期の解析はヨウ化プロピジウム(PI)で核を染色後にフローサイトメトリーで行った。また、細胞周期関連タンパク質の発現についてウエスタンブロット法で検討した。

3. アポトーシスの解析

ブテインによるアポトーシス誘導に関して検討した。アポトーシスの検出はアポトーシス早期にミトコンドリア膜上に出現するAPO27抗原に対する蛍光標識抗体を用いて行い、これをフローサイトメトリーで解析した。核をHoechst33342で染色し、アポトーシスによる核の形態変化を顕微鏡で観察した。さらに、アポトーシス誘導について、カスパーゼ分子の切断をウエスタンブロット法で検討した。カスパーゼ活性は、*p*-ニトロアニリドで標識したカスパーゼに最適な切断配列を持つ合成ペプチドを基質として、放出された*p*-ニトロアニリドを分光光度計で測定した。カスパーゼ依存性は全カスパーゼ阻害剤(Z-VAD-FMK)を用いて検討した。またアポトーシス関連タンパク質の発現についてもウエスタンブロット法で検討した。

4. シグナル伝達経路の解析

ATL腫瘍細胞で重要な細胞内シグナル経路NF- κ B、AP-1、Aktについて、ブテインによる影響を検討した。転写因子であるNF- κ BおよびAP-1については、DNA結合能をゲルシフトアッセイにて検討し、関連タンパク

質の発現やリン酸化についてウエスタンブロット法で検討した。Aktの発現やリン酸化についてもウエスタンブロット法で検討した。

5. 動物モデルでの検討

SCIDマウス（5週齢のメス）の頭部にHTLV-1感染T細胞株HUT-102を皮下移植し、ATLモデルマウスを作成した。ブテインは大豆油に懸濁し、一匹あたり0.7 mgを週3回、腹腔内に投与した（投与群6匹）。対照群（6匹）には溶媒のみを投与した。細胞移植翌日よりブテインを投与し、1週ごとに体重および腫瘍体積を計測した。移植4週後に腫瘍重量を比較した。ATLのサロゲートマーカーである血清可溶性IL-2受容体 α 鎖（CD25）および可溶性CD30の値をELISAで測定し、対照群と投与群とで比較検討した。また、摘出した腫瘍組織にHE染色やTUNEL染色を行い、組織内アポトーシス細胞を観察した。

結 果

1. 細胞生存率の解析

ブテインはMT-4、HUT-102、TL-OmI細胞株の生存率を時間依存性・濃度依存性に低下させた（図1）。これらの細胞株において、ブテイン添加72時間の時点での50%阻害濃度（IC50）は7.0~9.8 μ Mであった。一方で健常人PBMCでのIC50は27.8 μ M、PHA刺激活性化PBMCで18.5 μ Mであり、ブテインは健常人PBMCと比較してHTLV-1感染T細胞株に対してより低い濃度で殺細胞効果を示した。

2. 細胞周期の解析

MT-4およびHUT-102細胞株において、ブテインを

作用させるとG1期の細胞の割合が増加し、S期の細胞の割合が減少した。すなわち、ブテインはこれらの細胞株に濃度依存性のG1期での細胞周期停止をもたらした。また、アポトーシス細胞と示唆されるサブG1期の集団の増加もブテインの濃度依存性に認められた（図2）。細胞周期関連タンパク質では、ブテインによりG1期からS期への進行に関わる分子であるCDK4、CDK6、cyclin Eの発現量が濃度依存性に低下していた。

3. アポトーシスの解析

ブテインはMT-4、HUT-102、TL-OmI細胞株において時間依存性・濃度依存性にアポトーシス誘導をもたらした。核染色後に顕微鏡で観察したところ、アポトーシス細胞にみられるクロマチンの凝集化や核の断片化を認めた。MT-4においてブテインを作用させることで、カスパーゼ-3、-8、-9の活性化が認められ、全カスパーゼ阻害剤を前処理することでブテインによる細胞生存率低下が抑制された。ウエスタンブロット法による検討では、MT-4、HUT-102細胞株において、ブテインを作用させることでカスパーゼ-3、-8、-9の切断およびカスパーゼ-3の基質であるPARPの切断が濃度依存性に認められた。また、抗アポトーシスタンパク質であるsurvivinおよびXIAPの発現低下も濃度依存性に認められた。

