



# MLL遺伝子再構成陽性ヒトBリンパ性白血病細胞株におけるバルプロ酸によるアポトーシスの誘導

川越, 里佳

---

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(1/2):25-31

(Issue Date)

2001-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00097795>



# MLL 遺伝子再構成陽性ヒトBリンパ性白血病細胞株における バルプロ酸によるアポトーシスの誘導

川 越 里 佳

神戸大学医学部小児科学講座(内線 6090)

連絡先: 川 越 里 佳  
神戸大学医学部小児科学講座  
神戸市中央区楠町7-5-2

TEL: (078)382-6090, FAX: (078)382-6099

(平成13年4月10日受付)

## 【要 約】

ある種の短鎖脂肪酸は、様々な腫瘍細胞に分化やアポトーシスを誘導する事が知られている。バルプロ酸は短鎖脂肪酸の一種であり、抗癌薬として広く臨床応用されている。

MLL遺伝子再構成は乳児白血病および二次性白血病に多くみられる遺伝子異常であるが、この異常を持つ白血病は多剤併用化学療法が進歩した現在でも予後不良である。今回、MLL遺伝子再構成を有するヒトBリンパ性白血病細胞株の生存に対するバルプロ酸の作用を検討した。

バルプロ酸は今回の実験に用いた3種類のMLL遺伝子再構成陽性ヒトBリンパ性白血病細胞株すべての生細胞率を濃度依存性に低下させた。特にそのうち2つの細胞株では、抗癌薬としての治療閾値内の濃度で高率に生細胞率の低下が認められた。この細胞死はプレドニゾン耐性細胞株に対しても誘導され、バルプロ酸はプレドニゾンとは異なる機序で作用するものと考えられた。

バルプロ酸処理による形態変化の観察では、細胞の縮小とクロマチンの濃縮が認められた。またアガロースゲル電気泳動によりDNAの断片化が証明された。アネキシンVで染色した細胞のフローサイトメトリーによる解析では、バルプロ酸処理によりフォスファチジルセリンが細胞膜表面へ表出されることが明らかとなった。以上の所見よりバルプロ酸がこれらのヒトBリンパ性白血病細胞株にアポトーシスを誘導する事が明らかとなった。バルプロ酸は副作用の少ない抗白血病治療薬として応用できる可能性がある。

## 【緒 言】

近年、多剤併用化学療法の進歩により小児急性白血病の長期生存率は飛躍的に向上した。しかしその一方で、乳児白血病および長期生存率が向上した事により新たに問題となってきた二次性白血病の治癒率は満足すべきものとは言えない。ことに造血幹細胞移植のドナーが得られない症例においてはその予後は悪く、新しい治療法の開発が望まれる。これらの白血病では11番染色体長腕23領域に切断部位を有する染色体相互転座が認められる事が多く<sup>1-7</sup>、同部位にコードされているMixed Lineage Leukemia(MLL) 蛋白の異常が白血病化に関与していると考えられている。乳児白血病のうちMLL遺伝子再構成をもつBリンパ性急性白血病はその他のものに比べて予後が悪い<sup>8,9</sup>。また、小児の急性リンパ性白血病ではその初期治療におけるステロイド感受性と予後に相関があることが知られており<sup>10-12</sup>、ステロイド低抗性のMLL遺伝子再構成陽性白血病は特に予後不良である。

ある種の短鎖脂肪酸は各種の腫瘍細胞に分化を誘導したりアポトーシスに導いたりする事が知られている<sup>13-17</sup>。しかしこれらの多くは生体内での半減期が短く、この事が臨床応用にあたっての問題となっている。バルプロ酸は短鎖脂肪酸の一種であるが、その血中半減期が長く、また、抗癌薬として長年臨床応用されており、長期連用が可能で副作用も極めて少ない。バルプロ酸の腫瘍に対する効果としては、マウスを用いた実験において神経芽細胞腫の発育を抑制したとの報告がなされている<sup>18,19</sup>。また、マウス白血病細胞株の増殖を抑制したとの報告<sup>20</sup>、ヒト前骨髄性白血病細胞株に分化を誘導したとの報告もある<sup>21</sup>。

キーワード: バルプロ酸, MLL遺伝子再構成, Bリンパ性白血病, アポトーシス

今回、MLL遺伝子再構成をもつヒトBリンパ性急性白血病細胞株の生存に対するバルプロ酸およびステロイドの作用と、バルプロ酸による生細胞率低下の機序について検討したので報告する。

## 【方 法】

### 1. 白血病細胞株の培養

今回の実験ではMLL遺伝子再構成を有する3種類のヒトBリンパ性急性白血病細胞株MV411, RS411, KOCL44を用いた(表1)。細胞は10%仔ウシ血清(FBS)をふくむRPMI1640 mediumを用いて浮遊培養した。実験に応じて各種濃度のバルプロ酸およびプレドニゾロンを培養液に添加した。

### 2. 細胞死の評価

各種濃度のバルプロ酸およびプレドニゾロンを加えた培養液で各々の細胞株  $1 \times 10^5 / \text{ml}$  を5日間培養したのち、トリパンブルー細胞分染法を用いて生細胞率を評価した。生細胞率は3回の独立した実験の平均値をもとめ、薬剤無添加コントロールの生細胞率に対する相対値で表した。

### 3. バルプロ酸による細胞形態変化の観察

培養液にバルプロ酸を  $200 \mu\text{g} / \text{ml}$  となるように添加しMV411細胞株を3日間培養した後、位相差顕微鏡(オリンパス, 東京)にてその形態変化を直接観察した。

### 4. バルプロ酸による核形態変化の観察

MV411細胞株をバルプロ酸  $200 \mu\text{g} / \text{ml}$  を含む培養液で0, 24, 48時間培養したのち、1%パラホルムアルデヒドで固定、燐酸緩衝液で洗浄しHoechst 33258で染色した。蛍光顕微鏡(Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて染色した細胞の核形態の変化を観察し、変化の見られた細胞の割合を計測した。実験は独立に3回行い、その平均値を求めた。

### 5. フォスファチジルセリンの細胞表面への転移の検出

アポトーシスにおける細胞膜の変化であるフォスファチジルセリンの細胞表面への転移をFITC標識アネキ

シンVを用いて検出した<sup>22</sup>。MV411細胞株をバルプロ酸  $200 \mu\text{g} / \text{ml}$  を含む培養液で24時間培養したのち、燐酸緩衝液で洗浄、binding buffer (Immunotech, Marseille, France)に浮遊した。FITC標識アネキシンVにて染色し、直ちにフローサイトメータ(Epics Elite, Beckman Coulter, Marseille, France)を用いて解析し、アネキシンV陽性となった細胞の割合を調べた。実験は独立に3回行い、その平均値を求めた。

### 6. 断片化DNAの検出

アポトーシスの指標であるDNA断片化の検出を行った。MV411細胞株をバルプロ酸  $200 \mu\text{g} / \text{ml}$  を含む培養液で72時間培養した。ProteinaseK, RNaseA, ドデシル硫酸ナトリウムを用いて細胞を処理し、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを含むヨウ化ナトリウム溶液を加えたのち、イソプロパノールにてDNAを抽出した。2%アガロースゲル上で電気泳動、エチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーターを用いて観察した。

## 【結 果】

### 1. バルプロ酸による細胞死の誘導

各種濃度のバルプロ酸およびプレドニゾロンを添加した培養液で5日間培養し、各々の細胞株の生細胞率をトリパンブルー分染法で評価した。図1に示すようにすべての細胞株で濃度依存性に生細胞率の低下が観察された。特にMV411およびKOCL44は抗癌薬としての治療濃度内( $50-150 \mu\text{g} / \text{ml}$ )でほとんどの細胞が死滅した。一方、プレドニゾロン添加ではRS411細胞は  $0.1 \mu\text{M}$  の濃度で100%に細胞死が観察されたのに対し、MV411およびKOCL44細胞の生細胞率には全く影響がみられなかった。

### 2. バルプロ酸による細胞の変化

上記実験によりバルプロ酸がこれらBリンパ性白血病細胞株に生細胞率の低下を誘導する事が明らかにされた。細胞死には能動的細胞死であるアポトーシスと

表1 細胞株の特徴

細胞株	染色体転座	MLL再構成	表面マーカー
MV411	t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	CD4+ CD10+ CD15+
RS411	t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	HLA-DR+ CD9+ CD24+
KOCL44	t(11;19)(q23;p13)	MLL-ENL	HLA-DR+ CD19+ CD22+ CD56+