4. シグナル伝達経路の解析

CDK4、CDK6、cyclin E、survivin、XIAPの発現はNF- κ Bにより制御されている。そこで、MT-4、HUT-102細胞株においてNF- κ BのDNA結合能をゲルシフトアッセイにて検討した。ブテインにより、これらのDNA結合能は濃度依存性に低下していた。なお、抗体によるバンドのシフトから、結合しているNF- κ Bは

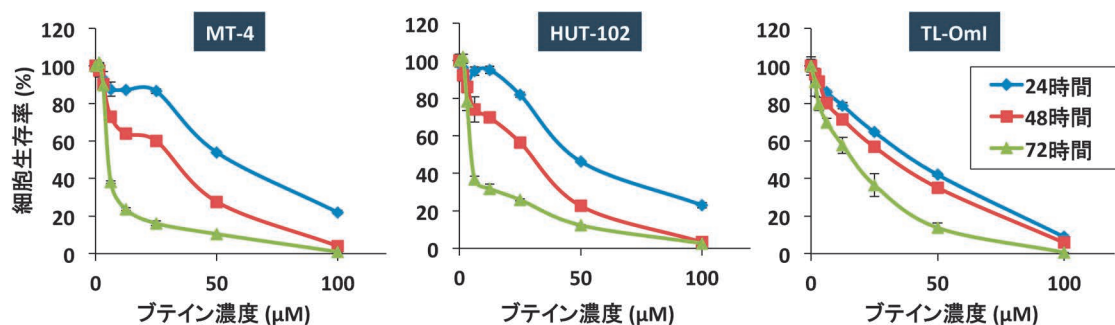


図1 ブテインによる殺細胞効果

HTLV-1感染T細胞株（MT-4、HUT-102）およびATL由来細胞株（TL-OmI）の細胞生存率に対するブテインの影響をWST-8法で検討した。

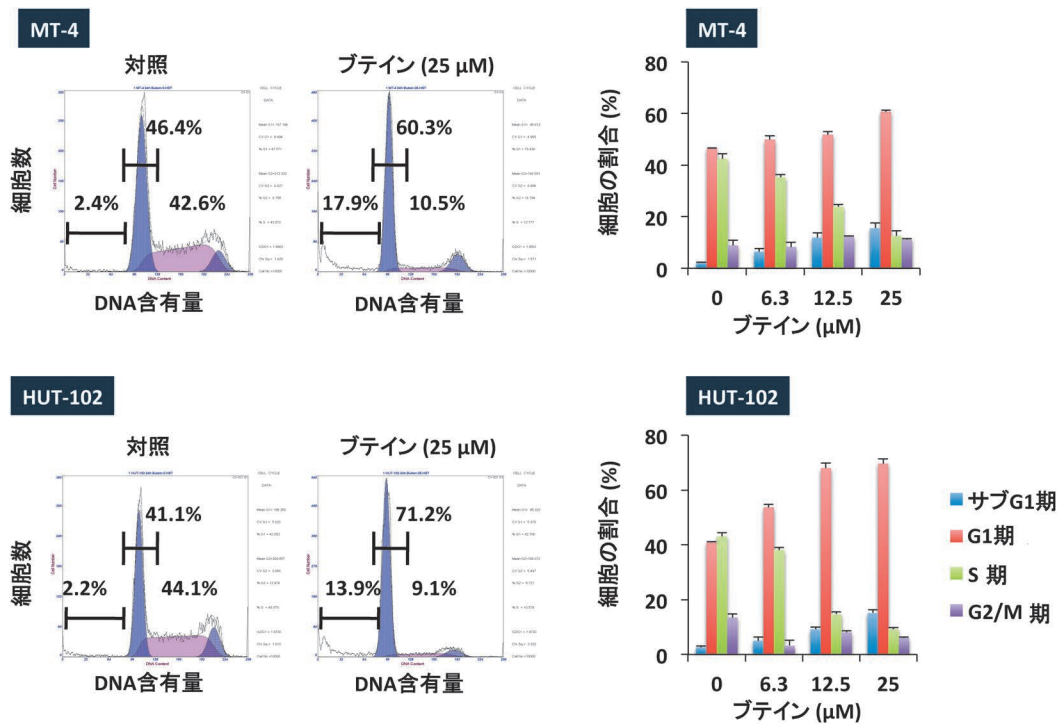


図2 ブテインによる細胞周期の停止

ブテインの細胞周期に与える影響を検討した。ヨウ化プロピジウム (PI) で核を染色後にフローサイトメトリーで解析した。

p50、p65およびRelBであった。ウエスタンブロット法による検討から、NF-κB阻害タンパク質であるIκBαおよびIκBキナーゼであるIKKα/βのリン酸化がブテインにより減少しており、ブテインがHTLV-1感染T細胞株のNF-κBシグナルをIKKα/βの脱リン酸化により阻害することが示された。AP-1も細胞増殖や細胞生存に重要な転写因子であるが、AP-1シグナルについても、同様にDNA結合能の低下を認め、構成分子であるJunBおよびJunDの発現量がブテインにより低下していた。AktはNF-κBの活性化やXIAPの分解抑制に関与しているが、Aktシグナルに関して、ブテインは低濃度ではリン酸化の抑制を、また高濃度ではタンパク質発現量の低下をもたらした。以上の結果より、ブテインはNF-κB、AP-1およびAktシグナルを同時に阻害し、細胞周期促進タンパク質や細胞死阻害タンパク質の発現を抑制することが示された。

5. 動物モデルでの検討

ブテイン投与群では細胞移植14日以降の腫瘍体積において、対照群と比較して有意に増殖が抑制されていた。移植28日後での腫瘍重量も投与群では対照群と比較して有意に小さかった ($p < 0.01$) (図3)。また血清中

の可溶性CD25濃度 (対照群8,022 pg/mL、投与群4,642 pg/mL、 $p < 0.05$) および可溶性CD30濃度 (対照群2,800 pg/mL、投与群1,159 pg/mL、 $p < 0.01$) も対照群と比較して投与群では有意に低かった。ブテイン投与群の摘出腫瘍組織では、HE染色でクロマチンの凝集化や核の断片化が顕著であり、TUNEL陽性細胞が増加していた。なお、実験期間内の体重変化について両群に差はなく、目立った副作用もみられなかった。

考 察

食品機能性成分ブテインはHTLV-1感染T細胞株およびATL由来細胞株の細胞生存率を低下させた。その効果はG1期での細胞周期の停止およびカスパーゼ依存性アポトーシス誘導によるものであった。細胞周期関連分子やアポトーシス関連分子の発現や活性は、細胞生存シグナルNF-κB、AP-1、Aktによる制御を受けており、これらのシグナル伝達経路を阻害することで、ブテインは抗ATL効果を発揮するものと考えられた。ATL細胞においては、これらのシグナル伝達経路が異常活性化状態にあり、ブテインの細胞生存率への影響において、健康人PBMCとの差異は上記の作用によるものと言える。また、動物実験の結果から生体への副作用を生じない投