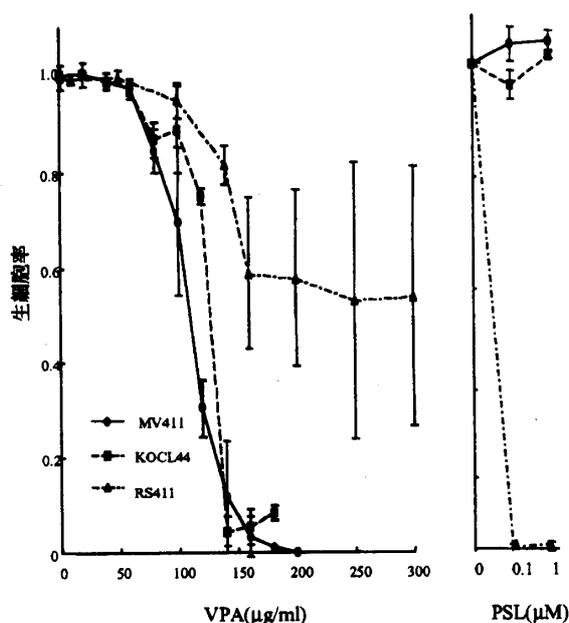


図1. バルプロ酸およびプレドニゾロンの ヒトBリンパ性白血病細胞株の生存率に対する影響

バルプロ酸およびプレドニゾロンによる細胞死をトリパンブルー細胞分染法を用いて検討した。各々の細胞 $1 \times 10^5$ /mlを各種濃度のバルプロ酸 (VPA) またはプレドニゾロン (PSL) を加えた培養液で5日間培養し、トリパンブルー染色により生細胞率を算出した。実験は独立に3回行い、その平均値を求めた。グラフには各濃度における生細胞率の薬剤無添加コントロールに対する相対値を表した。バルプロ酸添加により濃度依存性に細胞死が誘導された。この細胞死とプレドニゾロン感受性との間に相関は見られなかった。

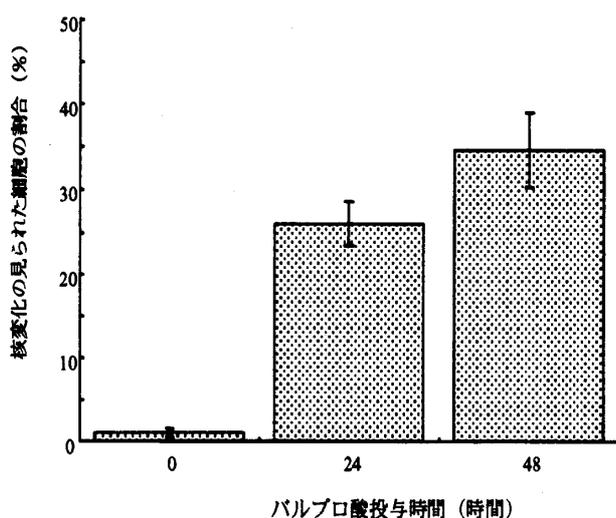


図3. 核の縮小およびクロマチン濃縮のみられた細胞の割合

MV411細胞をバルプロ酸 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培養液で0, 24, 48時間培養した後、ヘキスト33258で染色し、核変化のみられる細胞の割合を算出した。実験は独立に3回行いその平均値をグラフに示した。バルプロ酸投与により核の変化が誘導された。

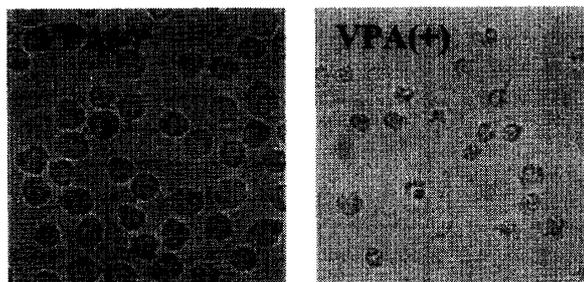


図2. ヒトBリンパ性白血病細胞株MV411のバルプロ酸による形態変化

バルプロ酸 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培養液 (VPA+) およびバルプロ酸無添加の培養液 (VPA-) でMV411細胞を72時間培養した後、位相差顕微鏡で形態変化を観察した。バルプロ酸添加により細胞の縮小が見られた。