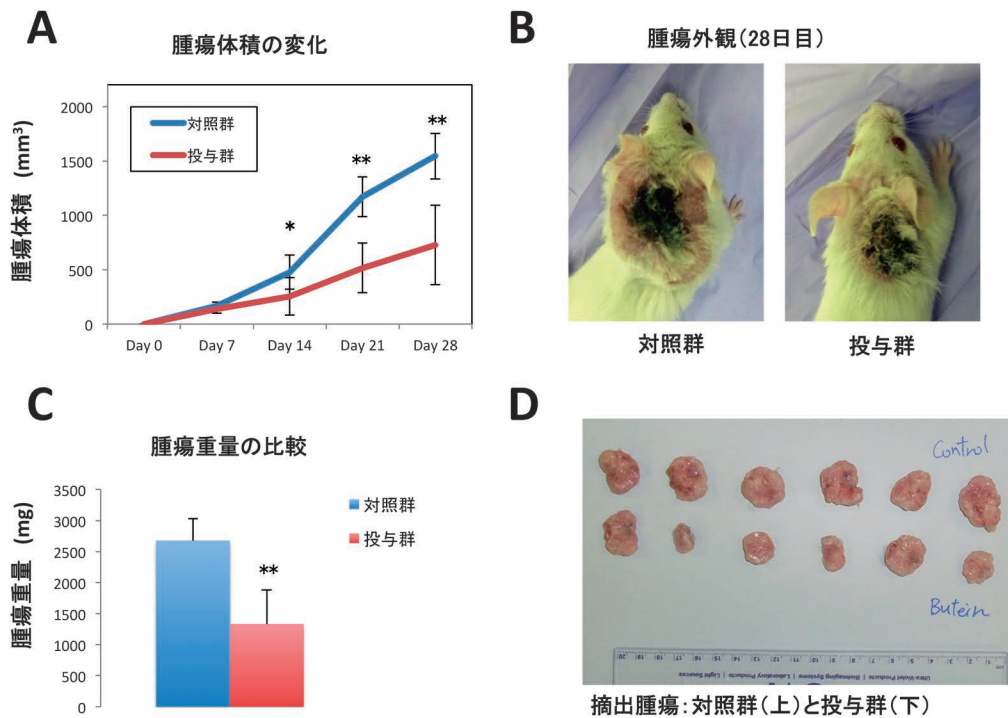


図3 動物実験におけるブテインの抗ATL効果

ATLモデルマウスにおける対照群とブテイン投与群の腫瘍体積の変化 (A) と移植後28日目の外観 (B)。移植後28日目の腫瘍重量 (C) および摘出腫瘍 (D)。n=6。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 。

与量での腫瘍抑制効果を得られることが示唆された。単一の細胞生存シグナルの阻害に比べて、複数の生存シグナルを同時に阻害すると、より強い抗腫瘍効果が生み出され、副作用が軽減されることが知られており、ブテインが3つのシグナル伝達経路を阻害する事実は、既知のシグナル伝達阻害剤に比べて優位性を有する可能性も期待される。

ATLに対する標準的治療法ははまだ確立していない。本研究ではブテインによる抗ATL効果およびその作用機序を明らかにしており、ATLの新規治療候補薬としてのブテインの可能性が示された。また、ATL発症にはウイルス感染から長い潜伏期間を経るため、長期間にわたって安全に摂取できる食品由来成分は発症予防薬としての利用が期待され、ブテインはその点でも有用な成分であると考えられた。

要約

食品機能性成分ブテインはATL細胞の特異的生存シグナルを抑制することで、細胞周期の停止、アポトーシス誘導を引き起こし、腫瘍細胞の生存を阻止する。本研究からブテインはATLに対する治療薬、発症予防薬として有望であることが示唆された。

謝辞

本研究は平成26年度学術研究奨励金により遂行されました。ご支援賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の方々に深謝いたします。

文献

- 1) R. Mahieux, A. Gessain: *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, **2**, 257-264, 2007.
- 2) T. Watanabe: *Int. J. Hematol.*, **94**, 430-434, 2011.
- 3) V. R. Yadav, et al.: *Int. Immunopharmacol.*, **11**, 295-309, 2011.