受動的細胞死であるネクロシスがあることが知られている<sup>23</sup>。そこで、次にこのバルプロ酸による細胞死がそのどちらであるのかを、バルプロ酸に最も感受性の高かったMV411細胞株を用いて検討した。

まず、バルプロ酸による細胞の形態変化を観察した。バルプロ酸 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培養液でMV411細胞を72時間培養した後、位相差顕微鏡でその形態変化を観察した。図2に示すように、バルプロ酸を加えた細胞は無添加の対照に比べ明らかに縮小した細胞が多数認められた。一般にアポトーシスにおいては、細胞は縮小した後アポトーシス小体と呼ばれる断片に分断されるのに対しネクロシスでは細胞は膨化する。このことより、バルプロ酸により誘導される細胞死はアポトーシスである可能性が高いと考えられた。

次に、Hoechst33258を用いて核を染色し、その形態変化を観察した。バルプロ酸 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて24および48時間培養すると、多くの細胞で核の縮小およびクロマチンの濃縮が認められた。一方バルプロ酸投与後0時間の対照細胞ではこのような変化は認められなかった。核に変化のみられた細胞の割合は、バルプロ酸投与後0, 24, 48時間では各々 $1.0 \pm 0.5\%$ ,  $26.0 \pm 2.6\%$ ,  $34.7 \pm 4.4\%$ であった (図3)。核の縮小およびクロマチンの濃縮はアポトーシスに特徴的な核変化であり、バルプロ酸による細胞死はアポトーシスであると考えられた。

生体組織内でのアポトーシスにおいては、死細胞は周辺の貪食細胞によって速やかに処理される。この際、貪食細胞はアポトーシス細胞の細胞膜表面に表出されるフォスファチジルセリンによって標的細胞を認識する。フォスファチジルセリンの細胞表面への表出はアポトーシスの比較的早期に現れる膜変化であることが知られている。この変化が、バルプロ酸による細胞死においても認められるかどうかをフローサイトメトリー

を用いて検討した。図4に示すように無処理の細胞ではフォスファチジルセリン陽性の細胞は17.9±11.9%であったが、バルプロ酸200 μg/mlを加えて24時間培養することによりその値は62.1±18.5%と明らかに上昇した。

最後にアポトーシスの指標であるDNAの断片化について検討した。無処理の細胞とバルプロ酸処理後(200 μg/ml, 72時間)の細胞各1 x10<sup>6</sup>個からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動を行なった(図5)。

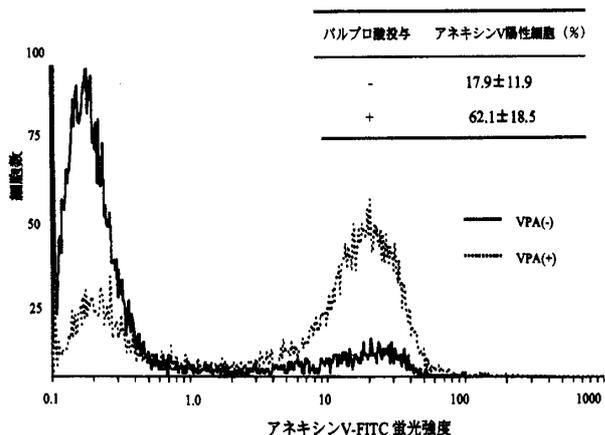


図4. フローサイトメトリーを用いた細胞膜上へのフォスファチジルセリン表出の検討

FITC標識アネキシンVを用いて細胞を染色し、フォスファチジルセリンを細胞表面へ表出している細胞の割合をフローサイトメーターを用いて測定した。無処理のMV411細胞とバルプロ酸200 μg/mlを含む培養液で24時間培養したMV411細胞を比較した。実験は3回行い、表にはその平均値を示した。バルプロ酸投与によりフォスファチジルセリンを細胞膜表面に表出している細胞の割合が上昇した。

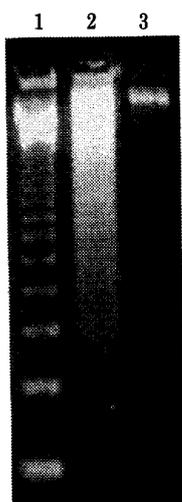


図5. DNA断片化の検出

バルプロ酸200 μg/mlを含む培養液で72時間培養した細胞と無処理のコントロール細胞各々1x10<sup>6</sup>個からDNAを抽出しアガロースゲル電気泳動を行なった。バルプロ酸処理した細胞でDNAの断片化がみられた。lanel:123bp ラダーマーカー, 2:バルプロ酸(+), 3:バルプロ酸(-)

無処理の細胞から抽出されたDNAには断片化は見られなかったが、バルプロ酸処理した細胞のDNAでは断片化が認められた。

以上の実験結果より、バルプロ酸はMLL遺伝子再構成陽性ヒトBリンパ性白血病細胞株、MV411をアポトーシスに導くことが示唆された。

### 【考 察】

短鎖脂肪酸のあるものは腫瘍細胞に分化や細胞死をもたらす事がin vitro実験にて証明されている<sup>13-16</sup>。短鎖脂肪酸の一種であるバルプロ酸は抗癌薬として長年臨床応用されている。その血中半減期は9-16時間と長く<sup>24</sup>、連用により有効血中濃度を長時間維持する事も可能である。副作用としては重症の肝障害が認められるが、その頻度は約1/20000ときわめて低い<sup>25</sup>。バルプロ酸の腫瘍細胞に対する抑制効果について報告されているが<sup>18-21</sup>、その機序については明らかにされていない。バルプロ酸が治療閾値を超える高濃度で正常血液幹細胞のコロニー形成を阻害するとの報告もあり<sup>26</sup>、造血系細胞に対する抑制作用を有する可能性も示唆されている。

今回の実験では、バルプロ酸が今回使用した3種類全てのMLL遺伝子再構成陽性ヒトBリンパ性白血病細胞株の生細胞率を濃度依存性に低下させる事が明らかとなった。その感受性は細胞株により差が見られたが、今回検討した3つのうち2つの細胞株では通常臨床で用いられる治療濃度内で高い生細胞率抑制効果が見られた。临床上、この濃度でバルプロ酸が正常造血を抑制することはない。このことは、これらの白血病細胞が正常血液幹細胞に比して強いバルプロ酸感受性を有する事を意味し、バルプロ酸を抗白血病薬として、あるいは自家造血幹細胞移植における白血病細胞除去に臨床応用できる可能性を示唆する。

今回の実験にはMLL遺伝子再構成を有するヒトBリンパ性白血病細胞株を用いた。この遺伝子異常を持つ乳児急性リンパ性白血病は、多剤併用療法の導入により小児急性白血病の予後が著しく改善した現在でもなお予後不良である<sup>8,9</sup>。初期ステロイド治療に抵抗性の症例では特に予後不良とする報告もある<sup>10-12</sup>。これらの白血病の予後を改善するためには新しい治療法の開発が必要である。その一方で、小児急性白血病の治療率の向上に伴い化学療法の影響による二次癌の発生が大きな問題となっており<sup>27-29</sup>、毒性のできるかぎり少ない新しい抗腫瘍剤の導入が望まれる。今回、バルプロ酸はステロイド耐性のMLL遺伝子再構成を有する急性リンパ性白血病細胞株、MV411に対して通常臨床で用いられる治療濃度内で高率にアポトーシスを導入する事

を明らかにした。バルプロ酸はステロイドとは異なった機序で細胞死を誘導すると考えられる。抗痙攣剤としての長期の使用経験からバルプロ酸の安全性は明らかにされており、バルプロ酸に感受性のある白血病に対する治療へ応用できる可能性がある。今後はバルプロ酸のin vivoでの抗白血病効果および、そのアポトーシス誘導機序についての検討が必要である。

## 【謝 辞】

研究を御指導いただきました小児科学講座の中村肇教授、およびKOCL44細胞株をご提供いただいた山梨大学医学部小児科学講座の中澤眞平教授、杉田完爾講師に深謝いたします。

## 【文 献】

- 1) Poel, S. Z., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., LeBeau, M. M., Rowley, J. D., Diaz, M. O.: Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 10735-10739, 1991
- 2) Cimano, G., Moir, D. T., Canaani, O., Williams, K., Crist, W. M., Katzav, S., Cannizzaro, L., Lange, B., Nowell, P. C., Croce, C. M., Canaani, E.: Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11) (q21;q23), and t(9;11) (p22;q23) chromosome translocations. *Cancer Res.* 51 : 6712-6714, 1991
- 3) Gu, Y., Nakamura, T., Alder, H., Prasad, R., Canaani, O., Cimino, G., Croce, C. M., Canaani, E.: The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemia fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene. *Cell* 71 : 701-708, 1992
- 4) Tkachuk, D. C., Kohler, S., Cleary, M. L.: Involvement of a homologue of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71 : 691-700, 1992
- 5) Bilndi, A., Cimino, G., Pieters, R., Pui, C. H.: Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 96 : 24-33, 2000
- 6) DiMartino, J. F., Cleary, M. L.: MLL rearrangements in haematological malignancies : lessons from clinical and biological studies. *Br. J. Haematol.* 106 : 614-626, 1999
- 7) Pui, C. H., Relling, M. V., Rivera, G. K.: Epipodophyllotoxin-related acute myeloid leukemia : a study of 35 cases. *Leukemia* 9 : 1990-1996, 1995
- 8) Pui, C. H., Behm, F. G., Downing, J. R., Hancock, M. L., Shurtleff, S. A., Ribeiro, R. C., Head, D. R., Mahmoud, H. H., Sandlund, J. T., Furman, W. L., Roberts, W. M., Crist, W. M., Raimondi, S. C.: 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin. Oncol.* 12 : 909-915, 1994
- 9) Heerema, N. A., Arthur, D. C., Sather, H., Albo, V., Feusner, J., Lange, B. J., Steinherz, P. G., Zelzer, P., Hammond, D., Reaman, G. H.: Cytogenetic features of infants less than 12 months of age at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia : impact of the 11q23 breakpoint on outcome : A report of the children's Cancer Group. *Blood* 83 : 2274-2284, 1994
- 10) Schrappe, M., Reiter, A., Riehm, H.: Cytoreduction and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 14 : 2403-2405, 1996
- 11) Reiter, A., Schrappe, M., Lundig, W. D., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, F., Havers, W., Niethammer, D., Odenwald, E., Ritter, J., Mann, G., Welte, K., Gadner, H., Riehm, H.: Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusion of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 84 : 3122-3133, 1994
- 12) Dordelmann, M., Reiter, A., Borkhardt, A., Ludwig, W. D., Gotz, N., Viehmann, S., Gadner, H., Riehm, H., Schrappe, M.: Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94 : 1209-1217, 1999
- 13) Bernhard, D., Ausserlechner, M. J., Tonko,

- M., Loffler, M., Hartmann, B. L., Csordas, A., Kofler, R.: Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB J.* 13 : 1991-2000, 1992
- 14) Samid, D., Yeh, A., Prasanna, P.: Induction of erythroid differentiation and fetal hemoglobin production in human leukemia cells treated with phenylacetate. *Blood* 80 : 1576-1581, 1992
- 15) Samid, D., Shack, S., Sharman, L. T.: Phenylacetate: A novel nontoxic inducer of tumor cell differentiation. *Cancer Res.* 52 : 1988-1992, 1992
- 16) Samid, D., Ram, Z., Hudgins, W. R., Shack, S., Liu, L., Walbridge, S., Oldfield, E. H., Myers, C. E.: Selective activity of phenylacetate against malignant gliomas: resemblance to fetal brain damage in phenylketoneuria. *Cancer Res.* 54 : 891-895, 1994
- 17) Thibault, A., Cooper, M. R., Figg, W. D., Venzon, D. J., Sartor, A. O., Tompkins, A. C., Weinberger, M. S., Headlee, D. J., McCall, N. A., Samid, D., Myers, C. E.: A phase I and pharmacokinetic study of intravenous phenylacetate in patients with cancer. *Cancer Res.* 54 : 1690-1694, 1994
- 18) Cinatl, J. Jr., Cinatl, J., Scholz, M.: Antitumor activity of sodium valproate in human neuroblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 7 : 766-773, 1996
- 19) Cinatl, J. Jr., Cinatl, J., Driever, P. H., Kotchetkov, R., Pouckova, P., Kornhuber, B., Schwabe, D.: Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 8 : 958-963, 1997
- 20) Tittle, T. V., Schaumann, B. A., Rainey, J. E., Taylor, K.: Segregation of the growth slowing effects of valproic acid from phenytoin and carbamazepine on lymphoid tumor cells. *Life Sci.* 50 : 79-83, 1992
- 21) Fischkoff, S. A., Walte, E. Jr.: Induction of neutrophilic differentiation of human promyelocytic leukemia cells by branched-chain carboxylic acid anticonvulsant drugs. *J. Biol. Res. Mod.* 3 : 132-137, 1984
- 22) Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. P. M.: A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J. Immunol. Methods* 180 : 39-52, 1995
- 23) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 : 239-257, 1972
- 24) Chapman, A., Keame, P. E., Meldrum, B. S., Simiand, J., Vernieres, J. C.: Mechanisms of anticonvulsant action of valproate. *Progr. Neurobiol.* 19 : 315-359, 1982
- 25) Davis, R., Peters, D. H., McTavish, D.: Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 47 : 332-372, 1994
- 26) Kishi, T., Fujita, N., Kawaguchi, H., Ishimae, M., Watanabe, K., Tanaka, T.: Bone marrow suppression induced by high dose valproic acid. *Arch. Dis. Child.* 71 : 153-155, 1994
- 27) Pui, C. H., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Dodge, R. K., George, S. L., Rivera, G. K., Mirror, J., Kalwinsky, D. K., Dahl, G. V., Murphy, S. B., Crist, W. M., Williams, D. L.: Second acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 321 : 136-142, 1989
- 28) Pui, C. H., Ribeiro, R. C., Hancock, M. L., Rivera, G. K., Evans, W. E., Raimondi, S. C., Head, D. R., Behm, F. G., Mahmoud, M. H., Sandlund, J. T., Crist, W. M.: Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 325 : 1682-1687, 1991
- 29) Neglia, J. P., Meadows, A. T., Robison, L. L., Kim, T. H., Newton, W. A., Ruymann, F. B., Sather, H. N., Hammond, G. D.: Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N. Engl. J. Med.* 325 : 1330-1336, 1991

# Valproic acid induces apoptosis in human B-lymphoid leukemia cell lines with MLL rearrangements

Rika Kawagoe

Department of Pediatrics, Kobe University School of Medicine

## ABSTRACT

Increasing evidence has shown that short chain fatty acids induce differentiation or apoptosis in a variety of tumor cells. Valproic acid (VPA) is one of them and has been widely used as an anti-epileptic drug in clinical scenes.

Mixed Lineage Leukemia (MLL) gene is frequently rearranged in infantile leukemias and treatment-related leukemias. The prognosis of leukemias with MLL rearrangements is often poor. In this study we investigated the effect of VPA on the survival of human B-lymphoid leukemia cell lines with MLL rearrangements.

When 3 human B-lymphoid leukemia cell lines were cultured with VPA at various concentrations, VPA induced cell death in all the cell lines tested in a dose dependent manner. At the clinically used concentration, VPA effectively killed 2 of 3 cell lines tested, which were resistant to the predonisolone treatment. This fact suggests that VPA induces cell death through a different pathway from that of predonisolone.

Morphological analysis of VPA-teated cells demonstrated the shrinkage of the cells and the nuclear chromatin condensation. Agarose gel electrophoresis showed that VPA caused the DNA fragmentation in these cells. Flow cytometric analysis of the cells stained with annexinV revealed that VPA induced the externalization of phosphatidylserine. These findings indicate that VPA induces apoptosis in human B-lymphoid leukemia cell lines tested in this study. VPA can be used as an anti-leukemic drug without serious adverse effect.